



ZTF-FCT  
Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología



Universidad del País Vasco  
Euskal Herriko Unibertsitatea

## **Grupo de Tecnología Enzimática y Celular**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Biokimika eta Biología Molekularra Saila

# EMPLEO DE CLEAS MAGNÉTICAS DE CALB PARA LA OBTENCIÓN DE BIODIÉSEL A PARTIR DE LÍPIDOS DE MICROALGAS

Memoria presentada por Enrique Angulo Picó para  
optar al grado de Doctor en Ciencias

Leioa, Junio 2017



# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a los profesores Juan Luis Serra y María Jesús Llama por la confianza puesta en mí. Muchas gracias por la guía y consejos que han permitido llevar este barco a buen puerto. Muchas gracias por mostrarme el valor del trabajo.

También quiero dar las gracias a los que me han enseñado y guiado en los comienzos en este maravilloso mundo de la investigación: Eneko, Ainoha, Noelia y, en especial, a dos personas sin las cuales este trabajo no se podría haber llevado a cabo, Álvaro y Carmen. Muchísimas gracias Álvaro por poner unos cimientos impresionantemente sólidos sobre los que levantar este humilde edificio y, sobre todo, por aguantarme y ser mi mentor durante los años de aprendizaje. Contigo Carmen me quedo sin palabras, contigo experimenté dos palabras imprescindibles en Ciencia, compromiso y trabajo. Fue sólo un año, pero fue intenso y productivo.

Eneko, Ainoha y Álvaro no sólo compartimos lugar de trabajo, sino que me hicisteis disfrutar como un niño en las ondas. Fue una experiencia única y ojalá algún día se vuelva a repetir.

A mi compañera de desventuras Teresa, gracias por tu imaginación para resolver los problemas y por hacer más amena la estancia en el Laboratorio. No creas que me olvidaré tan rápido de la serpiente, de Conchi y de los eppendorf cual bombillas navideñas... Tampoco me olvido de los alumnos internos que han pasado por el Laboratorio y que me han ayudado a comprender mejor lo que estaba haciendo. Gracias por tantas horas de trabajo compartido, Josu, Sara, Jone, Ane, Julen, Iraide, Maitane...

También agradecer a mis compañeros de carrera que cual Quijote han decidido realizar una tesis y que a día de hoy todavía siguen pelando con molinos de viento: Oihan, Giulia, Jon, Cris, David, Eva, Vir y Marta. Mucho ánimo y pensad que, al igual que la droga, de la tesis también se sale. También me acuerdo de los cuerdos del grupo, Andoni, Sergio, ama Maite, Sagar, Arkaitz que supisteis coger un barco a tiempo y navegar a buenos puertos. Muchas gracias a todos por vuestro apoyo y

palabras de consuelo. Que el viento de la vida siempre os sople de espaldas... pero que no os lleve tan lejos, que se os echa de menos.

No me olvido tampoco de la gente castreña que también están ahí y por supuesto de Diego. Hemos sufrido en nuestras carnes el sistema científico español, pero ahora se abre una nueva etapa. Gracias por estar ahí, por los consejos, el apoyo moral, por las mil correcciones y los movimientos de comas... qué pesado debo ser. Sin ti esto no hubiese sido lo mismo. Mil gracias.

Por último, dejo lo mejor. Muchísimas gracias a toda mi familia por aguantarme. A mis padres y a mi hermano por el apoyo incondicional y por aguantar mis explosiones, en especial durante los últimos meses. Este trabajo va en vuestro honor.

Al igual que hacían los romanos levantando templos a los Dioses desconocidos, quiero dar las gracias también a todas las personas desconocidas o que, por distracción, se me ha olvidado nombrar (espero que me perdonéis). Gracias por poner vuestro granito de arena en este trabajo.

[...] Madre, cuando yo me muera,  
que se enteren los señores.  
Pon telegramas azules  
que vayan del Sur al Norte.  
Siete gritos, siete sangres,  
siete adormideras dobles,  
quebraron opacas lunas  
en los oscuros salones.  
Lleno de manos cortadas  
y coronitas de flores,  
el mar de los juramentos  
resonaba, no sé dónde.  
Y el cielo daba portazos  
al brusco rumor del bosque,  
mientras clamaban las luces  
en los altos corredores.

Muerto de amor. Federico García Lorca

A mis padres, a mi hermano



*La libertad no es un estado sino un proceso;  
sólo el que sabe es libre, y más libre el que más sabe.*

Miguel de Unamuno





# RESUMEN

La necesidad de encontrar una alternativa adecuada al combustible derivado del petróleo, conlleva una intensa investigación en la búsqueda de nuevas materias primas para producir biocombustible. Un prometedor sustituto puede ser el biodiésel, obtenido a partir de fuentes renovables y sostenibles como son el aceite de plantas oleaginosas o de microalgas.

Para la obtención de biodiésel es necesario la transesterificación del aceite, pudiéndose emplear para ello un catalizador químico (ácido o álcali), o uno biológico (enzima). El uso de enzimas como catalizador reduce los inconvenientes de la catálisis química. En general, al utilizar enzimas la temperatura de reacción es menor, la especificidad y la selectividad para el sustrato aumentan y la toxicidad de los compuestos de reacción disminuye. Sin embargo, los enzimas son caros, su actividad puede disminuir después de varios ciclos de reacción, su recuperación es difícil y a menudo son imposibles de reutilizar. Estas desventajas se solventan en parte mediante la inmovilización del enzima.

En este trabajo se ha obtenido biodiésel a partir de biomasa de las microalgas *Chlorella vulgaris* var L3 y *Scenedesmus* sp., mediante catálisis enzimática de sus lípidos, utilizando mCLEAs. Este biocatalizador magnético se ha obtenido al inmovilizar mediante entrecruzamiento la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) con nanopartículas magnéticas (MNPs) funcionalizadas con grupos  $-NH_2$ .

Las mCLEAs son capaces de transesterificar aceites, independientemente del proceso de extracción que se haya empleado, de su viscosidad o de la presencia de lípidos no saponificables, como fosfolípidos, si bien la conversión en biodiésel es muy diferente entre los aceites empleados. Los mejores resultados se han obtenido a partir de la biomasa extraída de *Scenedesmus* sp. por saponificación, ya que la muestra es más pura, no contiene trazas de disolventes que puedan

inhibir al enzima, y no se encuentran fosfolípidos que puedan afectar a la actividad enzimática.

Para hacer económicamente viable la obtención de biodiésel a partir de microalgas se ha de optimizar todos los pasos de su producción. Los mejores resultados (90% conversión en 3 h) se obtienen a una temperatura de reacción entre 30-40°C, con una agitación mecánica (orbital). Aunque con agitación por ultrasonidos se obtiene mejores resultados (>90% en 1 h), el uso de ultrasonidos acaba perjudicando a las mCLEAs al cabo de 20 ciclos por liberación del enzima.

Debido al efecto inhibitorio del alcohol, se necesitó emplear *t*-butanol en la mezcla de reacción para que actúe como co-disolvente y mantenga baja la concentración del alcohol. Se empleó metanol como donador de grupos alquilo en una relación molar óptima (alcohol:aceite) de 6:1. La caída de velocidad inicial a alta concentración de metanol se debe a un mecanismo complejo en el que actúan varios elementos. Por un lado, el metanol es un inhibidor del enzima, y por otro induce la formación de mayores agregados de mCLEAs, que se traduce en una reducción de la superficie de contacto enzima-sustrato.

El carácter magnético del biocatalizador permite su fácil recuperación haciendo posible su reuso durante al menos 50 ciclos catalíticos consecutivos (retención de >90% de la conversión inicial de biodiésel), utilizando para ello condiciones de reacción moderadas.

Por ello, se puede concluir que las mCLEAs de CALB son un robusto y fiable biocatalizador capaz de ser reutilizado en numerosos ciclos catalíticos, lo que conlleva una importante reducción de su coste. Este abaratamiento del biocatalizador, acaba repercutiendo en un menor coste en la producción de biodiésel, haciendo que este biocombustible pueda llegar a ser económicamente competitivo frente a la producción de los petrocombustibles tradicionales.

# PRÓLOGO

Este trabajo se ha desarrollado en el laboratorio del Grupo de Tecnología Enzimática y Celular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) bajo la dirección de los Profesores Juan Luis Serra Ferrer y María Jesús Llama Fontal.

Esta Memoria también contiene algunos resultados del proceso de cultivo de las microalgas y de la extracción de los lípidos llevados a cabo en los centros NEIKER (Vitoria), TECNALIA (San Sebastián) y CENER (Sarriguren, Navarra). Es necesario incluir someramente estos resultados ya que las actuaciones llevadas a cabo aguas arriba en el proceso de obtención de biodiésel, repercuten en los resultados presentados en esta Memoria.

Para una mayor comprensión de los resultados obtenidos el trabajo se ha dividido en **9 capítulos**.

**Capítulo I:** Introducción general

**Capítulo II:** Materiales y métodos

**Capítulo III:** Obtención y caracterización de mCLEAs

**Capítulo IV:** Obtención de biodiésel a partir de microalgas

**Capítulo V:** Estabilidad, reutilización y escalado en la producción de biodiésel

**Capítulo VI:** Discusión general

**Capítulo VII:** Conclusiones

**Capítulo VIII:** Bibliografía

**Capítulo IX:** Anexo 1: Publicaciones



# ACRÓNIMOS, ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>APTS</b>	Aminopropiltriétoxissilano
<b><i>C. vulgaris</i></b>	<i>Chlorella vulgaris</i> var L3
<b>CALB</b>	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>
<b>CLEAs</b>	Agregados de enzimas entrecruzados
<b>DG</b>	Diglicéridos
<b>DLS</b>	Dispersión dinámica de luz
<b>DMF</b>	N,N-Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DRX</b>	Difracción de rayos X
<b>emu</b>	Unidades electromagnéticas
<b>FAAEs</b>	Ácidos grasos alquilados por esterificación (biodiésel)
<b>FAEEs</b>	Ácidos grasos etilados (biodiésel)
<b>FAMEs</b>	Ácidos grasos metilados (biodiésel)
<b>FAPEs</b>	Ácidos grasos propilados (biodiésel)
<b>FFAs</b>	Ácidos grasos libres
<b>GC</b>	Cromatografía de gases
<b>GEI</b>	Gases de efecto invernadero
<b>H</b>	Fuerza del campo magnético aplicado
<b>H<sub>c</sub></b>	Coercitividad
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>M</b>	Magnetización de un compuesto
<b>mcFFAs</b>	Mezcla modelo de ácidos grasos similar a la obtenida de la biomasa de <i>C. vulgaris</i>
<b>mCLEAs</b>	CLEAs magnéticas
<b>MG</b>	Monoglicéridos
<b>MJ</b>	Megajulios
<b>MNPs-NH<sub>2</sub></b>	MNPs con grupos -NH <sub>2</sub> en la superficie
<b>MNPs-OH</b>	MNPs con grupos -OH en la superficie
<b>MNPs</b>	Nanopartículas magnéticas
<b>M<sub>R</sub></b>	Remanencia magnética

<b>M<sub>s</sub></b>	Saturación magnética
<b>msFFAs</b>	Mezcla modelo de ácidos grasos similar a la obtenida de la biomasa de <i>Scenedesmus sp.</i>
<b>O<sub>e</sub></b>	Oersted (A/m)
<b>p/p</b>	Peso/peso
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino 150 mM, pH 7,4
<b>pNP</b>	<i>para</i> -Nitrofenol
<b>pNPA</b>	<i>para</i> -Nitrofenil acetato
<b>PUFAs</b>	Ácidos grasos poliinsaturados
<b>rcFFAs</b>	Mezcla de ácidos grasos obtenida de la biomasa de <i>C. vulgaris</i>
<b>rsFFAs</b>	Mezcla de ácidos grasos obtenida de la biomasa de <i>Scenedesmus sp.</i>
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
<b>SE</b>	Error estándar
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>TAGs</b>	Triacilglicéridos
<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa delgada
<b>t-Butanol</b>	<i>tert</i> -Butanol
<b>U</b>	Unidad de actividad enzimática (μmol/min)
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>v/v</b>	Volumen/volumen
<b>VSM</b>	Magnetometría de muestra vibrante

# ÍNDICE

## **CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN GENERAL ..... 31**

<b>1. Introducción.....</b>	<b>33</b>
1.1. Los biocombustibles .....	34
1.1.1. Las microalgas.....	36
1.2. Biodiésel.....	37
1.3. Catálisis enzimática.....	40
1.3.1. Inmovilización de enzimas .....	41
1.3.2. Nanopartículas magnéticas (MNPs).....	42
1.3.3. Las lipasas .....	42
<b>2. Objetivos generales .....</b>	<b>45</b>

## **CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS ..... 47**

<b>1. Materiales y métodos .....</b>	<b>49</b>
2.1. Reactivos y productos .....	49
2.2. Síntesis de MNPs .....	52
2.3. Caracterización de las MNPs .....	54
2.3.1. Caracterización morfológica.....	54
2.3.2. Caracterización magnética.....	55
2.3.2.1. Tamaño del núcleo magnético.....	55
2.3.3. Estabilidad.....	56
2.4. Inmovilización de CALB a MNPs .....	56
2.4.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE.....	58
2.4.2. Escalado en la obtención de mCLEAs .....	58
2.5. Caracterización de las mCLEAs .....	59
2.5.1. Caracterización morfológica.....	59
2.5.2. Análisis elemental.....	60
2.5.3. Determinación de la actividad enzimática .....	60
2.5.3.1. Actividad esterasa .....	60
2.5.3.2. Transesterificación de aceite .....	61
2.6. Cultivo de las microalgas .....	61

2.7. Extracción lipídica .....	61
2.7.1. Extracción Soxhlet .....	62
2.7.2. Extracción en matraz agitado.....	62
2.7.3. Extracción con H <sub>2</sub> O subcrítica .....	63
2.7.4. Extracción mediante saponificación .....	64
2.8. Aceites y FFAs empleados.....	64
2.8.1. Aceites y FFAs originales.....	64
2.8.2. Aceites y FFAs modelo .....	65
2.8.2.1. "Aceite 3" .....	65
2.8.2.2. Mezcla modelo de FFAs de <i>C. vulgaris</i> var L3.....	66
2.8.2.3. Mezcla modelo de FFAs de <i>Scenedesmus</i> sp.....	66
2.9. Producción de biodiésel.....	67
2.9.1. Catálisis enzimática .....	67
2.9.1.1. Reacciones de transesterificación .....	67
a) Efecto de la temperatura y relación molar .....	68
b) Escalado en la producción de biodiésel .....	69
c) Estudio de la cantidad de mCLEAs.....	70
d) Estudio del efecto del metanol.....	70
e) Estudio de la presencia de H <sub>2</sub> O.....	70
f) Estudio del modo de agitación .....	71
2.9.1.2. Reacciones de esterificación .....	71
a) Efecto de la temperatura .....	72
b) Estudio del donador de grupos alquilo .....	72
c) Estudio del modo de agitación.....	72
d) Estudio de la relación molar alcohol:FFAs .....	73
e) Cantidad de mCLEAs.....	74
2.9.2. Catálisis ácida .....	74
2.10. Estabilidad y reutilización de las mCLEAs .....	75
2.10.1. Efecto de los lavados sobre las mCLEAs .....	75
2.10.2. Efecto del alcohol sobre las mCLEAs .....	76
2.10.3. Estabilidad en disolventes orgánicos.....	76
2.11. Métodos analíticos.....	77
2.11.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	77
2.11.2. Cromatografía en capa delgada (TLC) .....	78
2.11.3. Cromatografía de gases (GC).....	79

## **CAPÍTULO III OBTENCIÓN DE mCLEAs..... 81**

<b>1. Introducción.....</b>	<b>83</b>
1.1. Nanotecnología .....	83



1.2. Las nanopartículas.....	85
1.2.1. Superparamagnetismo .....	86
1.2.2. Síntesis de MNPs .....	89
1.2.2.1. Coprecipitación química.....	90
1.2.2.2. Funcionalización .....	91
1.3. Inmovilización .....	91
1.3.1. Tipos de inmovilización.....	93
1.3.1.1. Adsorción .....	94
1.3.1.2. Unión covalente.....	95
1.3.1.3. Atrapamiento y encapsulación .....	95
1.3.1.4. Entrecruzamiento .....	96
1.4. Las lipasas .....	98
1.4.1. Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> (CALB) .....	99
<b>2. Resultados y discusión .....</b>	<b>103</b>
2.1. Caracterización de las nanopartículas .....	103
2.1.1. Caracterización morfológica.....	103
2.1.2. Caracterización magnética .....	105
2.1.3. Estabilidad de las MNPs.....	107
2.2. Caracterización de las mCLEAs .....	108
2.2.1. Estudio de la inmovilización .....	108
2.2.2. Caracterización morfológica.....	109
2.2.3. Caracterización magnética .....	110
2.2.4. Estabilidad de las MNPs.....	111
2.2.5. Análisis elemental.....	111
2.2.6. Determinación de la actividad enzimática .....	112
2.2.6.1. Actividad esterasa .....	112
2.2.6.2. Transesterificación de aceites.....	112
2.3. Escalado en la producción de mCLEAs .....	113

## **CAPÍTULO IV OBTENCIÓN DE BIODIÉSEL ..... 115**

<b>1. Introducción.....</b>	<b>117</b>
1.1. Biodiésel.....	118
1.1.1. Tipos de biodiésel .....	118
1.1.1.1. Biodiésel de 1ª generación.....	118
1.1.1.2. Biodiésel de 2ª generación.....	119
1.1.1.3. Biodiésel de 3ª y 4ª generación.....	119

1.2. Las microalgas.....	120
1.2.1. Cultivo.....	121
1.2.2. Cosecha y secado .....	122
1.2.3. Extracción lipídica.....	123
1.2.3.1. Extracción física .....	123
1.2.3.2. Extracción química.....	123
a) Extracción Soxhlet .....	123
b) Extracción subcrítica .....	124
c) Extracción por fluidos supercríticos.....	125
1.2.3.3. Saponificación directa .....	125
1.3. Obtención de biodiésel .....	126
1.3.1. Catálisis química.....	127
1.3.1.1. Catálisis alcalina.....	127
1.3.1.2. Catálisis ácida .....	128
1.3.2. Catálisis enzimática .....	128
1.4. Optimización de las condiciones de la reacción .....	129
1.4.1. Temperatura.....	130
1.4.2. Tipo de donador alquilo y proporción del mismo .....	130
1.4.3. Tipos de co-disolvente .....	131
1.4.4. Modo de agitación.....	132
<b>2. Resultados y Discusión.....</b>	<b>135</b>
2.1. Cultivo y caracterización de las microalgas.....	135
2.2. Extracción lipídica .....	138
2.2.1. Extracción Soxhlet .....	138
2.2.2. Extracción en matraz agitado.....	139
2.2.3. Extracción con H <sub>2</sub> O subcrítica .....	139
2.2.4. Extracción por saponificación .....	139
2.3. Producción de biodiésel.....	141
2.3.1. Aceites.....	141
2.3.1.1. Aceite 1 .....	141
2.3.1.2. Aceite 2 .....	142
2.3.1.3. Relación molar .....	144
2.3.1.4. Estudio de la temperatura .....	145
2.3.1.5. Aceite 3 .....	146
2.3.1.6. Aceite 4 .....	148
2.3.2. Ácidos grasos .....	150
2.3.2.1. FFAs de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	150
2.3.2.2. FFAs modelo de <i>C. vulgaris</i> (mcFFAs) .....	151
2.3.2.3. Estudio de la temperatura .....	152
2.3.2.4. Estudio del donador de grupos alquilo.....	153

2.3.2.5. FFAs de <i>Scenedesmus</i> sp. ....	155
2.3.2.6. Estudio de la agitación .....	157
2.3.2.7. Efecto de los lavados sobre las mCLEAs .....	160
2.3.2.8. Efecto del alcohol sobre las mCLEAs.....	161
2.3.2.9. Efecto de los disolventes sobre las mCLEAs .....	163
2.3.2.10. Estudio de la relación molar alcohol:FFAs.....	165
2.4. Comparación del biodiésel obtenido de las microalgas ....	167
2.5. Comparación entre catálisis .....	168
2.5.1. <i>Chlorella vulgaris</i> .....	168
2.5.2. <i>Scenedesmus</i> sp. ....	169

## **CAPÍTULO V REUTILIZACIÓN Y ESCALADO..... 173**

<b>1. Introducción.....</b>	<b>175</b>
1.1. Viabilidad del biodiésel.....	177
1.1.1. Optimización del proceso de producción.....	177
1.1.1.1. Carga enzimática y reutilización .....	178
1.1.1.2. Presencia de agua en la reacción .....	182
1.1.1.3. Tipo de reactor y modo de funcionamiento.....	182
1.1.2. Biorrefinería de biomasa microalgal .....	183
<b>2. Resultados y Discusión.....</b>	<b>185</b>
2.1. Estabilidad y reutilización de las mCLEAs .....	185
2.1.1. Efecto de la agitación en la actividad y estabilidad de las mCLEAs.....	185
2.1.2. Efecto del co-disolvente en la reutilización de mCLEAs	188
2.1.3. Vida media de las mCLEAs .....	189
2.2. Escalado en la producción de biodiésel.....	194
2.2.1. Escalado a 5 ml.....	194
2.2.1.1. Estudio de la agitación .....	195
2.2.1.2. Estudio de la cantidad de mCLEAs .....	196
2.2.2. Escalado a 50 ml.....	198
2.2.2.1. Estudio de la cantidad de mCLEAs .....	198
2.2.2.2. Estudio de la agitación .....	199
2.2.2.3. Efecto de la adición de metanol .....	201
2.2.3. Escalado a 100 ml.....	203
2.2.3.1. Efecto del metanol en la reacción .....	203
2.2.3.2. Estudio de la presencia de H <sub>2</sub> O en la reacción .....	205

2.2.4. Escalado a 500 ml.....	207
2.2.4.1. Estudio de la agitación .....	207
2.2.4.2. Estudio de la temperatura óptima.....	208

<b>CAPÍTULO VI DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>211</b>
--	------------

<b>CAPÍTULO VII CONCLUSIONES.....</b>	<b>221</b>
---------------------------------------	------------

<b>CAPÍTULO VIII BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>227</b>
---	------------

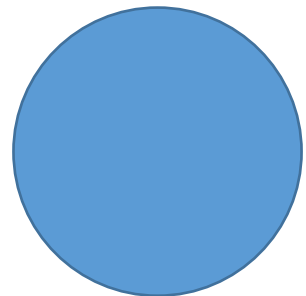
<b>CAPÍTULO IX ANEXO 1: PUBLICACIONES.....</b>	<b>253</b>
--	------------





# Capítulo I

## Introducción General







## 1. INTRODUCCIÓN

La continua dependencia de los combustibles fósiles como fuente de energía ha afectado a nuestro medio ambiente de manera significativa, dando lugar al fenómeno del calentamiento global, y a una serie de consecuencias de gran alcance, que incluso hoy en día resultan difícilmente predecibles (Bhattacharya y Pletschke 2014).

En la Unión Europea (UE), las principales fuentes antropogénicas de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) son los sectores de la energía, el transporte y la agricultura, responsables de más del 60%, 20%, y 9%, respectivamente, de las emisiones de GEI a la atmósfera. Estos tres sectores juntos representan casi la totalidad de las emisiones a la atmósfera de fuentes antropogénicas (Mata *et al.* 2010).

Los GEI contribuyen no sólo al calentamiento global, sino que tienen otros impactos sobre el medio ambiente y la vida humana como, por ejemplo, la acidificación de los océanos por la absorción de CO<sub>2</sub>. Esta disminución del pH puede causar la pérdida rápida de los arrecifes de coral y de la biodiversidad del

ecosistema marino, provocando enormes problemas en la vida del océano y, en consecuencia, en la vida terrestre (Mata *et al.* 2010).

Por ello, es necesaria la búsqueda de fuentes de energía renovables, sostenibles y limpias. Según las previsiones de la UE, el consumo mundial de energía desde la actualidad hasta el año 2030 aumentará alrededor del 40%. Esto provocará un alza en las previsiones de la demanda energética que, junto con la redistribución geográfica del consumo, mermarán las reservas de energías fósiles, incrementando su precio en el mercado. Es por ello que la UE, cuya dependencia energética alcanza actualmente el 53% del consumo total, está promoviendo investigaciones que lleven a la sociedad a un uso sostenible de los recursos naturales, y a obtener productos con el menor impacto posible sobre el medio ambiente.

Actualmente se están estudiando y aplicando numerosas alternativas, con diferente grado de éxito y en diferente fase de estudio e implementación. Sirvan de ejemplo las energías solar, hidroeléctrica, geotérmica y eólica, así como los biocombustibles y el secuestro de CO<sub>2</sub> (Dewulf y Van Langenhove 2006). Cada uno tiene sus propias ventajas e inconvenientes y, dependiendo del área de aplicación, será más ventajosa y adecuada una energía frente a otra.

En concreto, en el sector del transporte se está llevando a cabo la sustitución gradual de los combustibles fósiles por biocombustibles de fuentes renovables, ya que se consideran una alternativa real, sobre todo a corto plazo, pues permiten alcanzar el objetivo de reducción de GEI.

## 1.1. Los biocombustibles

A principios del siglo XX el inventor del motor diésel, Rudolf Christian Karl Diesel (1858-1913), demostró la viabilidad del uso de los aceites vegetales como

combustible en los motores de combustión (Orchard *et al.* 2007). Diesel creía que la utilización de biocombustible se convertiría en una realidad a medida que se desarrollaran futuras versiones de su motor. Sin embargo, este biocombustible fue sustituido años después por petrodiesel, un combustible más barato obtenido del refinado del petróleo. Desde entonces, la idea de utilizar biocombustibles ha ido retornando periódicamente al mundo de la investigación, en especial a partir de la crisis del petróleo en los años 70 (Akoh *et al.* 2007).

Los biocombustibles, que se obtienen a partir de biomasa, se clasifican en sólidos (biocarbón), gaseosos (biogás, biomasa y biohidrógeno) y líquidos (etanol, aceite vegetal y biodiésel). Este último grupo es el de mayor importancia, y se clasifica en función del tipo de materia prima que se usa para su producción.

Los biocombustibles de primera generación se obtienen de biomasa comestible, como maíz, soja, colza, caña de azúcar u oliva. Los biocombustibles de segunda generación se obtienen de materias primas no comestibles, como *Jatropha curcas*, *Miscanthus spp.* o *Panicum virgatum* (Mubarak *et al.* 2015). Desafortunadamente, el uso de estas materias primas conlleva una serie de inconvenientes, como son los problemas de seguridad alimenticia y la deforestación, que hacen que los biocombustibles de primera y segunda generación sean insostenibles a día de hoy (Veillette *et al.* 2015).

Hasta ahora, los aceites de plantas oleaginosas (fundamentalmente palma, jatrofa, colza, soja y girasol) han sido la principal materia prima para la obtención de biodiésel, pero el novedoso uso de aceite de microalgas abre una nueva ventana en este proceso. La biomasa microalgal tiene un elevado potencial bioenergético, ya que puede emplearse para la obtención de diversos biocombustibles como biogás o biodiésel.

### 1.1.1. Las microalgas

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos considerados como uno de los organismos vivos más antiguos de la Tierra (Song *et al.* 2008). Se encuentran en ambientes marinos y dulceacuícolas, creciendo a un ritmo excepcionalmente rápido: 100 veces más que las plantas terrestres, pudiendo duplicar su biomasa en menos de 24 h (Tredici 2010).

Debido a su alta producción de biomasa, las microalgas se han investigado desde hace tiempo buscando su utilidad para la humanidad. Estas investigaciones están aportando conclusiones significativas, situando a las microalgas como una buena fuente productora de piensos y principios bioactivos de alto valor (Metting y Pyne 1986; Shimizu 1993; Chisti 2007), como una útil herramienta de biorremediación (Mallick 2002; Muñoz y Guieysse 2006), como un ventajoso biofertilizante (Vaishampayan *et al.* 2001) y, finalmente, como una excelente fuente de biocombustibles (Chisti 2007).

El biocombustible proveniente de micro o macroalgas se conoce como biocombustible de tercera generación y tiene una serie de ventajas sobre las dos categorías anteriores. Las microalgas se consideran buenas candidatas para la producción de biocombustibles debido a su mayor eficiencia fotosintética, mayor producción de biomasa y mayor tasa de crecimiento en comparación con otras fuentes alternativas como las plantas terrestres (Miao y Wu 2006; Praveenkumar *et al.* 2014). Además, dado que muchas cepas microalgales pueden cultivarse en zonas áridas, así como en medio de agua salina, su cultivo a gran escala no impone tensiones adicionales a la producción de alimentos (Widjaja *et al.* 2009). Sus altas tasas fotosintéticas permiten que las microalgas no sólo sirvan como una plataforma efectiva para secuestrar CO<sub>2</sub>, sino que también acumulen aceites en su biomasa (hasta un 77% de la masa de células secas) (Halim *et al.* 2012).

Por otra parte, gracias a la ingeniería metabólica se puede modificar al organismo fotosintético para una mayor producción de lípidos, y con ello de biocombustible. Este último biocombustible se denominaría como biocombustible de cuarta generación (Daroch *et al.* 2013).

Las microalgas pueden proporcionar varios tipos de biocombustibles renovables. Estos incluyen el metano producido por la digestión anaeróbica de su biomasa, el biohidrógeno producido fotobiológicamente y, en especial, el biodiésel, que es un derivado de los aceites de reserva que acumulan.

En general, estos aceites están compuestos mayoritariamente por triglicéridos (también llamados triglicéridos, TAGs) y en menor medida por ácidos grasos libres (FFAs), monoglicéridos y diglicéridos. Químicamente los TAGs son ésteres de ácidos grasos de cadena larga y glicerol (1,2,3-propanotriol). La utilización directa de aceites como combustible genera bastantes problemas debido a su elevada viscosidad, baja volatilidad, alto contenido en FFAs y formación de gomas durante su oxidación. Por ello, y con el fin de que el aceite contenga propiedades y rendimiento similares al de los combustibles derivados del petróleo, es necesario que sufra alguna transformación (Fukuda *et al.* 2001; Knothe 2006; Singh y Singh 2010). Existen diferentes tipos de modificación, como son la dilución, craqueo térmico (pirólisis), transesterificación y microemulsificación. De todos ellos, la transesterificación es el mejor método para obtener un biocombustible de alta calidad: el biodiésel (Balat y Balat 2010; Brennan y Owende 2010; Talebian-Kiakalaieh *et al.* 2013).

## 1.2. Biodiésel

Químicamente, el biodiésel es una mezcla de ésteres de ácidos grasos de cadena larga alquilados (FAAE, *fatty acid alkyl esters*) obtenidos a partir de grasa animal, aceites vegetales o aceites de microalgas (Talebian-Kiakalaieh *et al.* 2013).

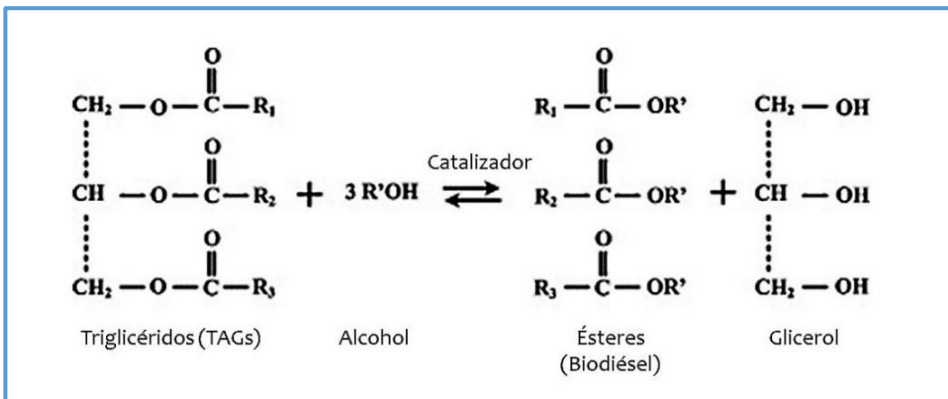
El biodiésel es el biocombustible considerado como mejor candidato para sustituir al petrocombustible, ya que se puede utilizar en cualquier motor diésel sin necesidad de modificación (Leung *et al.* 2010). Sus propiedades energéticas y características físico-químicas son análogas a las que presenta el diésel obtenido a partir de la destilación del petróleo. Por ejemplo, el poder calorífico del biodiésel (energía desprendida por unidad de masa oxidada), es muy parecido al del diésel mineral, 39-41 MJ/kg frente 43 MJ/kg (Oliveira y Da Silva 2013).

Son numerosos los beneficios del biodiésel frente al diésel mineral, entre los que destaca la menor emisión de gases, en términos de hidrocarburos no quemados, monóxido de carbono y partículas. Además, el biodiésel presenta alta biodegradabilidad y propiedades lubricantes que lo hacen aún mejor combustible (Kegl 2008). Por otra parte, su punto de inflamación es más elevado (>150 °C) lo que lo hace más seguro a la hora de su manipulación y transporte (Sankaran *et al.* 2016). Así mismo, al poseer un contenido en azufre menor que el diésel mineral, y carecer de agentes cancerígenos, se le puede considerar como un combustible limpio.

Para producir biodiésel se necesita transesterificar los TAGs que componen el aceite. En la transesterificación, también conocida como alcoholólisis, los TAGs y FFAs que componen el aceite se convierten en ésteres alquilados de ácido graso (FAAE, *fatty acid alkyl esters*). La reacción se realiza en presencia de alcoholes de cadena corta, tales como metanol o etanol, y un catalizador (ya sea un álcali, un ácido o un enzima), obteniéndose glicerol como subproducto (Lam *et al.* 2010). En la Figura 1.1 se muestra la reacción de transesterificación.

Como se ha indicado, el biodiésel se puede obtener empleando catalizadores químicos o biocatalizadores (enzimas). El método convencional es la catálisis química, en la cual se utiliza un ácido (como el sulfúrico) o un álcali (como

hidróxido sódico). En cambio, en el proceso enzimático el catalizador de la reacción es una lipasa.



**Figura 1.1: Reacción de transesterificación de un aceite para obtener biodiésel.** La estequiometría requiere un mínimo de 3 mol de alcohol (donador de alquilo) por cada mol de triglicérido para obtener 3 mol de ésteres y 1 mol de glicerol. En la reacción no se muestran los derivados intermedios: diacilglicéridos y monoacilglicéridos. Adaptado de Mata *et al.* (2010).

A día de hoy, el método químico más común es la transesterificación catalizada por un álcali (generalmente KOH o NaOH), ya que es una reacción muy rápida, la temperatura es relativamente baja (entre 60 y 70°C) y tiene mayor capacidad de conversión, en comparación con el proceso catalizado por un ácido (Shahid y Jamal 2011; Sankaran *et al.* 2016). Sin embargo, existen limitaciones en la utilización del método alcalino ya que, por ejemplo, la presencia de agua y FFAs provoca la formación de jabones por saponificación de los TAGs. Estos jabones reducen la eficiencia catalítica, incrementan la viscosidad, forman geles y dificultan la eliminación del glicerol y la posterior recuperación y purificación del biodiésel (Robles-Medina *et al.* 2009; Lam *et al.* 2010).

En cambio, la catálisis ácida permite utilizar aceites con alto contenido en FFAs y agua, pero la reacción es unas 4000 veces más lenta. Además, este tipo de catálisis requiere emplear temperaturas de 90-120°C, mucha más cantidad de catalizador (del orden de 30 moles de catalizador por cada mol de aceite), y una elevada cantidad de agua (Vyas *et al.* 2010). Por otra parte, este tipo de catálisis

provoca que los equipos se dañen por la corrosión provocada por los catalizadores. Todo esto acaba originando un mayor coste y gasto energético en la obtención de biodiésel, haciendo que sea poco rentable su producción.

### 1.3. Catálisis enzimática

En los últimos años, la obtención de bioproductos a escala industrial está experimentando un significativo cambio de tendencia, dirigido a sustituir los métodos clásicos de catálisis química por tecnologías limpias que utilizan biocatalizadores. Los primeros métodos requieren grandes instalaciones, emplean habitualmente condiciones de reacción extremas con elevados consumos de energía y agua, emplean con frecuencia derivados del petróleo y, a menudo, requieren la utilización de ácidos, álcalis y disolventes, que son contaminantes agresivos con el medio ambiente. Por su parte, las transformaciones catalizadas por enzimas son mucho más específicas, requieren condiciones de reacción más suaves (con menor gasto energético y de agua) y, en muchas ocasiones, su empleo se combina con el uso de materias primas obtenidas de forma sostenible a partir de fuentes renovables (Ghaly *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2015; Soler *et al.* 2016).

Por otra parte, la producción enzimática de biodiésel permite recuperar el glicerol, sin necesidad de purificar el producto y evitando la generación de residuos químicos. Además, el proceso enzimático tolera el contenido de agua y FFAs en la mezcla, aumentando el rendimiento del biodiésel sin la formación de jabones (Dizge *et al.* 2009). Asimismo, la catálisis con un biocatalizador tiene un menor coste por la posible reutilización del mismo y por el menor número de etapas necesarias para la obtención de los productos finales, siendo éstos de mayor pureza (Sankaran *et al.* 2016).



Estas ventajas demuestran que la producción de biodiésel catalizada por enzimas tiene un alto potencial por ser un proceso más ecológico y una prometedora alternativa al proceso químico. Sin embargo, el uso de enzimas en la industria está limitado, ya que todavía quedan por resolver muchos inconvenientes, como su alto coste económico, la inactivación enzimática por disolventes y la lenta velocidad de reacción (Bajaj *et al.* 2010; Cesarini *et al.* 2013).

### 1.3.1. Inmovilización de enzimas

Las limitaciones al uso de enzimas en la industria se pueden paliar parcial o totalmente si se emplean inmovilizados en lugar de en disolución. Habitualmente, la inmovilización enzimática supone un aumento significativo en la estabilidad del biocatalizador frente a la inactivación espontánea y a las condiciones extremas de reacción (temperatura, pH, disolventes orgánicos, sales y fuerza iónica, entre otras).

Además, la inmovilización del enzima permite su fácil recuperación de la mezcla de reacción al finalizar su actuación catalítica, siendo posible su reutilización en consecutivos ciclos catalíticos. Desde el punto de vista operacional, el empleo de enzimas inmovilizados y confinados en un reactor puede permitir su uso tanto en reacciones en continuo como en reacciones multienzimáticas.

Son numerosas las técnicas que se han desarrollado para inmovilizar enzimas, pero se pueden resumir en cuatro tipos: atrapamiento en mallas tridimensionales porosas, encapsulación en membranas semipermeables, adsorción a soportes sólidos y unión covalente, bien sea a soportes sólidos, o por entrecruzado del enzima consigo mismo (Brady y Jordaan 2009). Dentro de este último tipo de inmovilización por enlaces covalentes destacan dos técnicas recientes: la unión covalente de enzimas a nanopartículas magnéticas (MNPs) de magnetita y el

entrecruzamiento de agregados de enzimas (*Cross-Linked Enzyme Aggregates*, CLEAs).

### 1.3.2. Nanopartículas magnéticas (MNPs)

Las nanopartículas magnéticas (MNPs) son partículas de diámetro nanoscópico, comprendido entre unos pocos y varios cientos de nanómetros, que poseen características magnéticas especiales: son superparamagnéticas. El superparamagnetismo se produce en materiales de un tamaño menor de 10 nm, que tienen la capacidad de no quedarse magnetizados tras la aplicación de un campo magnético. Las MNPs esféricas de magnetita pueden obtenerse al tratar hidróxido ferroso con diferentes agentes oxidantes (Morales *et al.* 1999). Además, si la coprecipitación de Fe(II) y Fe(III) se realiza en presencia de hidróxido amónico se consigue que las MNPs presenten grupos -OH superficiales, que son de gran importancia para su posterior funcionalización (Morales *et al.* 1999; Li *et al.* 2010). Esta funcionalización se puede hacer aportando grupos reactivos a la superficie de las MNPs, por ejemplo, grupos carboxilo o amino.

La inmovilización por enlaces covalentes se puede realizar por los dos métodos ya nombrados, o por un tercero, que resultaría de la combinación de los anteriores. Esto es, nanopartículas entrecruzadas con enzima insolubilizado y éstas a su vez entrecruzadas consigo mismo. Con esto y, según trabajos realizados con anterioridad en nuestro laboratorio, se consiguen biocatalizadores muy robustos, que son muy estables y fáciles de recuperar para su reutilización (Cruz-Izquierdo *et al.* 2014).

### 1.3.3. Las lipasas

Las lipasas son enzimas ubicuos producidos por plantas, animales y microorganismos, siendo su función biológica la hidrólisis de TAGs a glicerol y FFAs. Sin embargo, en medios orgánicos las lipasas pueden catalizar reacciones

sintéticas, incluyendo interesterificaciones entre triglicéridos y alcoholes para producir glicerina y alquil ésteres de ácidos grasos de cadena larga, es decir, biodiésel (Cruz-Izquierdo *et al.* 2014).

Las lipasas microbianas son las más empleadas para obtener biodiésel mediante transesterificación enzimática, ya que se pueden obtener por fermentación y con pasos sencillos de purificación (Al-Zuhair 2007a). Las lipasas más empleadas en síntesis orgánica son las de origen bacteriano, como *Burkholderia cepacia* (BCL), y las de levaduras como *Candida rugosa* (CRL) y la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) (Sankaran *et al.* 2016).

Ante la situación actual del tema, este trabajo se centró en la obtención de biodiésel de forma sostenible y de fuentes renovables, con el menor costo posible, para que el biocombustible resultante pudiera ser económicamente viable en cuanto a la sustitución del diésel mineral se refiere.

La obtención de biodiésel en este trabajo se realiza mediante catálisis enzimática, al ser un método sencillo y limpio, y por los innumerables beneficios que presenta. Para ello, se utiliza la lipasa B de *Candida antartica* (CALB), muy usada en producción de biodiésel (Sankaran *et al.* 2016), inmovilizada entre sí mediante entrecruzado de agregados del enzima (*Cross-Linked Enzyme Aggregates*, CLEAs), y a su vez, entrecruzada con MNPs. Este biocatalizador magnético presenta las ventajas típicas de las mCLEAs, entre las que destaca una mayor estabilidad, y que gracias a su carácter magnético permite una fácil recuperación de la mezcla de reacción para su reutilización, bajando considerablemente los costos de producción.

La utilidad de este biocatalizador ya ha sido comprobada con anterioridad en nuestro laboratorio, donde se han obtenido resultados satisfactorios para la producción de biodiésel de primera y de segunda generación, utilizando aceites

de oliva, jatrofa, colza y camelina, así como aceites de fritura agotados (Cruz-Lizquierdo *et al.* 2012; 2014; López *et al.* 2014).

Debido al rechazo social a emplear plantas oleaginosas (ya sean comestibles o no) como materia prima, se decidió obtener biodiésel de tercera y cuarta generación, utilizando lípidos de dos especies microalgales pertenecientes a los géneros *Scenedesmus* y *Chlorella*.

La selección de una especie microalgal adecuada es un aspecto fundamental para asegurar un proceso eficiente de obtención de bio-energía (Griffiths y Harrison 2009). Estas especies microalgales se consideran buenas candidatas para obtener biodiésel por la alta productividad que muestran en cultivos a gran escala. El poder calorífico del aceite de estos géneros puede alcanzar los 29 kJ/g, valor muy cercano a los 39 kJ/g que ofrece el aceite de colza, lo que justifica el potencial de estas microalgas como fuente de biodiésel (Illman *et al.* 2000). La composición proximal de estas microalgas incluye proteínas, carbohidratos, lípidos y fibra en proporciones variables, haciendo de su biomasa una materia prima versátil que puede emplearse para obtener diversos combustibles como biodiésel, bioetanol, metano e hidrógeno. Sin embargo, numerosos factores nutricionales y ambientales durante su cultivo pueden modificar notablemente la composición química de la biomasa y su valor energético. Éste es el caso del cultivo microalgal en deficiencia de N, que provoca una mayor acumulación de lípidos (Ikaran *et al.* 2015), siendo esto beneficioso para la producción de biodiésel.

Este trabajo se ha realizado dentro del proyecto ENERGREEN financiado por la Unión Europea dentro del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), que persigue la readaptación de los cultivos tradicionales de microalgas para obtener organismos con un mayor potencial productivo (en cuanto a cantidad de aceite), de manera que puedan ser aprovechados para obtener biodiésel de forma más rentable económicamente y sostenible con el medio ambiente.

## 2. OBJETIVOS GENERALES

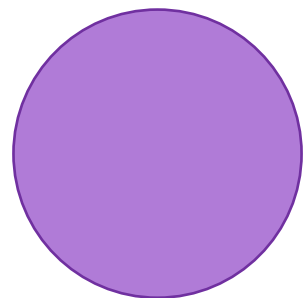
A tenor del estado actual del tema cuando se inició este trabajo, se propuso como principal objetivo, la obtención de biodiésel a partir de aceites y ácidos grasos extraídos de microalgas (*Chlorella vulgaris* var L3 y *Scenedesmus* sp.). El biodiésel se obtendrá mediante catálisis enzimática utilizando CLEAs magnéticas (mCLEAs) de lipasas de origen microbiano. Para conseguir este objetivo principal se desglosaron las tareas a realizar en los siguientes subobjetivos, que se abordan en el capítulo indicado:

1. Obtención de MNPs de magnetita y caracterización de su composición estructural y de sus propiedades magnéticas. **(Capítulo III)**
2. Obtención de CLEAs magnéticas por entrecruzamiento de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) con las MNPs. Caracterización de las propiedades magnéticas y catalíticas del biocatalizador magnético obtenido (mCLEAs de CALB). **(Capítulo III)**
3. Obtención de biodiésel catalizado por mCLEAs de CALB, a partir de lípidos de las microalgas *Chlorella vulgaris* var L3 y *Scenedesmus* sp., extraídos por diferentes modos. **(Capítulo IV)**
4. Optimización de las condiciones de la reacción: temperatura, donador de grupos alquilo, relación molar alcohol:aceite/FFAs, modo de agitación y uso de un co-disolvente en la mezcla de reacción. Estudio del efecto de diferentes disolventes sobre las mCLEAs. **(Capítulo IV)**
5. Comparación de la obtención de biodiésel a partir de la biomasa de las dos microalgas estudiadas, así como del obtenido por catálisis enzimática y química. **(Capítulo IV)**

6. Estudio de la estabilidad de las mCLEAs de CALB mediante su reutilización en sucesivos ciclos catalíticos de conversión de aceite en biodiésel en las mejores condiciones obtenidas. **(Capítulo V)**
7. Estudio del escalado de la producción de biodiésel en un reactor enzimático desde volúmenes de 0,5 ml hasta 500 ml, pasando por volúmenes intermedios de 5 ml, 50 ml y 100 ml. **(Capítulo V)**
8. Optimización de las condiciones de la reacción a gran escala: temperatura, modo de agitación, relación molar óptima alcohol:aceite/FFAs, presencia de agua y cantidad de enzima en la reacción. **(Capítulo V)**

# Capítulo II

## Materiales y Métodos







# 1. MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1. Reactivos y productos

Para la realización de este trabajo se han empleado los reactivos y productos que se recogen en la Tabla 2.1. Todos los reactivos son de calidad analítica, y en su caso, de grado para biología molecular.

**Tabla 2.1: Reactivos y productos empleados.** Se indica el proveedor, así como la ciudad y el país de origen.

Casa Comercial Ciudad, País	Producto
Bio-Rad Hercules, PA, EEUU	Acilamida/bisacilamida 30% (p/v)
	Marcadores de masa molecular (Precision Protein Standards)
	Reactivo de Bradford
Bunge Ibérica, S.A. Zierbana, España	Aceite de soja no refinado
GE Healthcare Biosciences AB Uppsala, Suecia	Azul de Coomassie (PhastGelBlue R)

**Tabla 2.1: Reactivos y productos empleados.** Se indica el proveedor, así como la ciudad y el país de origen (continuación).

Casa Comercial Ciudad, País	Producto
Merck Darmstat, Alemania	1,4-Butanodiol
	1-Butanol
	2-Butanol
	2-Mercaptoetanol
	2-Propanol
	Acetona
	Bicarbonato sódico
	Carbonato sódico
	Cloroformo
	Cloruro sódico
	Diclorometano
	Glutaraldehido
	Alcohol isoamílico
	Metanol (grado HPLC)
	N,N-Dimetilformamida (DMF)
	N,N,N',N'-Tetrametilendiamina (TEMED)
	<i>n</i> -Hexano (grado HPLC)
	Nitrato de plata
	Placas de gel de Sílice 60
Sulfato amónico	
Novozymes A/S Bagsvaerd, Dinamarca	Lipozyme © CALB L
Panreac Barcelona, España	Cloruro potásico
	Etilenglicol
	Fosfato dipotásico
	Fosfato monopotásico
	Tris (hidroximetil)aminometano
VWR Soulbury, Reino Unido	2-Propanol (grado HPLC)

**Tabla 2.1: Reactivos y productos empleados.** Se indica el proveedor, así como la ciudad y el país de origen (continuación).

Casa Comercial Ciudad, País	Producto
Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EEUU	2-Metil-2-butanol
	3-Aminopropiltriétoxilano (APTS)
	Acetonitrilo
	Azul de bromofenol
	Borohidruro sódico
	Cloruro férrico
	Cloruro ferroso
	Dimetilsulfóxido (DMSO)
	Dodecilsulfato sódico (SDS)
	Estearato de etilo
	Estearato de metilo
	Acetato de etilo
	Glicerina
	Linoleato de etilo
	Linoleato de metilo
	Linolenato de etilo
	Linolenato de metilo
	Desecadores moleculares (Molecular Sieves)
	<i>p</i> -Nitrofenil acetato ( <i>p</i> -NPA)
	Palmitato de etilo
	Palmitato de metilo
	<i>t</i> -Butanol
Tetrahidrofurano (THF)	
Tolueno	
Triton X-100	

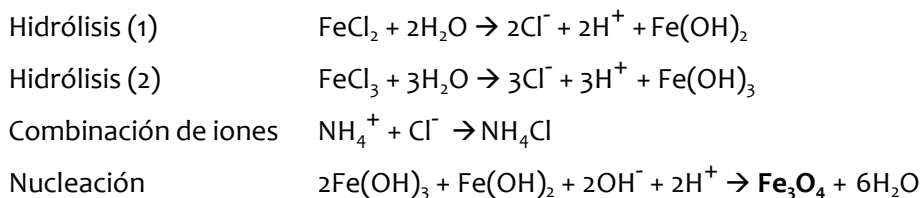
**Tabla 2.1: Reactivos y productos empleados.** Se indica el proveedor, así como la ciudad y el país de origen (continuación).

Casa Comercial Ciudad, País	Producto
Quimivita Barcelona, España	Ácido acético
	Ácido clorhídrico
	Hidróxido amónico
	Etanol
	Metanol
TCI Europe Zwijndrecht, Bélgica	Ácido esteárico
	Ácido linoleico
	Ácido linolénico
	Ácido oleico
	Ácido palmítico

Además, se utilizó aceite de oliva virgen extra (Carbonell®) obtenido en un comercio local, así como aceite de palma, amablemente proporcionado por el centro asociado CENER.

## 2.2. Síntesis de MNPs

Las nanopartículas de magnetita se sintetizaron por coprecipitación de sales de hierro en medio alcalino según Morales *et al.* (1999). Para ello se bombearon, a un caudal de 5 ml/min, 50 ml de la disolución compuesta por FeCl<sub>2</sub> (0,33 M) y FeCl<sub>3</sub> (0,66 M) sobre 450 ml de NH<sub>4</sub>OH (0,42 M) bajo vigorosa agitación mecánica (400 rpm) con una varilla de vidrio (Agitador RZR 2102, Heidolph, Schwabach, Alemania), a temperatura ambiente (Figura 2.1). Una vez adicionadas las sales de hierro, la agitación se mantuvo durante otros 30 minutos. Los cloruros de hierro se hidrolizan y forman hidróxidos que, en presencia de iones amonio, coprecipitan formando magnetita. Las reacciones que se dan son las siguientes (Răcuciu 2009):



Tras la coprecipitación se obtuvo un precipitado negro, que se decantó con un imán y se lavó tres veces con agua desionizada y dos veces con tampón PBS (tampón fosfato salino 150 mM, pH 7,4). Todas las disoluciones empleadas para la síntesis de MNPs se realizaron con agua ultrapura (Milli Q) y se burbujearon continuamente con  $\text{N}_2$  para desplazar el aire disuelto.



**Figura 2.1:** Montaje experimental empleado en el laboratorio para la síntesis de MNPs. El  $\text{N}_2$  se burbujea en todo momento en las disoluciones de los cloruros de hierro y de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . La bomba peristáltica añade gota a gota los cloruros sobre el  $\text{NH}_4\text{OH}$ , mientras esta disolución se agita mecánicamente. Tomado de Cruz-Izquierdo (2013).

Las MNPs obtenidas presentan grupos -OH superficiales (MNP-OH) (Liu *et al.* 2002; Shen *et al.* 2004). Para su funcionalización las MNP-OH (300 mg) se incubaron durante 24 h con 3-aminopropiltriétoxilano (APTS, 2% v/v) a 70°C y 200 rpm, obteniéndose MNPs que ahora presentan grupos amino superficiales (MNP-NH<sub>2</sub>) (Cruz-Izquierdo *et al.* 2012).

La concentración de MNPs se calculó secando al vacío un volumen conocido de las mismas, en un equipo Savant (Automatic Environmental SpeedVac Apparatus). Las MNPs se almacenaron en PBS a 4°C hasta su utilización.

## 2.3. Caracterización de las MNPs

### 2.3.1. Caracterización morfológica

La caracterización cristalográfica y la identificación de su composición química 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. Esto es válido para tamaños de cristalito inferiores a 1  $\mu\text{m}$ , es decir, cuando la anchura a media altura de los máximos de difracción es significativamente mayor que la anchura instrumental. La ecuación de Scherrer relaciona el ensanchamiento neto del pico de difracción ( $\beta$ ) con el tamaño de cristalito ( $D$ ) según la ecuación:

$$D = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta}$$

donde la constante  $K$  toma el valor de 0,89 al considerarse las partículas teóricamente esféricas;  $\lambda$  es la longitud de onda de la radiación X utilizada (1,5418 Å);  $\beta$  es el ensanchamiento neto del pico de difracción (expresado en radianes  $2\theta$ ) y que puede determinarse a partir de:

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

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

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

Por otra parte, se comprobó el tamaño y forma de las MNPs mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), en un microscopio JEOL 1010 (Peabody, MA, USA) y mediante DLS (*Dynamic Light Scattering*) utilizando un equipo ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido).

### 2.3.2. Caracterización magnética

Para la caracterización magnética de las MNPs se realizaron ciclos de magnetización a temperatura ambiente, mediante magnetometría de muestra vibrante (VSM), en un electroimán hasta campos moderados (1,8 T). Mediante estos ciclos de magnetización se obtuvieron los valores de saturación magnética ( $M_s$ ), coercitividad ( $H_c$ ) y remanencia ( $M_R$ ) para cada tipo de nanopartículas.

#### 2.3.2.1. Tamaño del núcleo magnético

Se obtuvo una aproximación del tamaño del núcleo magnético de las MNPs a través de los resultados de las curvas de magnetización. Para ello, se emplearon las ecuaciones de Langevin con un ajuste a partir del modelo superparamagnético no interaccionante. La expresión aplicable a nuestro caso (partículas con la imanación espontánea relajada térmicamente) es la siguiente:

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

donde  $f(D)$  es la distribución de diámetros de la población de partículas, siendo una función del tipo log-normal;  $M_s$  (emu/g) imanación de saturación macroscópica;  $M_s$  ( $Am^{-1}$ ) la imanación de la partícula;  $\mu_0$  la permeabilidad magnética en el vacío; y  $k_B$  la constante de Boltzmann. El volumen crítico  $V$  es dependiente de la temperatura y está dado por:

$$V_c = \frac{25k_B T}{K}$$

donde  $K$  es la constante de anisotropía efectiva.

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

### 2.3.3. Estabilidad

La estabilidad de las MNPs en un coloide se determinó mediante el análisis del potencial Zeta ( $\xi$ ). Este parámetro mide el potencial electrostático que existe en el plano de corte de una partícula y está relacionado tanto con la carga superficial como con el entorno local de la partícula. El potencial Zeta ( $\xi$ ) se determinó con un equipo ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Las mediciones se llevaron a cabo a 25°C utilizando cubetas tipo “Folded Capillary cell” (DTS 1060), suspendiendo una concentración de 50  $\mu\text{g}$  de MNPs por ml de agua destilada.

El potencial Zeta ( $\xi$ ) se calculó automáticamente a partir de la movilidad electroforética basada en la ecuación de Smoluchowski:

$$v = (\epsilon E / \eta) \xi$$

donde  $v$  es la velocidad electroforética medida;  $\eta$  es la viscosidad;  $\epsilon$  es la permitividad eléctrica de la solución electrolítica y  $E$  es el campo eléctrico (Zhang *et al.* 2008).

## 2.4. Inmovilización de CALB a MNPs

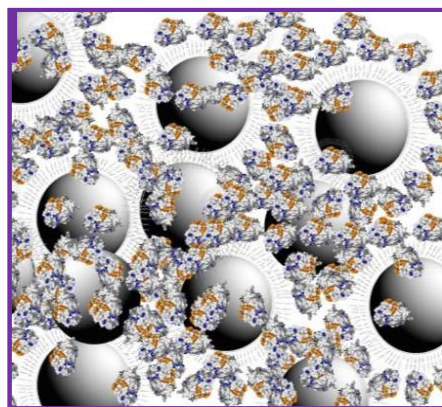
La inmovilización de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) a MNPs funcionalizadas con grupos amino (MNP-NH<sub>2</sub>) se realizó por enlaces covalentes formando agregados enzimáticos entrecruzados (Cross-Linked Enzyme Aggregates, CLEA).



La inmovilización se efectuó a temperatura ambiente mediante la adición de 28 ml de sulfato amónico (3,6 M) a 3 ml de MNPs con grupos amino (20 mg) y CALB (2 mg). Tras 5 min en agitación giratoria a 30 rpm (Intelli-Mixer RM-2), se añadió glutaraldehído (2,5 ml, 2,5 M) y se incubó la prearación durante 24 h con la misma agitación. Trascurrido este tiempo, las mCLEAs se lavaron 3 veces con PBS, empleando un imán (Cruz-Izquierdo *et al.* 2014).

Al termino de la inmovilización, con el propósito de reducir las bases de Schiff formadas y los grupos aldehído que pudieran quedar libres, se incubó la preparación durante 2 h con  $\text{NaBH}_4$  (1 mg/ml) en tampón carbonato-bicarbonato (100 mM, pH 10). Con el fin de eliminar interacciones inespecíficas, se realizaron diferentes lavados de manera consecutiva con NaCl (2 M) y Triton X-100 (1%, v/v) (Mateo *et al.* 2000).

Entre las diferentes etapas de inmovilización, para eliminar el reactivo sobrante y el posible enzima no inmovilizado, las mCLEAs se lavaron con tampón PBS 3 veces durante 10 min. Todo el proceso de inmovilización se realizó con agitación giratoria a 30 rpm (Intelli-Mixer RM-2) y a temperatura ambiente, siendo en cada lavado el volumen final de 1 ml por cada 2 mg de MNPs.



**Figura 2.2: Simulación gráfica del complejo obtenido.** La ilustración muestra un modelo hipotético de las CLEAs magnéticas simulando un plano transversal del complejo tridimensional. El diámetro de las MNPs es de 10 nm, y CALB mide 3 nm x 4 nm x 5 nm (Uppenberg *et al.* 1995). Tomado de Cruz-Izquierdo (2013).

### 2.4.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE

Se siguió la obtención de las mCLEAs analizando muestras de la fase líquida en cada etapa de la inmovilización. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida que se analizaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE según Laemmli (1970). Para ello se emplearon geles de 1 mm de espesor con 12% (p/v) de acrilamida en el gel separador y 4% (p/v) en el concentrador. El tampón de electrodos [Tris 3,03% (p/v), glicina 14,4% (p/v), SDS 1% (p/v), pH 8,7] se preparó 10 veces concentrado y se almacenó a temperatura ambiente. El tampón de muestra [12,5% (v/v) Tris-HCl 6,2 mM, pH 6,7, 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS y 2% (v/v) de azul de bromofenol al 0,5% (p/v)] se suplementó con 2-mercaptoetanol en relación 1:19 (v/v) antes de su uso y se añadió a la muestra en una proporción 1:1 (v/v). En todos los geles se incluyó una calle en la que se analizó una mezcla de proteínas patrón de baja masa molecular (Precision Protein Standards, Bio-Rad, Hercules, PA, EEUU). Las condiciones empleadas para la separación electroforética fueron 60 V durante 30 min, seguidas de 100 V durante 90 min. Se empleó una fuente de alimentación *Power Pac 300* de Bio-Rad (Hercules, PA, EEUU). Las electroforesis se llevaron a cabo empleando una cubeta Mini-PROTEAN 3<sup>®</sup> de Bio-Rad (Hercules, PA, EEUU) (Cruz-Izquierdo 2013).

Posteriormente, tras finalizar la electroforesis, los geles se revelaron con tinción de plata (*Silver Stain Plus*, Bio-Rad, Hercules, PA, EEUU).

### 2.4.2. Escalado en la obtención de mCLEAs

Ante la necesidad de disponer de mayor cantidad de mCLEAs para producir mayor volumen de biodiésel, se realizó un salto de escala en la obtención de mCLEAs.

La inmovilización se efectuó incrementando de manera proporcional los volúmenes y cantidades anteriormente descritos, obteniéndose, al final del proceso, 1 g de mCLEAs. Todo el proceso de inmovilización se realizó con agitación orbital a 150 rpm y a temperatura ambiente. En todo momento el volumen fue de 500 ml por g de MNPs.

Las mCLEAs obtenidas se caracterizaron morfológica y magnéticamente, analizándose posteriormente su actividad esterasa y de transesterificación de aceites según se describe a continuación. Los resultados se compararon con los obtenidos con mCLEAs obtenidas a menor escala.

## **2.5. Caracterización de las mCLEAs**

Inicialmente, se comprobó que tras la inmovilización los complejos mantenían las características superparamagnéticas. Para ello se sometieron las mCLEAs a sucesivos ciclos de magnetización de la misma forma que anteriormente habían experimentado las MNPs.

### **2.5.1. Caracterización morfológica**

Se estudió el tamaño y forma de las mCLEAs de CALB mediante análisis de las fotografías obtenidas con un microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL 7000 F (Peabody, MA, USA).

Asimismo, se analizó el tamaño del complejo mCLEAs por DLS mediante un equipo ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Las mediciones se llevaron a cabo a 30°C utilizando cubetas de cuarzo de 4 ml, suspendiendo 50 µg de mCLEAs por ml de agua destilada.

### 2.5.2. Análisis elemental

Para el análisis elemental se empleó un equipo Euro EA Elemental Analyzer (CHNS) de la casa EuroVector, perteneciente a los Servicios Generales de Investigación SGIKER de la Universidad del País Vasco. Los elementos analizados fueron carbono, hidrógeno y nitrógeno (el límite de cuantificación fue del 0,1%).

### 2.5.3. Determinación de la actividad enzimática

Para comprobar la actividad del biocatalizador inmovilizado se analizó su actividad enzimática, tanto hidrolítica (actividad esterasa), como biosintética (transesterificación de aceite).

#### 2.5.3.1. Actividad esterasa

La actividad inicial de CALB, soluble e inmovilizada en mCLEAs, se analizó midiendo la hidrólisis de *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA) (Cruz-Izquierdo *et al.* 2014). Específicamente, se añadió lipasa soluble (1  $\mu\text{g}$  proteína de preparación comercial) o inmovilizada (10  $\mu\text{g}$  preparación de biocatalizador) a una mezcla de reacción que contenía 10  $\mu\text{l}$  de *p*-NPA (100 mM en DMSO) en 980 ml de PBS (pH 7,4). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min a 30 rpm con agitación rotatoria (RM2 Intelli-Mixer, Elmi Ltd., Riga, Letonia). Se retiraron alícuotas cada 5 min y la aparición de *p*-nitrofenol (*p*-NP) se midió espectrofotométricamente (Beckman Coulter DU 800, Brea, CA, EE.UU.) a 405 nm. La actividad se determinó a partir de la pendiente de absorbancia para el *p*-NP empleando el coeficiente de extinción molar determinado empíricamente ( $\epsilon=9,43 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1  $\mu\text{mol}$  de *p*NPA por minuto en las condiciones de ensayo.

Para el enzima inmovilizado la actividad específica se expresó por mg de catalizador magnético (U/mg catalizador).

### 2.5.3.2. Transesterificación de aceite

Se comprobó la capacidad del biocatalizador para transesterificar aceite de oliva incubando las mCLEAs (1%, p/p) con aceite (0,2 g) y 2-propanol (relación molar, alcohol:aceite, 6:1). La reacción se mantuvo a 40°C y 30 rpm con agitación rotatoria. La velocidad de reacción inicial para la producción de biodiésel se evaluó a partir de alícuotas (5  $\mu$ l) retiradas de la fase líquida a intervalos definidos, que más tarde se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), como se indica a continuación. La actividad de transesterificación se expresó como porcentaje de aceite transformado en biodiésel (FAPes) por hora (Picó *et al.* 2017).

## 2.6. Cultivo de las microalgas

En este trabajo se ha empleado biomasa de las microalgas *Chlorella vulgaris* var L3 y *Scenedesmus* sp. Estas microalgas se cultivaron en el centro asociado NEIKER, de acuerdo con Ikarán *et al.* (2015), usando nitrato sódico 6 mM como única fuente de nitrógeno. Tras agotar el nitrógeno, los cultivos se incubaron en las mismas condiciones durante 7 días más hasta obtener células deficientes en nitrógeno.

Finalmente, la biomasa microalgal se cosechó por centrifugación y se secó en estufa. El factor potencial de los lípidos para obtener biodiésel a partir de la biomasa microalgal se estimó por el centro asociado CENER, de acuerdo con el método de Lepage y Roy (1984).

## 2.7. Extracción lipídica

A lo largo de este trabajo el centro asociado CENER desarrolló diferentes modos de extracción de los lípidos de la biomasa microalgal, como se resume a continuación.

### 2.7.1. Extracción Soxhlet

Se deslipidizó la biomasa seca de *C. vulgaris* (70 g) en un equipo tipo Soxhlet, utilizando cartuchos de 123 x 43 mm, según UNE-EN-ISO 659(2010). La primera extracción se realizó durante 14 h usando *n*-hexano como disolvente en una proporción de 10 ml de *n*-hexano por g de muestra.

Debido a lo compacto de la muestra, se realizaron otras dos extracciones durante 15 h cada una. Para ello, se utilizó como disolvente una mezcla de cloroformo:metanol (2:1, v/v). Previamente se trituró la muestra seca para facilitar la extracción con el disolvente.

Los lípidos extraídos (denominados “Aceite 1”) mostraban una consistencia bastante sólida, debido a la presencia de lípidos complejos (principalmente fosfolípidos y glicolípidos) junto con otros lípidos simples.

El obligado uso de disolvente tóxicos, así como las más de 40 h que se necesitaban para la extracción completa de los lípidos, aconsejó desestimar este método de extracción.

Con el fin de mejorar la extracción, se optimizó en un equipo Soxhtec (Soxtec™ Auto Fat Extraction System, FOSS Analytical, Hilleroed, Denmark) el tiempo de extracción (8 ó 16 h), así como la cantidad necesaria de disolvente binario cloroformo:metanol (2:1, v/v) por muestra (40 ml por 1-5 g de muestra) (Picó *et al.* 2017).

### 2.7.2. Extracción en matraz agitado

Debido a lo compacto de la muestra, se estudió la extracción de la biomasa microalgal por agitación continua en un matraz.

La biomasa de *C. vulgaris*, deslipidizada con *n*-hexano, se trituró y homogeneizó antes de realizar el ensayo en matraz agitado. El matraz, provisto con un

condensador de reflujo, se calentó durante 30 min a 72°C, y se agitó magnéticamente a 420 rpm. Se utilizó una proporción de 75 mg de muestra por ml del disolvente binario cloroformo:metanol (2:1, v/v). El extracto se filtró al vacío (para evaporar el disolvente del sedimento) y el filtrado se sometió a una segunda extracción en las mismas condiciones.

La muestra extraída (denominada “Aceite 2”) mostraba consistencia sólida, al igual que el “Aceite 1”, debido a la elevada presencia de lípidos insaponificables.

Aunque con esta técnica de extracción se acortaban los tiempos, la biomasa deslipidizada no podía utilizarse para obtener otros bioproductos por la elevada toxicidad de los disolventes empleados (Picó *et al.* 2017). Por ello, se decidió emplear un nuevo método de extracción.

### **2.7.3. Extracción con H<sub>2</sub>O subcrítica**

Por otra parte, el centro asociado TECNALIA, estudió la extracción de la biomasa de *C. vulgaris* con agua subcrítica. Para ello se utilizó agua a temperaturas entre 100 y 374°C y a presiones entre 10 y 60 bares para mantenerla en estado líquido. En estas condiciones la constante dieléctrica del agua disminuye considerablemente, comparándola con la misma a temperatura ambiente, y se acerca a la constante dieléctrica del etanol (disolvente orgánico tradicional en extracción). Este método de extracción ha sido utilizado en microalgas por Herrero *et al* (2005), quienes obtuvieron compuestos antioxidantes de *Spirulina platensis*.

Se estudiaron diferentes temperaturas y tiempos de extracción que dieron lugar a 3 muestras de consistencia sólida. La muestra 1 fue extraída a 175°C durante 60 min, mientras que las muestras 2 y 3 se extrajeron a 225°C durante 60 y 90 min, respectivamente.

Al igual que ocurría con los aceites obtenidos anteriormente, extraídos con disolventes orgánicos, la consistencia sólida del aceite dificultaba fijar las variables de la reacción de esterificación. Este aceite se denominó “Aceite 4”.

#### **2.7.4. Extracción mediante saponificación**

Se estudió la extracción de la biomasa de *C. vulgaris* mediante el método de saponificación según Grima *et al.* (1994). Este método permite obtener gran cantidad de lípidos de la biomasa, pero en forma de FFAs en vez de TAGs. En nuestro caso, debido al gran contenido de lípidos insaponificables que contenía la biomasa de *C. vulgaris*, este método se modificó aumentando el tiempo de extracción de 1 h hasta 3 h.

En resumen, la biomasa húmeda se saponificó con etanol a 65°C en presencia de KOH (30 ml de etanol y 0,2 g de KOH por g de biomasa). Después de 3 h de tratamiento, la fracción insaponificable se extrajo dos veces con *n*-hexano (100 ml cada vez) (Picó *et al.* 2017).

De la fracción saponificable se obtuvieron los ácidos grasos libres (FFAs) ajustando el pH a 3,5 con ácido sulfúrico. Finalmente, la preparación extraída de FFAs se lavó tres veces con *n*-hexano (100 ml cada vez) y se usó para obtener biodiésel por catálisis ácida y enzimática (Picó *et al.* 2017).

Debido a los buenos resultados obtenidos en esta extracción, también se empleó para extraer biomasa de *Scenedesmus* sp.

## **2.8. Aceites y FFAs empleados**

### **2.8.1. Aceites y FFAs originales**

Para la producción de biodiésel de cuarta generación se emplearon aceites microalgales que habían sido extraídos por diferentes métodos:



- “Aceite 1”: Aceite de consistencia sólida extraído de biomasa de *C. vulgaris* mediante una extracción de tipo Soxhlet.
- “Aceite 2”: Aceite de consistencia sólida extraído de biomasa de *C. vulgaris* con disolventes orgánicos en matraz agitado.
- “Aceite 3”: Cuyas características se indican a continuación.
- “Aceite 4”: Aceite de consistencia sólida extraído de biomasa de *C. vulgaris* con H<sub>2</sub>O subcrítica.

Cuando la extracción se modificó a una por saponificación, los productos extraídos eran FFAs en vez de triglicéridos. Mediante saponificación se obtuvieron dos mezclas de FFAs:

- “rcFFAs”: Mezcla de ácidos grasos obtenida de la saponificación de biomasa de *C. vulgaris*. Mezcla de consistencia líquida.
- “rsFFAs”: Mezcla de ácidos grasos obtenida de la saponificación de biomasa de *Scenedesmus sp.* Mezcla de consistencia líquida.

## 2.8.2. Aceites y FFAs modelo

Con el fin de disponer de suficiente cantidad de sustratos para realizar los experimentos, se diseñaron un aceite y unas mezclas de ácidos grasos modelo que se parecían en su composición al extraído de las microalgas. Estas mezclas fueron validadas comparando su conversión en biodiésel con muestras originales de FFAs.

### 2.8.2.1. “Aceite 3”

Para simular el aceite de *C. vulgaris* var L3 se mezclaron (en volumen) diferentes aceites, 80% de palma, 10% de soja y 10% de oliva.

### 2.8.2.2. Mezcla modelo de FFAs de *C. vulgaris* var L3

De igual modo, se obtuvo una mezcla modelo de FFAs (denominada mcFFAs), con una composición similar a la de *C. vulgaris* var L3, mezclando (en peso) 46,7% de linolénico, 28,2% de ácido palmítico, 22,3% de linoleico, y 2,8% de oleico, todos ellos obtenidos de fuentes comerciales (Figura 2.3) (Picó *et al.* 2017).

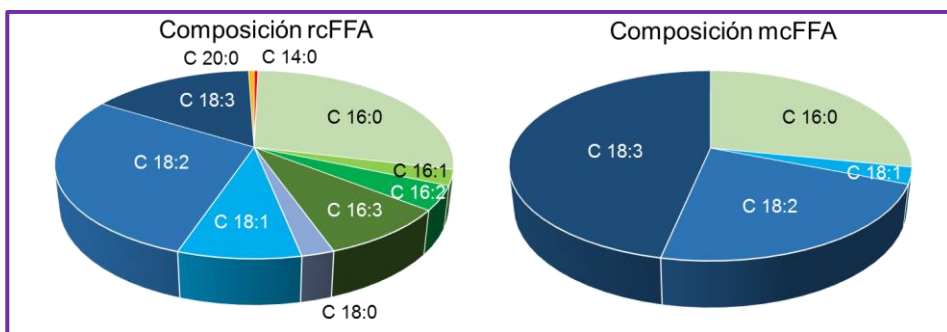


Figura 2.3: Composición de los ácidos grasos que componen la mezcla original (rcFFAs) y la mezcla modelo (mcFFAs).

### 2.8.2.3. Mezcla modelo de FFAs de *Scenedesmus* sp.

También se obtuvo una mezcla modelo de FFAs de *Scenedesmus* sp. con ácidos grasos comerciales, a partir de la composición determinada con anterioridad del contenido en ácidos grasos de dicha microalga. Esta mezcla consistió en 52,1% de oleico, 23,57% de palmítico, 12,4% de linoleico, 7,8% de linolénico y 4,1% de esteárico (Figura 2.4).

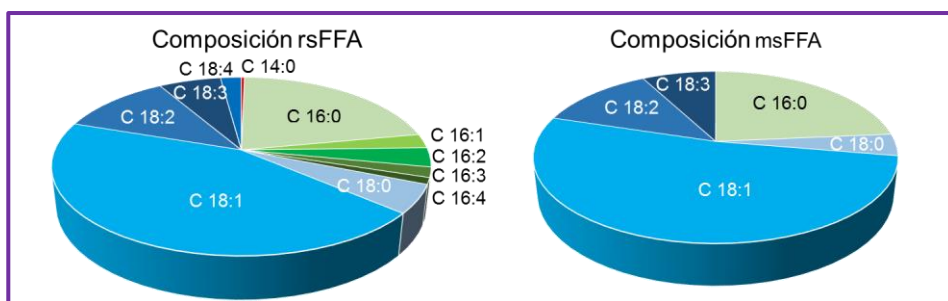


Figura 2.4: Composición de los ácidos grasos que componen la mezcla original (rsFFAs) y la mezcla modelo (msFFAs).

Además de estos aceites y mezclas de ácidos grasos, se utilizó como modelo aceite de oliva virgen extra (Carbonell®) obtenido en un comercio local.

## 2.9. Producción de biodiésel

La producción de biodiésel se realizó de manera paralela a la optimización de la extracción de lípidos y a la elección de la microalga a emplear. Por ello, las primeras pruebas se realizaron con aceites y FFAs de *C. vulgaris*, para después aplicar las mejores condiciones a los FFAs de *Scenedesmus* sp.

En este trabajo se comparó la obtención de biodiésel por catálisis enzimática y química. En el laboratorio de la UPV/EHU se empleó catálisis enzimática usando mCLEAs de CALB, mientras que en el centro asociado CENER emplearon catálisis ácida. Posteriormente, se compararon las conversiones finales y el grado de conversión obtenidos de cada ácido graso según cada tipo de catálisis. Por último, se puso en relieve las ventajas y desventajas de cada método.

### 2.9.1. Catálisis enzimática

La obtención enzimática de biodiésel está influenciada por diversos parámetros, como la temperatura, el uso de un co-disolvente en la reacción, el tipo de donador de grupo alquilo y su relación molar, el contenido en agua, el modo de agitación de la mezcla de reacción, así como la cantidad de enzima (biocatalizador:sustrato, p/p). Por ello, se estudiaron todas estas variables para optimizar de la producción de biodiésel.

#### 2.9.1.1. Reacciones de transesterificación

Las reacciones de transesterificación se realizaron mezclando aceite crudo de microalgas (30 mg, de los cuales el 50%, p/p son lípidos saponificables) con 400  $\mu$ l

de 2-propanol en una relación molar (alcohol:aceite) 6:1 establecida por trabajos previos de nuestro laboratorio.

A la mezcla de reacción se le añadió 100  $\mu\text{l}$  de *n*-hexano, debido a la alta viscosidad y a la dificultad para manipular estos aceites. Se eligió este co-disolvente, ya que las primeras muestras de aceites proporcionados por los centros colaboradores estaban disueltas en *n*-hexano.

Las mezclas de reacción se agitaron mecánicamente (en un brazo agitador ELMi, Intelli-Mixer RM-2L, Riga, Letonia) a temperaturas entre 30 y 40°C, iniciándose la reacción por la adición de las mCLEAs de CALB (1%, biocatalizador:aceite, p/p). Antes de cada reacción, las mCLEAs se lavaron con *n*-hexano.

La producción de biodiésel (ácidos grasos alquilados, FAAEs) se determinó mediante cromatografía en capa delgada (TLC), tomando alícuotas (5  $\mu\text{l}$ ) a intervalos de tiempo definidos hasta las 42 h de reacción.

La adición de *n*-hexano permitió añadir el donador de alquilo en la relación molar deseada. Sin embargo, la alta volatilidad del disolvente provocaba errores metodológicos. Debido a esto, y con el fin de obtener volúmenes de reacción que permitiesen mantener las mCLEAs en suspensión, se sustituyó el *n*-hexano por el propio alcohol, actuando así éste como disolvente y como donador de grupos alquilo. Debido a ello, se aumentó la relación molar alcohol:aceite hasta valores de 30:1, manteniendo de este modo el mismo exceso con respecto a la relación estequiométrica.

#### *a) Efecto de la temperatura y relación molar*

Antes de abandonar el uso de *n*-hexano como co-disolvente, se determinó la relación molar y la temperatura óptima de la reacción, utilizando aceite de oliva como sustrato modelo.

La estequiometría de la producción de biodiésel requiere un mínimo de 3 mol de donador de grupos alquilo por cada mol de triglicérido, por lo que se decidió utilizar múltiplos de esta proporción para estudiar de la relación molar óptima. La mezcla de reacción estaba compuesta por aceite de oliva (200 mg) y el donador de grupo alquilo (etanol, metanol o 2-propanol) en una relación molar (alcohol:aceite) 3:1, 6:1, 9:1 y 12:1. En estas reacciones no era necesario emplear *n*-hexano, ya que la consistencia del aceite era líquida.

Las reacciones se agitaron mecánicamente a 30 rpm (en un brazo agitador ELMI, Intelli-Mixer RM-2L, Riga, Letonia) a temperaturas entre 30 y 60°C, y se iniciaron por adición de 2 mg de mCLEAs de CALB (1%, p/p). Antes de cada reacción, las mCLEAs se lavaron con el mismo alcohol con el que iban a incubarse más tarde.

La producción de biodiésel (ácidos grasos alquilados, FAAEs) se determinó mediante HPLC, tomando alícuotas (5 µl) a intervalos de tiempo definidos hasta las 24 h de reacción.

### *b) Escalado en la producción de biodiésel*

Después de optimizar los factores de la reacción, se realizó el salto de escala a 5 ml, 50 ml, 100 ml y 500 ml, utilizando aceite de oliva como sustrato modelo. Se empleó tanto agitación magnética como orbital. La temperatura se ajustó a 30°C mediante contacto físico en una placa calefactora del equipo Carousel 12 Plus (Radleys, Essex, Reino Unido), o mediante una atmósfera atemperada en un incubador orbital (Kuhner ISF1-X, Birsfelden, Suiza).

Durante el escalado se estudió el modo de agitación, la temperatura óptima, la cantidad de mCLEAs y la presencia de agua en la mezcla de reacción. Por otra parte, se estudió la adición paulatina de metanol a la mezcla de reacción y los efectos que el metanol tenía sobre el biocatalizador y sobre la evolución de la catálisis.

*c) Estudio de la cantidad de mCLEAs*

Se estudió la concentración más adecuada de biocatalizador analizando la velocidad de conversión, así como la conversión final de reacción, según la cantidad de mCLEAs 0,1%, 0,15%, 0,2%, 0,25% y 0,5% (mCLEAs:aceite, p/p).

Se emplearon diferentes cantidades de mCLEAs en relación a la cantidad de aceite en la reacción de transesterificación, considerando como catalizador a todo el complejo magnético, no solamente a la lipasa inmovilizada.

*d) Estudio del efecto del metanol*

Una de las estrategias para evitar la inactivación de la lipasa por un exceso de metanol es la adición de éste de forma escalonada. Se estudió la evolución de la reacción mediante la adición de diferentes proporciones de metanol (6,9%, 13,7% y 20,65%, v/v) a las 42 h de reacción.

También se estudió el efecto del metanol sobre las mCLEAs. Por esto, se incubó 40 mg de mCLEAs (0,2%, p/p) con diferentes proporciones de metanol (0%, 5%, 10%, 15%, 25%, 50%, 75%, 100%, v/v, con t-butanol) durante diferentes tiempos (0, 15 y 60 min y 24 h). Tras la preincubación se inició la reacción a 30°C con agitación orbital y empleando aceite de oliva y metanol en una relación molar (alcohol:aceite) 6:1, y t-butanol hasta un volumen de 100 ml.

Por último, se estudió la concentración óptima de metanol en la mezcla de reacción. Para ello, se emplearon diferentes proporciones de metanol en detrimento de t-butanol desde 0% hasta 55% (v/v) en la mezcla de reacción. La reacción se incubó a 30°C con agitación robital (150 rpm).

*e) Estudio de la presencia de H<sub>2</sub>O*

En aceites que presentan pequeñas proporciones de agua, la reacción de esterificación se ve dificultada. Por ello, se decidió estudiar el efecto que produce

la presencia de agua en la reacción y analizar cómo afecta a la conversión final y a las mCLEAs.

Se estudió la conversión en biodiésel de mezclas de reacción que contenían diferentes proporciones de agua (0,1%, 0,5%, 1%, 2% y 5%, p/p) y se comparó la conversión final con una reacción control, que contenía una presencia mínima de agua. También se incluyó una reacción en la que se había eliminado toda la humedad después de incubar, durante 24 h, todos los componentes de la reacción con desecadores moleculares (Molecular Sieves).

#### *f) Estudio del modo de agitación*

Se comparó la agitación magnética de un equipo Radleys con la agitación orbital propia del incubador donde se realizaban las reacciones. Para ello, se seleccionó inicialmente una velocidad orbital de 150 rpm, ya que la turbulencia de la mezcla se parecía a la conseguida con agitación magnética.

Posteriormente, se estudió la velocidad orbital óptima desde un sistema poco agitado (100 rpm) hasta un sistema con una elevada agitación (250 rpm). La mezcla de reacción contenía aceite de oliva, metanol en una relación molar (alcohol:aceite) 6:1 y *t*-butanol hasta un volumen de 50 ml. La incubación se mantuvo a 30°C.

#### **2.9.1.2. Reacciones de esterificación**

Ante el cambio de sustrato, FFAs en vez de TAGs, fue necesario ajustar algunas condiciones de la reacción. La estequiometría de la reacción cambió, ya que para esterificar FFAs se necesita un mol de alcohol por mol de ácido graso. Por ello, en las reacciones de esterificación se utilizó una relación molar (alcohol:FFAs) 10:1, proporcional a la relación 30:1 usada para aceites.

*a) Efecto de la temperatura*

Se estudió la velocidad de reacción así como la estabilidad del complejo a diferentes temperaturas (de 30°C a 50°C). Para determinar la temperatura óptima de reacción se utilizaron etanol ó 2-propanol como donador de grupo alquilo en una relación molar (alcohol:FFAs) 10:1 y una preparación de mcFFAs. La mezcla de reacción se incubó a la temperatura deseada y se agitó continuamente por agitación mecánica. Se retiraron alícuotas a 1, 3 y 24 h de reacción y se analizó la conversión a ésteres mediante HPLC.

*b) Estudio del donador de grupos alquilo*

La reacción de transesterificación enzimática se llevó a cabo usando mCLEAs de CALB como catalizador en presencia de varios alcoholes (metanol, etanol y 2-propanol) como donador de grupos alquilo, en una relación molar (alcohol:FFAs) 10:1. La mezcla de reacción se incubó a 30°C y se agitó continuamente por agitación mecánica. Se retiraron alícuotas a 1, 2, 3 y 24 h de reacción y se analizó la conversión a ésteres mediante HPLC. Las mCLEAs se lavaron con el alcohol correspondiente antes de iniciar la reacción.

*c) Estudio del modo de agitación*

Debido a la inmiscibilidad de los FFAs y el alcohol, se estudió con detalle el efecto de la agitación en la mezcla de reacción, ya que, al tratarse de una catálisis heterogénea, hay disminuir las limitaciones difusionales en el seno del líquido.

Se estudió el efecto de una agitación mecánica giratoria (a 30 rpm) en un brazo agitador (ELMI, Intelli-Mixer, RM-2L), una agitación mediante ultrasonidos en un sonorreactor (Hielscher UTR200, Teltow, Alemania) a 24 kHz de frecuencia y 100 W de potencia en continuo, y, por último, una agitación magnética en un Carousel 12 Plus (Radleys, Essex, Reino Unido).



La mezcla de reacción, msFFAs con etanol como donador de grupos alquilo en una relación molar (alcohol:FFAs) 10:1, se incubó a 30°C durante 5 h y se agitó según los 3 modos anteriormente mencionados. Se retiraron alícuotas a 5, 15, y 30 min y 1, 2, 3 y 5 h de reacción y se analizó la conversión a ésteres mediante HPLC. Las mCLEAs se lavaron con etanol antes de iniciar la reacción.

Se analizaron por separado los 3 ácidos grasos/ésteres mayoritarios de msFFAs: oleico, linoleico y linolénico, por si hubiera alguna diferencia en la velocidad de conversión de cada uno.

Posteriormente, se estudió el efecto sobre las mCLEAs del uso de ultrasonidos durante 1 min antes de iniciar la incubación de la mezcla de reacción.

#### *d) Estudio de la relación molar alcohol:FFAs*

Se estudió la relación molar alcohol:FFAs, ya que ésta influye en la velocidad de reacción así como en la estabilización del complejo. La reacción de los primeros aceites se llevó a cabo en una relación 6:1 (alcohol:aceite), debido a que eran las mejores condiciones experimentales en estudios anteriores del Grupo. Posteriormente, empleando el alcohol tanto como disolvente como donador de alquilos, se trabajó con una relación 30:1 (alcohol:aceite) en las reacciones de transesterificación de aceites y proporcionalmente 10:1 (alcohol:FFAs) en las reacciones de esterificación de FFAs.

Debido a la presencia de t-butanol como co-disolvente en la mezcla de reacción, debía ajustarse la relación entre el alcohol y los FFAs. Para ello, se estudió la velocidad inicial de la reacción con etanol y metanol a relaciones molares de 0,5:1, 1:1, 3:1 y 6:1 (alcohol:FFAs) utilizando msFFAs como sustrato. También se estudió la conversión total al cabo de 24 h en una reacción incubada a 30°C y con agitación mecánica (30 rpm).

### e) Cantidad de mCLEAs

Otro factor importante en la producción de biodiésel es la cantidad de catalizador utilizado. Por ello, se emplearon diferentes cantidades de mCLEAs en relación a la cantidad de FFAs en la reacción de esterificación.

Hasta ahora se había utilizado una concentración de biocatalizador de 1% (mCLEAs:FFAs, p/p), si bien al realizar el escalado fue necesario reajustar esta relación.

Así se estudió la conversión en biodiésel con diferentes cantidades de biocatalizador (0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8% y 1%, p/p) en una mezcla de reacción que contenía msFFAs, metanol en una relación molar (alcohol:FFAs) 3:1 y t-butanol hasta un volumen de 50 ml. La incubación se mantuvo a 30°C con agitación magnética.

### 2.9.2. Catálisis ácida

En el centro asociado CENER se estudió la conversión a ésteres usando catálisis ácida. Para ello, 0,5 g de la biomasa de rcFFAs se depositaron en un matraz aforado de 250 ml que contenía 20 ml de cloruro de acetilo:metanol (5:95, v/v). El matraz, equipado con un condensador de reflujo, se agitó magnéticamente a 100°C durante 1 h. Después de enfriar, se realizaron dos extracciones del biodiésel con 5 ml de *n*-hexano y 10 ml de NaCl (0,5%, p/v). El biodiésel obtenido por catálisis química sólo se obtuvo empleando como sustrato preparaciones de rcFFAs y rsFFAs, y finalmente se analizó por cromatografía de gases (GC) (Picó *et al.* 2017).

## 2.10. Estabilidad y reutilización de las mCLEAs

Se estudió la estabilidad de las mCLEAs de CALB reutilizando el biocatalizador en una sucesión de entre 10 y 50 ciclos de reacción, con diferentes modos de agitación (mecánica y por ultrasonidos).

El estudio se realizó con etanol o metanol como donador de grupos alquilo y con *t*-butanol (o sin él) como co-disolvente. En cada ciclo catalítico se determinó la conversión final al cabo de 24 h de reacción (para el caso de la agitación mecánica), y de 3 h (para la agitación por ultrasonidos). En esta última también se estudió la actividad esterasa al finalizar cada ciclo.

### 2.10.1. Efecto de los lavados sobre las mCLEAs

Antes de cada utilización, las mCLEAs se lavaron 3 veces con el disolvente utilizado en la mezcla de reacción. Debido a esto, se estudió el efecto de estos lavados sobre el biocatalizador.

Se emplearon como disolvente en la reacción metanol y etanol, así como *t*-butanol. El *t*-butanol se empleó en la producción de biodiésel debido a que es un alcohol terciario que no actúa como donador de grupos alquilo, y, además, no afecta a la actividad ni a la estabilidad del biocatalizador (Du *et al.* 2007; Halim y Kamaruddin 2008; Türkan y Kalay 2008).

Las mCLEAs se lavaron con *t*-butanol o metanol/etanol antes de su primer uso, así como en su reutilización en los consecutivos ciclos catalíticos. Después se ensayaron las reacciones de esterificación con msFFAs y con metanol/etanol como donador de grupo alquilo en una relación molar (alcohol:FFAs) 10:1. La mezcla de reacción se incubó durante 3 h a 30°C con agitación mecánica.

### 2.10.2. Efecto del alcohol sobre las mCLEAs

Para determinar si la concentración del alcohol (metanol o etanol) presente en la mezcla de reacción afectaba a la agregación de las mCLEAs, se estudió el tamaño de los agregados de mCLEAs mediante DLS (*Dynamic Light Scattering*) en un equipo ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido).

Las mCLEAs se incubaron con diferentes diluciones de alcohol (de 0 a 60%, v/v, en agua) durante 1 h con agitación mecánica a 30°C. Después se analizó por DLS la distribución de tamaños de los agregados resultantes, utilizando cubetas de cuarzo de 4 ml con una concentración de 10 µg de mCLEAs por ml de mezcla agua/alcohol.

### 2.10.3. Estabilidad en disolventes orgánicos

Las mCLEAs (2 mg) se incubaron durante 48 h en presencia de 1,4 butanodiol, n-hexano, 2-butanol, acetona, t-butanol, tolueno, cloroformo, alcohol isoamílico, etanol, acetonitrilo, 2-propanol, diclorometano, 2-metil-2-butanol, THF, acetato de etilo, etilenglicol, DMSO, DMF o metanol. Se realizó también una incubación con PBS como control.

Después de incubar con los disolventes, el biocatalizador se lavó 3 veces durante 10 min con PBS y se determinó espectrofotométricamente la actividad esterasa con *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA) como sustrato (Gao *et al.* 2004).

Por otro lado, se determinó la actividad biosintética siguiendo la conversión de ácidos grasos (mCFFAs) en biodiésel, utilizando etanol como donador de grupos alquilo en una relación molar (alcohol:FFAs) 10:1. La reacción se mantuvo a 30°C y 30 rpm con agitación mecánica. Al cabo de 24 h se estimó la conversión resultante mediante HPLC como se indica a continuación.

Posteriormente, se eligieron para realizar un estudio más detallado los 4 disolventes que mejor resultado presentaron en las dos actividades. Para la elección del disolvente idóneo en la reacción se compararon sus características más importantes para la producción de biodiésel, como su coste económico, punto de ebullición, toxicidad y, por último, su viscosidad.

## 2.11. Métodos analíticos

Se determinó la conversión de aceites o FFAs y la producción de ésteres alquilados de ácidos grasos (FAAEs) a lo largo del tiempo, tomando alícuotas (5 µl) a intervalos definidos.

### 2.11.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Las reacciones de conversión a ésteres de las mezclas mcFFAs y msFFAs, así como las llevadas a cabo a partir de aceite de oliva (control), se evaluaron por cromatografía líquida de alta resolución (*High-performance liquid chromatography*, HPLC) como describen Holčapek *et al.* (1999).

Para ello, se empleó un equipo compuesto por 2 bombas Waters™ 510, un inyector automático Waters™ 717, un detector de diodos Waters™ 996, una estación de trabajo Waters™ Millennium 2010 v.2.10 (Waters™ Corporation, Milford, MA, EEUU) y una columna Tracer Lichrosorb RP18, 250 mm × 4 mm ID, de 10 µm de tamaño de partícula y 100 Å de diámetro de poro.

Para el análisis de las mezclas de FFAs se inyectaron 10 µl por muestra a un caudal de 1 ml/min. La bomba A suministraba una mezcla de acetonitrilo:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), y la bomba B metanol puro. Se usó rutinariamente un gradiente lineal de 20 min, desde 25% A + 75% B hasta 100% B. Los compuestos se detectaron siguiendo la absorbancia a 205 nm a temperatura ambiente. El análisis cuantitativo se realizó

a partir de una calibración realizada con patrones de los correspondientes FFAs y ésteres metílicos/etílicos en concentraciones conocidas.

Para las muestras de aceite de oliva se inyectaron 10  $\mu$ l por muestra a un flujo de 1 ml/min. La bomba A impulsaba metanol y la B una mezcla binaria de 2-propanol:n-hexano (5:4, v/v). Se empleó un gradiente lineal desde 100% de A al 50% A + 50% B en 25 min. Los compuestos se detectaron siguiendo la absorbancia a 205 nm. Los patrones de elución de los diferentes componentes se corresponden con los ya publicados (Holčapek *et al.* 1999; Chen y Wu 2003; Türkan y Kalay 2006). El análisis cuantitativo se realizó a partir de una calibración con patrones de los correspondientes TAGs y ésteres etílicos en concentraciones conocidas.

### **2.11.2. Cromatografía en capa delgada (TLC)**

El progreso de la reacción de conversión a ésteres de los aceites crudos, “Aceite 1”, “Aceite 2”, Aceite 3” y “Aceite 4”, así como las preparaciones de ácidos grasos rFFAs y rsFFAs, se evaluó semicuantitativamente por cromatografía en capa delgada (*Thin layer chromatography*, TLC).

Las placas revestidas con gel de sílice 60 (Merck, Darmstadt, Alemania) se activaron a 100°C durante 30 min y se cargaron 0,5  $\mu$ l de muestra en cada calle. La fase móvil fue n-hexano:acetato de etilo:ácido acético (90:10:1, v/v/v) (Samukawa *et al.* 2000).

Después de la separación cromatográfica (aproximadamente 40 min), las placas de TLC se secaron a temperatura ambiente y tiñeron por inmersión durante 1 min en una cubeta con Coomassie Blue R-350 al 0,02% (p/v) en metanol:ácido acético:H<sub>2</sub>O (3:1:6, v/v/v). Diferentes manchas fueron visibles en cuestión de segundos y se identificaron de acuerdo con Shah *et al.* (2004).

Posteriormente, la naturaleza química del compuesto responsable de las manchas se confirmó por análisis por HPLC.

### 2.11.3. Cromatografía de gases (GC)

El progreso de la reacción de conversión de rcFFAs, mcFFAs, rsFFAs y msFFAs se evaluó por cromatografía de gases (*Gas chromatography*, GC). Las reacciones que se analizaron habían sido catalizadas bien enzimáticamente o por catálisis ácida.

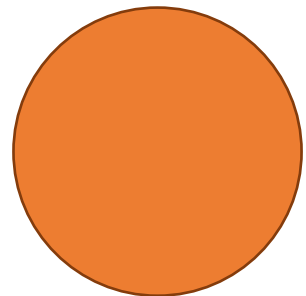
A todas las muestras se les añadió heptadecanoato de metilo en *n*-hexano (0,01 g/ml por 2 ml) como patrón interno, antes de la cuantificación de ésteres metílicos y etílicos. Para el análisis se empleó un equipo Agilent 7693A con una columna capilar DB-23 de 60 m (Agilent 123-2362) a 200°C bajo condiciones isotérmicas.





# Capítulo III

## Obtención de mCLEAs





# 1. INTRODUCCIÓN

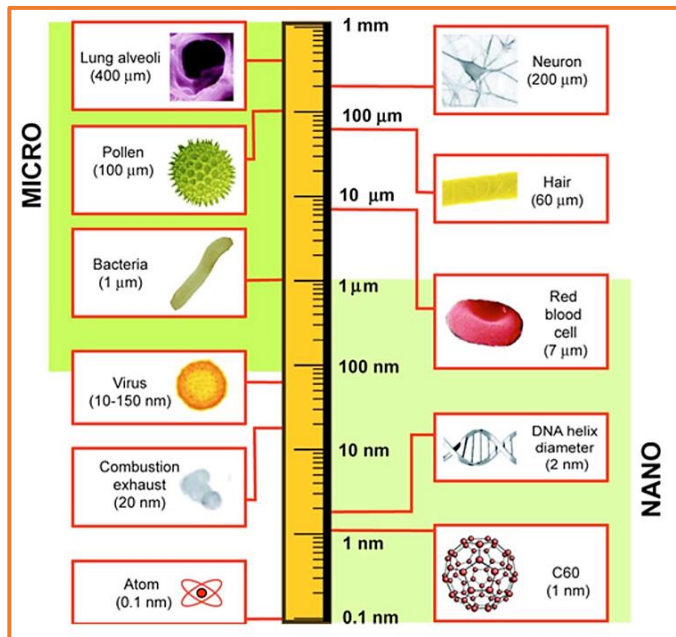
## 1.1. Nanotecnología

La nanotecnología es el campo de estudio que diseña y sintetiza materiales y dispositivos cuyo tamaño y forma corresponde a la escala nanométrica (Farhang 2007). El término fue acuñado por Feynman, en diciembre de 1959, durante su conferencia en la reunión de la Sociedad Americana de Física al preguntar retóricamente “¿Qué pasaría si pudiéramos organizar los átomos uno por uno en la forma que queremos?” (Buzea *et al.* 2007). Debido a su definición la nanotecnología es un campo muy amplio que incluye diferentes disciplinas de la Ciencia, desde la Química y Física hasta la Electricidad y Mecánica (Saini *et al.* 2010).

La nanotecnología es un campo estratégico muy importante de la ciencia y tiene un considerable potencial industrial. En los últimos años se ha convertido en una herramienta importante en la industria, siendo usada en el desarrollo de

nuevos materiales para la aplicación en sectores tan diversos como la agricultura, la medicina o el medio ambiente.

Como se ha indicado anteriormente, la nanotecnología se integra en el mundo nanométrico. El nanómetro es la unidad de longitud que representa la mil millonésima parte de un metro ( $10^{-9}$  m). Este nivel debe considerarse un estado diferente de agregación de la materia, además de los estados sólido, líquido, gas y plasma, ya que las nanopartículas de un nanomaterial tienen propiedades físicas (ópticas, magnéticas) y mecánicas muy diferentes que el mismo material a macroescala (Buzea y Pacheco 2017). La mayoría de las propiedades del tamaño nano empiezan a ser aparentes en sistemas menores de  $1 \mu\text{m}$ , llegando hasta el nivel atómico (0,1 nm) como se muestra en la Figura 3.1.



**Figura 3.1: Tamaño de algunos nanomateriales en comparación con componentes biológicos.** Se muestran los límites del tamaño "nano" y "micro" en una escala logarítmica de longitud. Tomado de Buzea *et al.* (2007).

Estos nuevos materiales que produce la nanotecnología, los llamados nanomateriales, tienen componentes estructurales menores de  $1\ \mu\text{m}$  pero, de acuerdo con esta definición, la mayoría de los materiales que nos rodean los podríamos calificar como nanomateriales. Por ello, la Comisión Europea sugiere que un nanomaterial debe ser un material con una composición del 50% o más de partículas con un tamaño entre 1 y 100 nm (Unión Europea 2011).

Los nanomateriales, debido a su tamaño, pueden mostrar propiedades muy diferentes a las que exhiben en la macroescala, posibilitando aplicaciones únicas. Por ejemplo, sustancias opacas se vuelven transparentes (cobre); materiales inertes se transforman en catalizadores (platino); materiales estables se transforman en combustibles (aluminio); sólidos se vuelven líquidos a temperatura ambiente (oro); aislantes se vuelven conductores (silicona) (Buzea *et al.* 2007). Los nanomateriales pueden subdividirse en nanopartículas, nanocapas y nanocompuestos, siendo las nanopartículas objeto de mayores estudios debido a la amplia variedad de aplicaciones potenciales en campos tales como el biomédico, óptico y electrónico (Taylor *et al.* 2013).

## 1.2. Las nanopartículas

Las nanopartículas (MNPs) son las partículas que se encuentran entre los tamaños de  $1\ \mu\text{m}$  y  $0,2\ \text{nm}$ , es decir, son objetos de escala mesoscópica, entre los mundos atómico y microscópico (Buzea y Pacheco 2017). La definición de nanopartícula varía mucho dependiendo del material o campo donde se aplica. En la bibliografía podemos encontrar casos en los que se las denomina como tal, cuando el intervalo de tamaños está comprendido entre 1 y 100 nm. Sin embargo, en el sentido más estricto, las MNPs son partículas en torno a los 10-20 nm, ya que sólo en este tamaño mantienen las propiedades características de la llamada escala “nano” (Nogi *et al.* 2012).

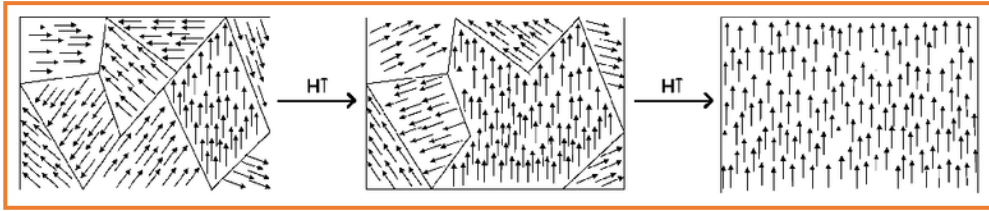
Las propiedades del nivel nano, referidas anteriormente, difieren del nivel macroscópico debido a que el reducido tamaño provoca que los átomos que componen los materiales cambien sus propiedades (Schmid 2011). Al disminuir el tamaño, la relación superficie-volumen aumenta y, consecuentemente, también aumenta la fracción de átomos que forman la superficie con respecto a los del volumen. La gran relación superficie-volumen de las MNPs es el factor clave para que aparezcan nuevas propiedades de tipo morfológico, térmico, óptico, mecánico y electromagnético (Issa *et al.* 2013).

En este trabajo, las propiedades que más interesan son las electromagnéticas; concretamente, que las partículas presenten un comportamiento magnético propio del nivel nano, es decir el superparamagnetismo.

### 1.2.1. Superparamagnetismo

Todo material reacciona en un campo magnético en función de su susceptibilidad magnética. Hay varios tipos de interacciones magnéticas, siendo el ferromagnetismo, el diamagnetismo y el paramagnetismo las interacciones más importantes.

En materiales **ferromagnéticos** (como Fe, Ni, Co), la alineación de los espines de los electrones ocurre en regiones microscópicas llamadas dominios magnéticos, que están separados por los bordes de dominios o paredes. En cada dominio, los momentos magnéticos están orientados en una dirección, mientras que el alineamiento de los dominios vecinos es, generalmente, anti-paralelo (Figura 3.2). Debido a la orientación aleatoria de los momentos magnéticos de los dominios, el momento magnético neto del material es nulo. Cuando se aplica un campo magnético externo, los dominios del material ferromagnético se alinean a lo largo de la dirección del campo magnético aplicado. Al eliminar el campo externo queda un momento magnético residual (Buzea y Pacheco 2017).



**Figura 3.2: Efecto del magnetismo en los dominios magnéticos.** Al ir aumentando el campo magnético, van desapareciendo las paredes de los dominios magnéticos hasta que todos los spines quedan orientados en un dominio único. Tomado de Cruz-Izquierdo (2013).

Los materiales **diamagnéticos** (Cu, Ag, Au y la mayor parte de los demás elementos) tienen átomos con electrones sin aparear y muestran un momento magnético neto. Su respuesta magnética a un campo magnético externo es muy débil, y al eliminarlo no retienen ningún momento magnético (Issa *et al.* 2013).

En los materiales **paramagnéticos** (Gd, Mg, Li, Ta) están ausentes los dominios magnéticos. Después de aplicar un campo magnético externo, los átomos se alinean a lo largo de la dirección del campo, dando como resultado un momento magnético débil. Al eliminar el campo, los materiales paramagnéticos no tienen una magnetización remanente (Buzea y Pacheco 2017).

Las MNPs de compuestos ferromagnéticos muestran respuestas magnéticas similares a los materiales paramagnéticos, si el tamaño de la nanopartícula es menor que un diámetro crítico de en torno a 10 nm (Figura 3.3). Este fenómeno, conocido como **superparamagnetismo**, se produce porque la formación de las paredes llega a ser energéticamente desfavorable y la partícula sólo puede soportar un solo dominio magnético (Schmid 2011).

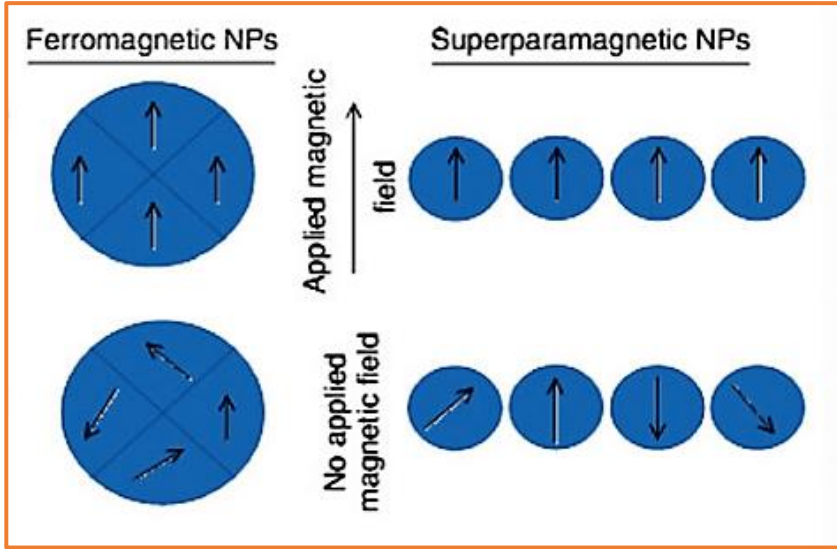


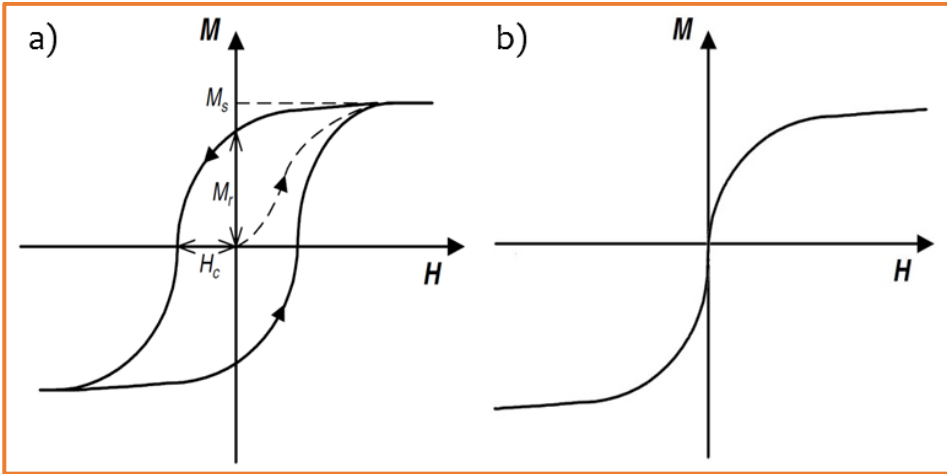
Figura 3.3: Magnetización de nanopartículas ferromagnéticas y superparamagnéticas sometidas a un campo magnético externo. Tomado de Buzea y Pacheco (2017).

Como se muestra en la Figura 3.3, cuando una nanopartícula ferromagnética se expone a un incremento de campo magnético, los dominios se alinean con el campo quedando magnetizada. Pero al retirar dicho campo, la magnetización no recupera su valor inicial, quedando magnetizada. Esta irreversibilidad se llama histéresis. Por el contrario, al retirar el campo magnético externo a una partícula superparamagnética, su magnetización residual es cercana a cero debido a la rápida inversión del momento magnético (Kolhatkar et al. 2013). Las características magnéticas pueden medirse mediante ciclos de histéresis, en los que al material de estudio se aplican campos magnéticos en un sentido y en el contrario (Figura 3.4).

Para ello se comienza aplicando un campo ( $H$ ) hasta alcanzar la saturación en la que todos los spines están orientados (**saturación magnética**,  $M_S$ ). Esta pendiente inicial nos indica la permeabilidad magnética del material. Cuando disminuye el campo se alcanza un campo nulo, en el que se mantiene un magnetismo residual (**remanencia**,  $M_R$ ). Cuanto más ferromagnético sea el



material, mayor  $M_R$ . Al campo magnético de sentido contrario necesario para anular el magnetismo remanente se le llama campo coercitivo (**coercitividad**,  $H_C$ ). Si se aplica un campo magnético opuesto se vuelven a saturar, pero en esta ocasión los spines se orientan en sentido contrario. Si se vuelve a aumentar el campo, se reinicia el ciclo (Cruz-Izquierdo 2013).



**Figura 3.4: Curvas de histéresis.** a) Curva de histéresis de un compuesto ferromagnético. La línea punteada muestra la pendiente del primer ciclo. b) Curva de histéresis de un compuesto superparamagnético. La  $M_R$  y  $H_C$  son prácticamente nulas. Adaptado de Cruz-Izquierdo (2013).

### 1.2.2. Síntesis de MNPs

Existen innumerables métodos para sintetizar MNPs, pudiendo ser procedimientos físicos (Zheng *et al.* 2006; Nigam *et al.* 2011), químicos (Zhang *et al.* 2015; Mukherjee y Gupta 2016) o biológicos (Song y Kim 2009; Muela *et al.* 2016).

En este trabajo se ha empleado el método químico por coprecipitación de sales de hierro (Massart 1981) para la formación de MNPs de magnetita ( $Fe_3O_4$ ). Este método es el más usado en biotecnología (Cabrera *et al.* 2008), ya que reúne las condiciones de una fácil obtención de partículas monodispersas del tamaño

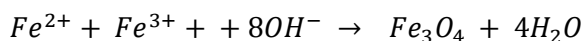
deseado y una alta reproducibilidad, que permite la posible industrialización del método (Jolivet *et al.* 2008).

### 1.2.2.1. Coprecipitación química

Al sintetizar MNPs por coprecipitación de sales de hierro se forman nanopartículas de óxidos de hierro. Este método es, probablemente, la técnica más sencilla, eficiente y barata para obtener MNPs (Vayssieres *et al.* 1998), pero conlleva como significativa desventaja la gran dispersión de tamaños de las MNPs obtenidas por el escaso control de la nucleación y crecimiento de la nanopartícula durante la síntesis (Barrera *et al.* 2009).

Durante la coprecipitación se dan dos procesos: la nucleación, donde se forman los centros de cristalización, y el crecimiento de la partícula. Las relaciones entre ambos procesos determinan su tamaño y dispersión (Cruz-Izquierdo 2013). El tamaño de las MNPs depende de la velocidad de agitación del medio y de la rapidez de adición de los reactivos. Por ello, si realizamos una agitación enérgica y aumentamos la velocidad de adición de los reactivos, podemos favorecer una mayor nucleación y un menor crecimiento de la nanopartícula (Răcuciu 2009).

En este trabajo, se sintetizaron nanopartículas de magnetita ( $Fe_3O_4$ ) mediante coprecipitación de sales de hierro, en una relación  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  de 2:1 (mol:mol). La reacción química para la formación de la nanopartícula es la siguiente:



Para favorecer la precipitación, la reacción química se realizó en un medio no oxidante y alcalino, con valores de pH entre 8 y 14. Para obtener un ambiente no oxidante se burbujeó el medio con  $N_2$  para desplazar el aire. Esto favorece no solo el desplazamiento del  $O_2$ , sino también la disminución del tamaño de partícula obtenida (Maity y Agrawal 2007).

### 1.2.2.2. Funcionalización

La superficie de las MNPs se puede funcionalizar mediante la unión covalente de moléculas. La funcionalización tiene una serie de ventajas como, por ejemplo, el mantenimiento de la estabilidad de las MNPs, evitando su agregación y precipitación. Además, evita la oxidación de la partícula y facilita la unión de otras moléculas a las MNPs, como proteínas o material genético (Kumar *et al.* 2004; Laurent *et al.* 2008; Šulek *et al.* 2010; Bhari *et al.* 2016).

En dispersiones magnéticas las fuerzas de atracción magnéticas, así como las fuerzas de interacción superficial, favorecen la agregación. Es por ello que para la funcionalización es importante que se utilicen componentes que posean una fuerte carga repulsiva, que contrarreste esta agregación.

Las fuerzas de interacción de una dispersión magnética con su medio se pueden medir a través del llamado potencial Zeta ( $\xi$ ). Si éste es elevado (ya sea positivo o negativo), la suspensión de MNPs es estable y tenderá a una menor agregación (Goodarzi *et al.* 2003; Harris *et al.* 2003; Kumar *et al.* 2004).

Uno de los compuestos más utilizados para funcionalizar MNPs son los organosilanos, como por ejemplo aminopropiltriétoxosilano (APTS) (Kralj *et al.* 2010; Nikje *et al.* 2014; Woo *et al.* 2016). Los organosilanos son moléculas bifuncionales que reaccionan en un extremo con los grupos -OH de las MNPs, sustituyéndolos por grupos -NH<sub>2</sub> (Wang *et al.* 2008; Cruz-Izquierdo 2013).

## 1.3. Inmovilización

Las MNPs son el soporte nanométrico más empleado en la inmovilización debido a sus indudables ventajas. A destacar, la gran capacidad de unión por su elevada área específica, la baja resistencia de transferencia (que evita problemas

de difusión) y el bajo coste operacional, favorecido por su rápida recolección del medio con un imán (Hong *et al.* 2007; Cruz-Izquierdo 2013).

Son cuantiosos los trabajos sobre inmovilización de proteínas en MNPs. En concreto, la inmovilización de enzimas es una técnica muy utilizada en biotecnología debido a los beneficios que conlleva frente al uso del enzima en disolución. Algunos ejemplos de enzimas inmovilizados en MNPs son: oxidasas (Matijošytė *et al.* 2010; Razmi y Mohammad-Rezaei 2013), proteasas (Li *et al.* 2010), lipasas (Tudorache *et al.* 2013; Zhao *et al.* 2015) y esterasas (Shaw *et al.* 2006).

Los enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas al disminuir su energía de activación. Gracias a ellos, las reacciones pueden ocurrir a elevada velocidad y a temperaturas relativamente bajas. Los enzimas catalizan una gran variedad de reacciones con gran eficiencia y alta selectividad.

A día de hoy, los enzimas se emplean en la industria para obtener diferentes productos de interés como alimentos, combustibles y fármacos, entre otros muchos. Sin embargo, su empleo a gran escala presenta inconvenientes, como son su elevado coste, su fácil inactivación y su difícil recuperación de la mezcla de reacción final.

Consecuentemente, el uso de enzimas inmovilizados puede solventar buena parte de estas limitaciones. La inmovilización aumenta significativamente la estabilidad del enzima, evitando en cierta medida la inactivación por sustratos o productos, así como por el empleo de condiciones extremas de reacción (temperatura, pH, disolventes orgánicos...). Por otro lado, la inmovilización permite la recuperación del enzima de la mezcla de reacción, posibilitando su reutilización y, por lo tanto, la disminución de su coste económico (Sankaran *et al.* 2016).

Sin embargo, la inmovilización también conlleva una serie de desventajas, como son una importante disminución de la actividad del enzima inmovilizado, la aparición de problemas difusionales o el aumento del coste del proceso. Además, la inmovilización puede provocar que las características catalíticas del enzima se modifiquen cambiando, por ejemplo, su especificidad y el pH y la temperatura óptimos de reacción.

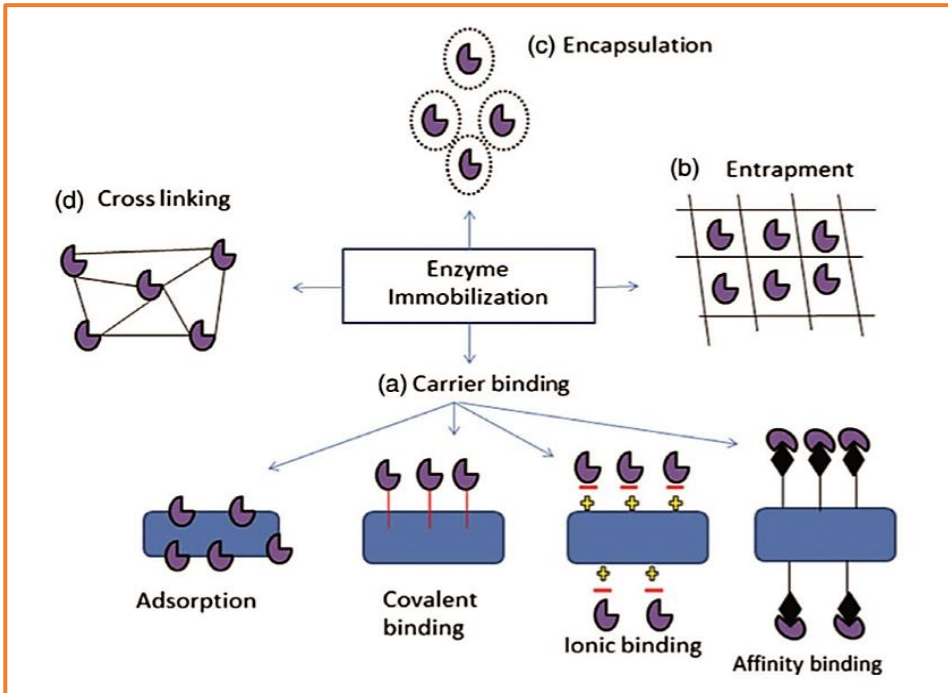
Aun así, los beneficios de la inmovilización de enzimas son superiores a las desventajas, siendo una técnica rentable a nivel procesal y económico (Brady y Jordaan 2009).

### 1.3.1. Tipos de inmovilización

Son numerosas las técnicas que se han desarrollado para inmovilizar enzimas, pero se pueden resumir en cuatro tipos: atrapamiento en mallas tridimensionales porosas, encapsulación en membranas semipermeables, entrecruzamiento y unión a un soporte, ya sea mediante adsorción o mediante enlaces covalentes, iónicos o de afinidad (Figura 3.5) (Brady y Jordaan 2009).

Los métodos de inmovilización también se pueden clasificar según la reversibilidad o irreversibilidad de la interacción enzima-soporte (Sankaran *et al.* 2016). Cada técnica posee sus ventajas y desventajas, por lo que a la hora de elegir una técnica de inmovilización hay que tener en cuenta factores como el tamaño de los sustratos y productos, las características cinéticas y estructurales del enzima, la toxicidad de los agentes, los costes del método y las propiedades que se desean obtener del nuevo catalizador (Cruz-Izquierdo 2013).

De las técnicas de unión a soporte (Figura 3.5; a) las más empleadas son la adsorción y la unión covalente.



**Figura 3.5: Diferentes técnicas de inmovilización de enzimas.** (a) Unión a soporte, (b) Atrapamiento, (c) Encapsulación, (d) Entrecruzamiento. Tomado de Sankaran *et al.* (2016).

### 1.3.1.1. Adsorción

La adsorción es la técnica de inmovilización reversible más antigua y una de las más empleadas. El enzima se adsorbe al soporte sólido a través de interacciones no covalentes e inespecíficas, tales como fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas y sobre todo puentes de hidrógeno. También se puede realizar a través de interacciones no covalentes específicas, como las hidrofóbicas, electrostáticas o de afinidad (Al-Zuhair *et al.* 2007). Estas interacciones, al ser débiles, apenas causan cambios conformacionales en el enzima, lo que permite que retenga buena parte de su actividad. Por el contrario, esta inmovilización es muy sensible al pH, temperatura y fuerza iónica (Brady y Jordaan 2009; Poppe *et al.* 2015).

### 1.3.1.2. Unión covalente

La unión covalente es una técnica de inmovilización irreversible en la cual se activan los grupos químicos del soporte permitiendo la unión covalente del enzima. Es el método más interesante desde el punto de vista industrial debido a la sencilla manipulación de los complejos inmovilizados y a su posible reutilización. Además, los enzimas inmovilizados covalentemente son, en general, más resistentes a la inactivación por la temperatura, los disolventes orgánicos o el pH.

Como desventaja, cabe destacar la notable disminución de actividad del enzima tras su inmovilización, debido a la alteración de su estructura espacial que puede afectar al centro activo.

Para inmovilizar un enzima se tiene en cuenta la disponibilidad y la nucleofilicidad superficial de sus aminoácidos, siendo una buena elección la inmovilización a través de los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina. Para la inmovilización covalente a través de residuos de lisina, el agente entrecruzante más empleado es el glutaraldehído (Barbosa *et al.* 2012). Este entrecruzante bifuncional reacciona con dos grupos amino formando bases de Schiff que son relativamente débiles y pueden hidrolizarse (Hermanson 2013). Para evitar la hidrólisis, las bases de Schiff se deben reducir con  $\text{NaBH}_4$  a pH alcalino (Bayliss y Adams 1979).

### 1.3.1.3. Atrapamiento y encapsulación

La inmovilización por atrapamiento implica el confinamiento del enzima dentro de una matriz polimérica que permite que pasen a través de ella el sustrato y los productos mientras que el enzima queda retenido (Figura 3.5; b). Por otra parte, en la encapsulación se inmoviliza el enzima dentro de una membrana por la cual sólo pueden difundir moléculas pequeñas (Figure 3.5; c).

Con estos métodos se consigue un enzima más estable que en la adsorción, pero el atrapamiento o encapsulación del enzima provoca problemas derivados en la menor transferencia de masa, por la matriz polimérica o por la permeabilidad de la membrana de la cápsula (Sankaran *et al.* 2016).

#### 1.3.1.4. Entrecruzamiento

El entrecruzamiento (*cross-linking*), es un método de inmovilización que ha sido muy utilizado en la estabilización de numerosos enzimas (Sheldon 2007). Esta técnica está ganando importancia debido a sus ventajas en la reducción de costes y a la alta producción (Sangeetha y Abraham 2008).

El entrecruzamiento consiste en inmovilizar el enzima consigo mismo, prescindiendo de cualquier soporte al utilizar moléculas entrecruzantes, bi- o multifuncionales. Como resultado se obtienen agregados de enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura (Cao *et al.* 2003; Zhao *et al.* 2015). Con esta técnica se evita utilizar soportes sólidos que reducen la actividad específica en un 90% o más (Brady y Jordaan 2009).

Existen diferentes métodos para inmovilizar enzimas sin emplear un soporte, siendo el más utilizado la precipitación por disolventes orgánicos y su posterior entrecruzamiento con un reactivo bifuncional, como el glutaraldehído.

Así se obtienen agregados conocidos como CLEAs (*Cross-Linked Enzyme Aggregates*) que son baratos de obtener y permiten gran flexibilidad, pudiéndose inmovilizar gran cantidad de enzima, o incluso varios enzimas a la vez, creando combi-CLEAs muy útiles para reacciones en cascada (Dalal *et al.* 2007).

Se han preparado CLEAs de un buen número de enzimas, incluyendo lacasas (Matijošytė *et al.* 2010), anhidrasa carbónica (Bhattacharya y Pletschke 2014) y lipasas (Cruz-Izquierdo 2012). Las CLEAs mejoran la estabilidad funcional y



operativa del enzima (mayor intervalo de pH óptimo de actividad y termoestabilidad) y reducen los problemas de transferencia de masa (Bhattacharya y Pletschke 2014).

Por el contrario, es problemática la recuperación del enzima para su reutilización, ya que se recurre a métodos de filtración o centrifugación, que a menudo resultan en un aumento del tamaño de las CLEAs y en la formación de grandes agregados (*clumping*), que limitan la transferencia de masa (Talebian-Kiakalaieh *et al.* 2013).

Para mejorar la actividad del enzima y solventar las desventajas propias de utilizar un solo método, se está investigando el efecto de combinar varios métodos de inmovilización. Siguiendo esta línea, Kim *et al.* (2013a) han realizado una combinación de adsorción/atrapamiento con entrecruzamiento para la inmovilización de una lipasa.

Por otra parte, en el laboratorio del Grupo se ha desarrollado un biocatalizador estable y fácil de recuperar, mediante el entrecruzamiento de MNPs a enzimas precipitados entrecruzados entre sí, para obtener CLEAs magnéticas (mCLEAs) (Cruz-Izquierdo *et al.* 2012; 2014; López *et al.* 2014; Picó *et al.* 2017).

Las mCLEA resultantes presentan las principales ventajas tanto de los biocatalizadores magnéticos como de las CLEAs convencionales, ya que muestran mejor estabilidad térmica y de almacenamiento. Además, las mCLEAs pueden reutilizarse fácilmente ya que su recuperación de la mezcla de reacción es sencilla empleando un imán, evitando así la centrifugación y filtración, que tantos problemas provocan para recuperar las CLEAs no magnéticas convencionales.

En los últimos años son diversos los enzimas inmovilizados mediante esta técnica, siendo algunos ejemplos las lacasas (Kumar *et al.* 2014; Nguyen *et al.* 2017) o los enzimas lignocelulóticos (Bhattacharya y Pletschke 2014). Uno de los

enzimas que más frecuentemente se ha inmovilizado son las lipasas (Cruz-Izquierdo *et al.* 2012; Tudorache *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2015).

## 1.4. Las lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3.) son enzimas ubicuos producidos por plantas, animales y microorganismos. Su función biológica es catalizar la hidrólisis de TAGs a glicerol y FFAs. En medios orgánicos pueden catalizar reacciones sintéticas, incluyendo interesterificaciones entre TAGs y alcoholes para producir glicerina y ésteres de ácidos grasos de cadena larga, es decir, biodiésel (Cruz-Izquierdo *et al.* 2014). En la Figura 3.6. se resumen las reacciones catalizadas por una lipasa.

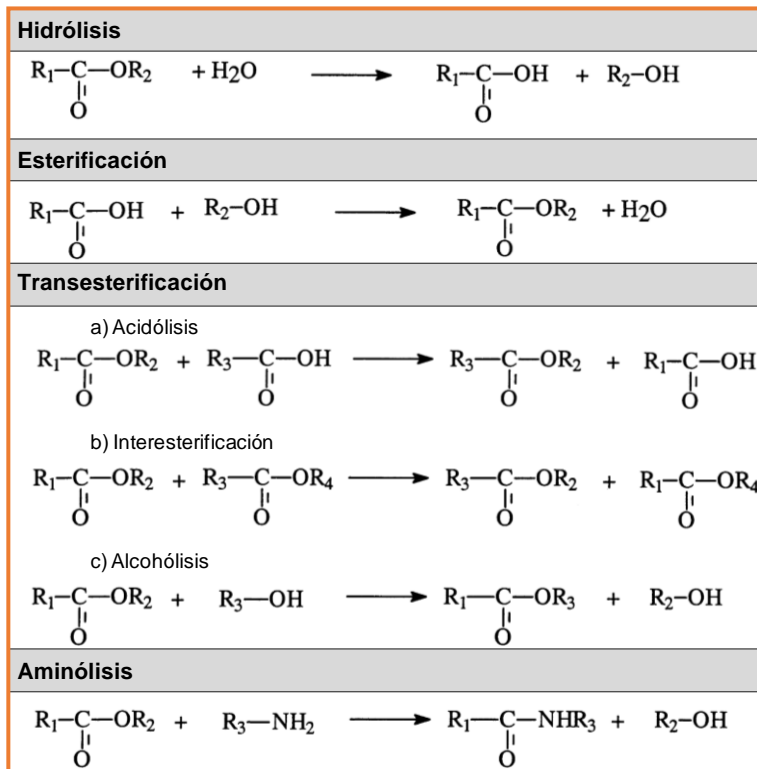


Figura 3.6: Esquema de las reacciones catalizadas por una lipasa. Tomado de Cruz-Izquierdo (2013).

Estas reacciones son muy interesantes desde el punto de vista biotecnológico, ya que permiten obtener un abanico muy amplio de bioproductos, tales como biosurfactantes (López *et al.* 2014), biocombustibles (Bhattacharya y Pletschke 2014; Cruz-Izquierdo *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2015) o fragancias (Pandey *et al.* 1999), entre muchos otros. Sin lugar a dudas, una de las aplicaciones más estudiadas es la alcoholólisis de aceites para la producción de ésteres de ácidos grasos (biodiésel).

Muchas de las reacciones que cataliza una lipasa también pueden ser catalizadas de forma química. Sin embargo, el uso de lipasas presenta varias ventajas frente a la catálisis química, como son las moderadas condiciones de temperatura y presión, mayor especificidad y menor toxicidad (Dizge *et al.* 2009).

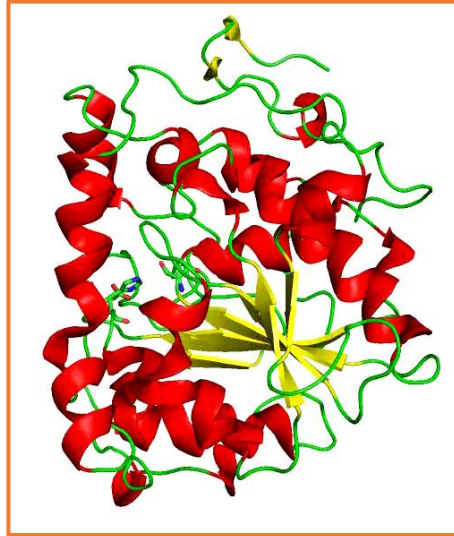
Las lipasas procedentes de bacterias, levaduras y hongos son la fuente comúnmente usada en la biocatálisis industrial, ya que son más robustas, más fáciles de obtener y más fáciles de recuperar del medio de cultivo (Al-Zuhair 2007). Actualmente, las lipasas más empleadas en síntesis orgánica son la lipasa de origen bacteriano *Burkholderia cepacia* (BCL), la lipasa de *Candida rugosa* (CRL) y la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) (Sankaran *et al.* 2016). Esta última lipasa es la utilizada en este trabajo.

#### 1.4.1. Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB)

CALB posee las características típicas de las lipasas, es decir, una triada catalítica compuesta por residuos de serina, aspartato e histidina y un mecanismo cinético de hidrólisis ping-pong bi-bi (Malcata *et al.* 1992). Sin embargo, no posee la estructura que hace de tapa del centro activo y la activación interfacial es residual y prácticamente indetectable (Martinelle *et al.* 1995).

CALB es una lipasa de 33 kDa (40x30x50 Å) muy estable en disolución, siendo estable en un intervalo de pH entre 3,5 y 9,5, con un pH óptimo para la catálisis de 7 (Figura 3.7). La temperatura de desnaturalización varía entre 50°C y 60°C,

dependiendo del pH en el que se encuentre, favoreciendo una temperatura de desnaturalización más alta un pH más ácido (Anderson *et al.* 1998).



**Figura 3.7: Estructura tridimensional de CALB.** En rojo se representan las hélices- $\alpha$  y en amarillo las hojas plegadas  $\beta$ . En verde se representan los lazos que dan flexibilidad a la proteína. Tomado de Uppenberg *et al.* (1995).

Por otra parte, cuando se inmoviliza CALB su estabilidad aumenta, pudiéndose utilizar en medios con disolventes orgánicos y en intervalos de temperatura de entre 60-80°C sin pérdida significativa en la actividad (Heldt-Hansen *et al.* 1989; Arroyo y Sinisterra 1994).

Se ha inmovilizado CALB a numerosos soportes, destacando entre ellos la comercializada por Novozymes como Novozym 435<sup>®</sup>, en el que la lipasa se ha inmovilizado a una resina acrílica. Otros soportes utilizados han sido nanotubos de carbono multicapa (Rastian *et al.* 2016), tela de carbono activada (Naranjo *et al.* 2010), resina acrílica (Ognjanovic *et al.* 2009) y MNPs magnéticas (López *et al.* 2014).

Puede que CALB sea una de las lipasas más empleadas en biotecnología para la obtención de bioproductos tan dispares como cosméticos, alimentos, lubricantes o biocombustibles (Anderson *et al.* 1998).

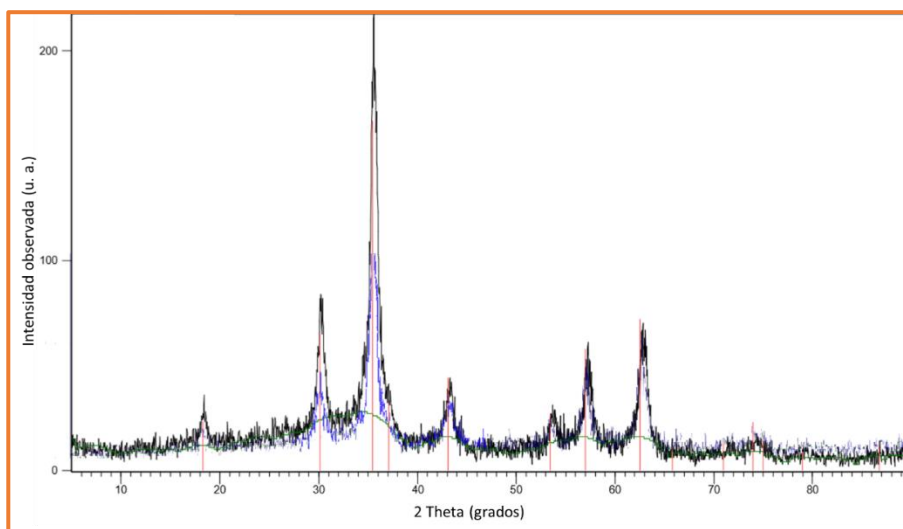


## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1. Caracterización de las nanopartículas

#### 2.1.1. Caracterización morfológica

Los difractogramas de rayos X (DRX) muestran que la única fase identificada en las MNPs es magnetita  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [óxido doble ferroso-férrico  $\text{Fe}^{2+}(\text{Fe}^{3+})_2\text{O}_4$ ], que cristaliza en el sistema cúbico (Figura 3.8).



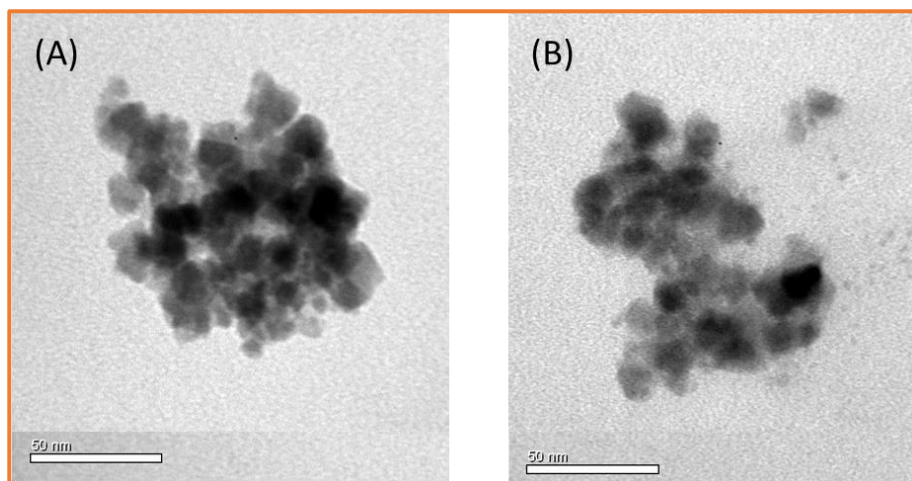
**Figura 3.8:** Difractogramas obtenidos con rendija automática (ADS) de las MNPs sintetizadas. En negro MNPs con grupos -OH y en azul MNPs funcionalizadas con grupos -NH<sub>2</sub>. En rojo se muestran los máximos de difracción correspondientes a la magnetita.

A partir de la ecuación de Scherrer se determinó el tamaño de cristalito Tabla 3.1. Este tamaño se calculó relacionando este valor con el ensanchamiento del pico de los máximos de difracción a media altura. El valor del ensanchamiento se determinó según la aproximación de Scherrer y según Warren.

**Tabla 3.1: Tamaño medio del cristalito de las MNPs.** Según ensanchamiento de Scherrer y Warren.

MNPs	Tamaño (Å) (Ensamamiento de Scherrer)	Tamaño (Å) (Ensamamiento de Warren)
MNP-OH	103 Å	93 Å
MNP-NH <sub>2</sub>	89 Å	82 Å

Se estimó que el tamaño medio de cristalito fue de 10 nm con pequeñas diferencias entre las muestras. Para confirmar estos valores, se comprobó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) el tamaño y la forma de las partículas (Figura 3.9). La forma de las MNPs es más o menos esférica y su tamaño medio ronda los 10 nm, si bien se aprecia que las MNPs tienden a agregarse para formar estructuras de en torno a 80 nm debido a las diversas interacciones que actúan entre ellas.



**Figura 3.9: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de MNPs.** Ambas microfotografías están tomadas a x400.000 aumentos. (A) MNPs con grupos -OH superficiales. (B) MNPs con grupos -NH<sub>2</sub> superficiales.

Para comprobar estos resultados, los agregados de MNPs también se analizaron por DLS, obteniéndose resultados de tamaño del agregado superiores a 80 nm (Tabla 3.2).

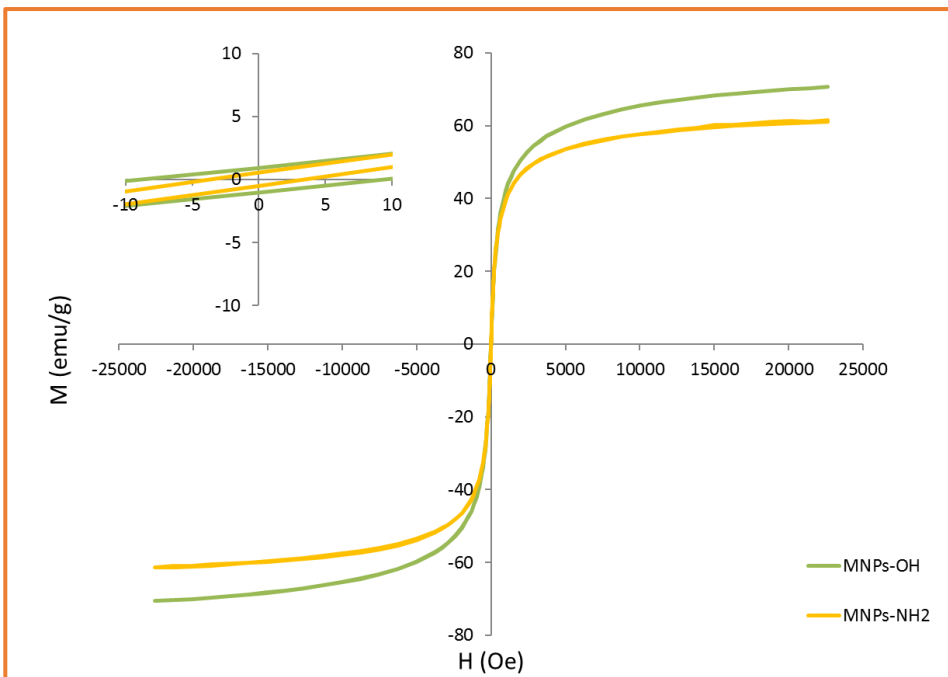


**Tabla 3.2: Tamaño medio de las MNPs mediante DLS (*Dynamic Light Scattering*). SD: Desviación estándar**

MNPs	Tamaño (nm)	SD
MNP-OH	81,23	±19
MNP-NH <sub>2</sub>	112,03	±20

### 2.1.2. Caracterización magnética

Se realizaron curvas de histéresis con los dos tipos de MNPs obtenidos. Los resultados muestran un claro comportamiento superparamagnético en ambos casos (Figura 3.10).



**Figura 3.10: Curvas de histéresis de MNPs.** Las curvas de histéresis se realizaron a temperatura ambiente (20°C). En verde se muestran las nanopartículas con grupos -OH, y en amarillo las nanopartículas funcionalizadas con grupos -NH<sub>2</sub>. **H:** Fuerza del campo magnético medido en Oersted (Oe). **M:** Magnetización medida en unidades electromagnéticas por gramo (emu/g).

A partir de las curvas de histéresis se obtuvieron diferentes parámetros magnéticos, como la saturación magnética ( $M_S$ ), coercitividad ( $H_C$ ) y remanencia ( $M_R$ ) para cada tipo de MNPs sintetizada (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3: Parámetros magnéticos de las nanopartículas sintetizadas.**

MNPs	$M_S$ (emu/g)	$H_C$ (Oe)	$M_R$ (emu/g)
MNP-OH	70,6	0,95	9
MNP-NH <sub>2</sub>	61,4	0,55	3,5

Cuando la magnetita es el componente mayoritario presenta una saturación magnética ( $M_S$ ) de 89 emu/g a temperatura ambiente. Aunque se ha obtenido una saturación magnética de 70 emu/g en las MNPs-OH se puede concluir que, al igual que en DRX, el componente mayoritario es magnetita. Esta diferencia de saturación magnética (89 frente a 70 emu/g) puede deberse a la diferencia entre la magnetita macroscópica y nanoscópica (Maity y Agrawal 2007; Cruz-Izquierdo *et al.* 2014). En las MNPs-NH<sub>2</sub> la disminución de la  $M_S$  es debido a que las MNPs se encuentran recubiertas de APTS y, por lo tanto, tienen una mayor cantidad de materia orgánica alrededor de la magnetita.

En cuanto a la coercitividad ( $H_C$ ) y remanencia ( $M_R$ ) se encuentran, en ambos casos, muy próximas a cero, lo que indica el claro carácter superparamagnético de las MNPs sintetizadas.

Partiendo de los datos de magnetización, y según la ecuación de Langevin, se puede calcular el diámetro promedio de las MNPs. Los resultados muestran una media de diámetro de nanopartícula de 8 a 10 nm, y una dispersión elevada de  $\pm 5$  nm (Figura 3.11).

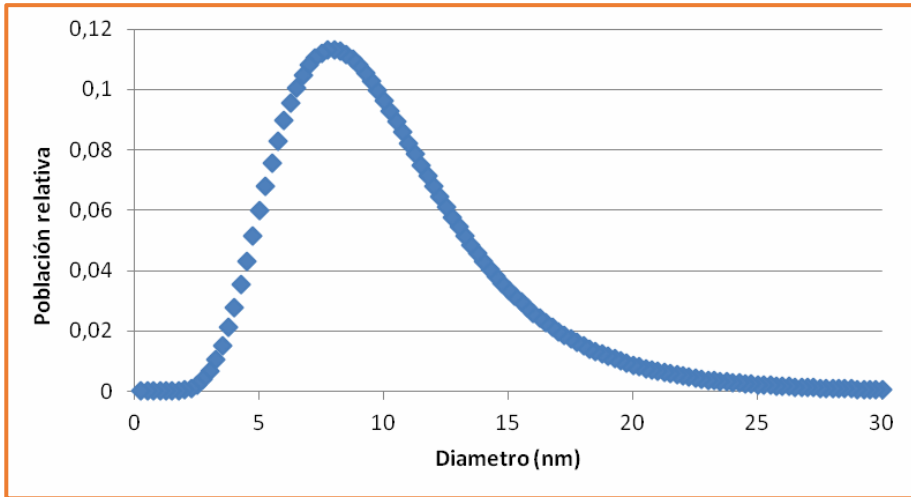


Figura 3.11: Dispersión de los tamaños de las nanopartículas con grupos  $-NH_2$ .

El método de síntesis de MNPs, la coprecipitación química, es responsable de la elevada desviación que se produce en el tamaño de nanopartícula. Esto es debido a que, durante la síntesis de las MNPs, la nucleación y crecimiento de la nanopartícula no están del todo controlados. Aun así, los tamaños de las MNPs se encuentran dentro del límite para que las MNPs sean superparamagnéticas. Estos datos de tamaño validan, a su vez, las mediciones obtenidas mediante las técnicas de TEM y DRX.

### 2.1.3. Estabilidad de las MNPs

La estabilidad que las MNPs presentan en un coloide se evaluó a través del potencial Zeta ( $\xi$ ). Los resultados obtenidos (Tabla 3.4) muestran que las MNPs tienen carga positiva a pH 7.

Además, los valores de potencial Zeta ( $\xi$ ) obtenidos nos indican que las MNPs se encuentran cerca de la región umbral ( $\pm 15$  mV) entre la agregación y la estabilidad (Clogston y Patri 2011), presentando una cierta tendencia a la agregación sobre todo las MNPs-OH (+12 mV). Por otra parte, se puede comprobar

que la funcionalización con grupos  $\text{-NH}_2$  evita, en parte, una mayor agregación de las MNPs.

**Tabla 3.4: Potencial Zeta ( $\xi$ ) para las MNPs obtenidas.** SE: Error estándar

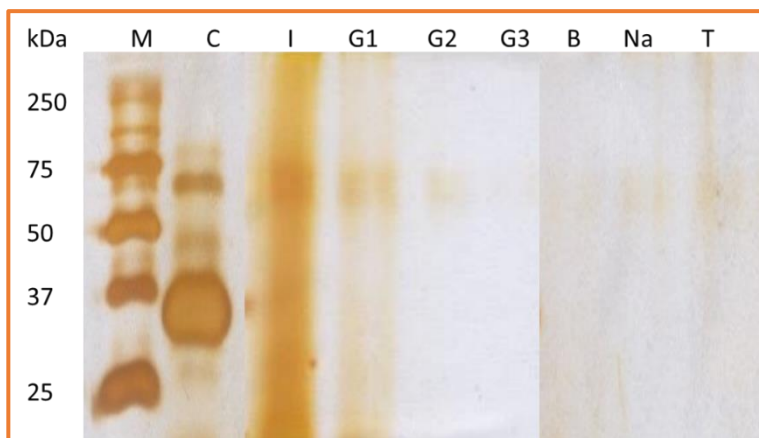
MNPs	Potencial Zeta (mV)	SE
MNP-OH	+12,6	$\pm 1,35$
MNP-NH <sub>2</sub>	+14,8	$\pm 0,32$

Las MNPs presentan cierta tendencia a agregarse para formar agregados más o menos esféricos de aproximadamente 80 nm de diámetro medio, como se aprecia en las microfotografías de TEM (Figura 3.9) y por DLS (Tabla 3.2). Una posible causa de esta agregación puede ser las interacciones no magnéticas que presentan las MNPs (Goodarzi *et al.* 2003). Otra posible causa podría ser el hecho de que las MNPs presentan un valor de magnetismo residual ( $M_R$ ) que, aunque es muy próximo al valor teórico de cero, favorece la consiguiente agregación de las MNPs.

## 2.2. Caracterización de las mCLEAs

### 2.2.1. Estudio de la inmovilización

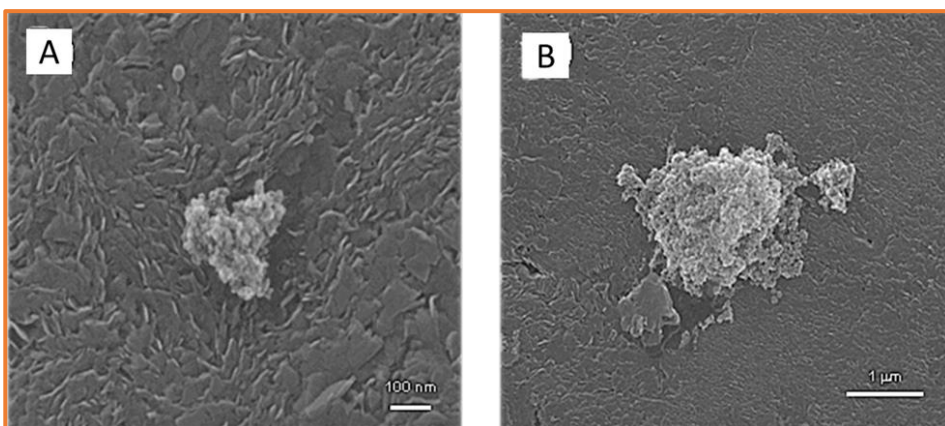
Se siguió la obtención de las mCLEAs tomando muestras de la fase líquida en cada una de las etapas de la inmovilización. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 12% que se analizaron por SDS-PAGE (Figura 3.12). Se inmovilizó el 100% de la proteína ofrecida (CALB) y no se observó liberación de proteína durante el proceso de inmovilización.



**Figura 3.12: Seguimiento de la inmovilización de la lipasa CALB por SDS-PAGE.** M: Marcadores; C: Control, CALB 33 kDa; I: Proteína no retenida tras la inmovilización; G1: Primer lavado con PBS; G2: Segundo lavado con PBS; G3: Tercer lavado con PBS; B: Proteína no retenida tras el lavado con NaBH<sub>4</sub>; Na: Lavado con NaCl; T: Proteína no retenida tras el lavado con Triton X-100 (1%, v/v).

### 2.2.2. Caracterización morfológica

Una vez obtenido el biocatalizador magnético, el tamaño y la forma de las mCLEAs de CALB se examinó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 3.13).

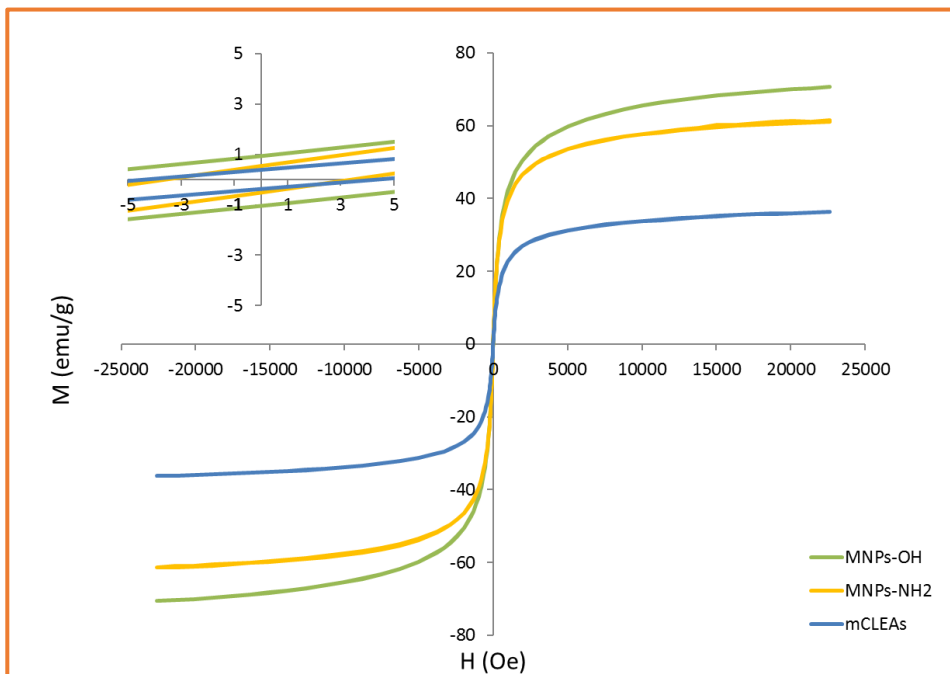


**Figura 3.13: Imágenes SEM de mCLEAs de CALB dispersadas en agua.** Las micrografías se tomaron a diferente ampliación; (A) x100.000 y (B) x 20.000.

Las formas más abundantes eran los agregados discretos de aproximadamente 300 nm (Figura 3.13; A), aunque también se pudieron observar agregados menores, de alrededor de 100 nm, y mayores, de hasta aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  (Figura 3.13; B). El tamaño medio del agregado de mCLEAs más abundante se confirmó mediante DLS, donde se obtuvo un valor de  $293 \pm 87$  nm.

### 2.2.3. Caracterización magnética

Se comprobó mediante ciclos de histéresis que las MNPs mantienen las características superparamagnéticas tras la inmovilización del enzima, esta vez formando parte de las mCLEAs (Figura 3.14).



**Figura 3.14: Ciclos de histéresis para MNPs y mCLEAs.** Las curvas de histéresis se realizaron a temperatura ambiente (20°C). En verde se muestran las nanopartículas con grupos -OH, en amarillo las nanopartículas funcionalizadas con grupos -NH<sub>2</sub> y en azul las mCLEAs.

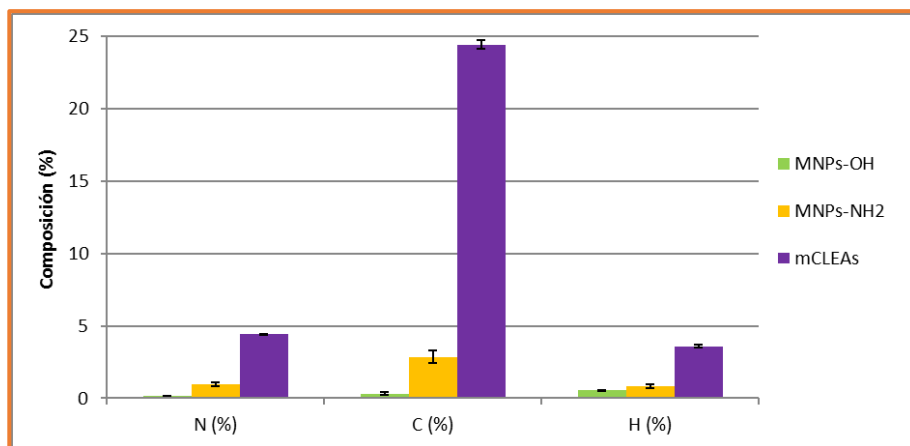
Después de la inmovilización, el biocatalizador magnético mantuvo el comportamiento superparamagnético de las MNPs si bien, como muestra la Figura 3.14, la saturación magnética ( $M_s$ ) de las mCLEAs fue mucho menor (36,6 emu/g) que las MNPs desnudas (70 emu/g). Esto puede deberse al hecho de que al estar el enzima inmovilizado, la señal de la magnetita sea menor al estar más diluída.

#### 2.2.4. Estabilidad de las MNPs

Se estudió la estabilidad del biocatalizador magnético en un coloide a través del potencial Zeta ( $\xi$ ). El resultado obtenido,  $+9,71 \pm 2,33$ mV, puede justificar que las mCLEAs tiendan a agregarse más que las MNPs (Tabla 3.4.).

#### 2.2.5. Análisis elemental

El análisis elemental de N, C y H concuerda con lo esperado para las nanopartículas desnudas (MNP-OH), funcionalizadas con grupos amino (MNP-NH<sub>2</sub>) y entrecruzadas como mCLEAS (Figura 3.15). El porcentaje en N de las MNPs-OH fue insignificante, casi en el límite de detección (0,1%). El consiguiente aumento de N en las MNPs-NH<sub>2</sub> confirma la funcionalización de las nanopartículas comparadas con las MNPs-OH. Además, el C muestra un aumento en estas nanopartículas, debido probablemente al contenido de C del agente de funcionalización (APTS), que tiene una ratio de 3 átomos de C por cada N. El resto de componentes que constituyen las MNPs serían Fe y O. En cuanto a las mCLEAs, el aumento significativo de todos los elementos, en especial C, nos confirma la inmovilización del enzima.



**Figura 3.15: Análisis elemental de las MNPs y mCLEAs obtenidas.** Se analizó la composición en Nitrógeno (N), Carbono (C) e Hidrógeno (H).

## 2.2.6. Determinación de la actividad enzimática

### 2.2.6.1. Actividad esterasa

Tras obtener las mCLEAs se midió la actividad hidrolítica del biocatalizador inmovilizado determinándose en 1,4 U por mg de biocatalizador (peso seco). Por el contrario, la lipasa libre mostró una actividad de 17,8 U/mg de proteína de la preparación comercial.

### 2.2.6.2. Transesterificación de aceites

De igual manera se comprobó la capacidad del biocatalizador inmovilizado para catalizar reacciones de transesterificación mediante la obtención de biodiésel a partir de aceite de oliva. Se obtuvo una conversión del 65% tras 20 h de reacción a 40°C, utilizando 2-propanol como donador de grupos alquilo en una mezcla de reacción sin disolvente y con agitación constante.



### **2.3. Escalado en la producción de mCLEAs**

Por último, se comprobó que las mCLEAs obtenidas a mayor escala mantenían las mismas características que las producidas a menor escala. Se evidenció que se mantenían las actividades enzimáticas (esterasa/transesterasa), al igual que las características magnéticas, morfológicas y de estabilidad de las mCLEAs, haciendo viable la obtención de mCLEAs a mayor escala.



# Capítulo IV

## Obtención de biodiésel





## 1. INTRODUCCIÓN

Desde hace décadas, los combustibles fósiles se han convertido en una parte integral de la vida cotidiana. Estos combustibles se emplean para producir energía para el transporte y la generación de electricidad, siendo estos sectores los que han desempeñado un papel vital en la mejora de la calidad de vida humana en las últimas décadas (Lam y Lee 2012).

Sin embargo, al provenir los combustibles fósiles de fuentes no renovables, su disponibilidad es limitada y tienden a agotarse. Además, la quema de combustibles fósiles ha planteado numerosos problemas ambientales, incluyendo los efectos de los gases de efecto invernadero (GEI), que contribuyen significativamente al calentamiento del planeta (Bhattacharya y Pletschke 2014).

Es por ello que se necesita buscar una fuente de energía renovable que estimule un desarrollo energético más sostenible, siendo este logro uno de los desafíos clave en este siglo (Lam y Lee 2012).

Son diversas las fuentes de energía renovable que están en desarrollo. Por ejemplo, en el sector del transporte se está tendiendo a la sustitución gradual de los combustibles fósiles por biocombustibles como el biodiésel. Este biocombustible se considera una alternativa real, sobre todo a corto plazo, ya que se puede utilizar en cualquier motor diésel sin necesidad de modificación (Leung *et al.* 2010).

## 1.1. Biodiésel

El biodiésel es una mezcla de ésteres alquílicos de ácidos grasos de cadena larga (FAAEs, *Fatty Acid Alkyl Esters*) obtenidos a partir de grasa animal, aceite vegetal o aceite de microalgas (López *et al.* 2015).

Sus propiedades energéticas y características físico-químicas son análogas a las que presenta el petrodiésel obtenido a partir de la destilación del petróleo. Además, este biocombustible produce menos emisiones de GEI en términos de hidrocarburos no quemados, monóxido de carbono y partículas, y presenta un menor contenido de azufre que el diésel mineral (Kegl 2008).

### 1.1.1. Tipos de biodiésel

El biodiésel se puede clasificar según el origen de la materia prima empleada, pudiendo usar tanto biomasa comestible como no comestible.

#### 1.1.1.1. Biodiésel de 1ª generación

El biodiésel de 1ª generación se obtiene a partir de biomasa comestible como el maíz, la caña de azúcar o los aceites de soja, colza u oliva (Mubarak *et al.* 2015).

El biodiésel de 1ª generación fue el primero que se desarrolló, si bien en la actualidad la industria se inclina hacia su descarte. Esto es debido a que el uso de biomasa comestible plantea muchas objeciones desde el ámbito social, ya que

interfiere en el mercado de la alimentación, aumentando la demanda y encareciendo el precio de los alimentos.

### **1.1.1.2. Biodiésel de 2ª generación**

El biodiésel de 2ª generación se obtiene a partir de materias primas no comestibles, como por ejemplo *Jatropha curcas*, *Miscanthus* spp. o *Panicum virgatum* (Mubarak et al. 2015), así como de aceites de fritura agotados.

Desafortunadamente, el uso de plantas que producen aceites no comestibles conlleva una serie de inconvenientes, como el elevado uso de terreno necesario para su cultivo, la deforestación resultante y el elevado gasto de agua. Estos problemas hacen que los biocombustibles de segunda generación sean insostenibles actualmente (Veillette et al. 2015).

Además, estos aceites, tanto los provenientes de plantas como los agotados, contienen una alta concentración de ácidos grasos libres (FFAs) que requieren pasos adicionales de pretratamiento, lo cual acaba provocando un mayor gasto energético que se refleja en el coste final del biodiésel.

### **1.1.1.3. Biodiésel de 3ª y 4ª generación**

El biodiésel de 3ª generación se obtiene a partir de lípidos que acumulan microalgas, macroalgas, hongos o levaduras (Lam y Lee 2012). De igual manera, el biodiésel de 4ª generación también se obtiene de estos organismos que han sido modificados genéticamente para dotarlos de una mayor capacidad para acumular lípidos y, por lo tanto, de una mayor producción de biocombustible (Mubarak et al. 2015).

Una de las fuentes de biocombustibles más estudiada son las microalgas (Lam y Lee 2012). La biomasa microalgal tiene un elevado potencial bioenergético y se puede emplear para obtener otros biocombustibles, distintos del biodiésel, así

como para obtener otros bioproductos de valor añadido, como carotenoides (Urreta *et al.* 2014).

## 1.2. Las microalgas

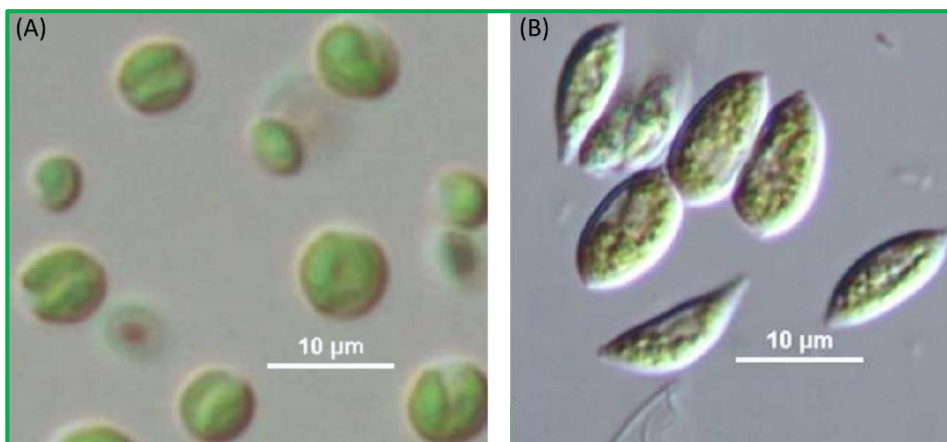
Las microalgas son microorganismos fotosintéticos microscópicos que se encuentran en ambientes marinos y dulceacuícolas (Brennan y Owende 2010). Tienen gran potencial para fijar CO<sub>2</sub> atmosférico, pudiendo incorporar 1,83 toneladas de CO<sub>2</sub> por tonelada de biomasa microalgal (Mubarak *et al.* 2015).

Se las considera buenas candidatas para la producción de biocombustibles debido a su alta acumulación de lípidos, los cuales pueden ser convertidos, posteriormente, en biodiésel. Además, las microalgas presentan una mayor eficiencia fotosintética, una mayor producción de biomasa y una tasa de crecimiento más rápida que otras fuentes alternativas, como las plantas (Miao y Wu 2006; Praveenkumar *et al.* 2014).

En este trabajo se han seleccionado dos microalgas, *Chlorella vulgaris* var L3 y *Scenedesmus* sp. (Figura 4.1), por la elevada cantidad de lípidos que almacenan y por ser habitualmente utilizadas para obtener biodiésel (Lam y Lee 2012; Mubarak *et al.* 2015; Lemões *et al.* 2016).

Para obtener biodiésel a partir de biomasa microalgal se tienen que abordar una serie de etapas, como son su cultivo, cosecha y secado de la biomasa microalgal, extracción de lípidos y, finalmente, conversión de los lípidos en biodiésel.





**Figura 4.1: Fotografías de las microalgas empleadas en este trabajo para obtener biodiésel.** A: *Chlorella vulgaris* var L3. B: *Scenedesmus* sp. Fotografías obtenidas por el centro asociado NEIKER.

### 1.2.1. Cultivo

En general, las microalgas pueden cultivarse usando tres métodos energéticos distintos: fototrófico, heterotrófico y mixotrófico.

Los cultivos fototróficos utilizan luz como fuente de energía y  $\text{CO}_2$  como fuente inorgánica de carbono, mientras que los heterotróficos son independientes de la luz y utilizan algún substrato orgánico (por ejemplo glucosa, acetato, glicerol...) como fuente de energía y carbono (Mata *et al.* 2010). En el cultivo mixotrófico, las microalgas crecen ya sea por vía fototrófica o heterotrófica, dependiendo de la concentración de la fuente de carbono orgánico y de la intensidad de la luz empleada (Mata *et al.* 2010).

Hasta ahora, sólo el método fototrófico ha sido técnica y económicamente viable para cultivar microalgas a escala comercial en un ambiente exterior donde la luz solar es abundante (Lam y Lee 2012). Además, un cultivo fototrófico tienen la ventaja de usar las microalgas como sumidero de carbono, al poder utilizar  $\text{CO}_2$  de los gases de combustión como fuente de carbono.

Una estrategia muy utilizada para aumentar el contenido de lípidos de la biomasa microalgal consiste en someter los cultivos a deficiencia nitrogenada (Ikaran *et al.* 2015). En escasez de nitrógeno muchas microalgas son capaces de dirigir sus vías metabólicas hacia la acumulación de grandes cantidades de lípidos, principalmente triglicéridos (TAGs), que son los más adecuados para obtener biodiésel (Breuer *et al.* 2012).

### 1.2.2. Cosecha y secado

El proceso de cosecha y extracción supone hasta el 60% del coste total de la producción de biodiésel (Mata *et al.* 2010), por lo que es de vital importancia reducirlo a través de una serie de avances técnicos.

En cuanto a la cosecha, no existe un método universal para recolectar microalgas, ya que depende de factores como el género de la microalga empleada, la densidad celular y el volumen de cultivo a cosechar. Los métodos de recolección más comunes son la sedimentación, centrifugación y filtración. También se están investigando nuevos procesos como la flotación (Hanotu *et al.* 2012), separación magnética (Toh *et al.* 2012), ultrasonidos o electrólisis (Kim *et al.* 2013b).

A diferencia de otras fuentes, la biomasa microalgal requiere un secado previo para la producción de biocombustibles, ya que la presencia de agua puede afectar a los posteriores procesos de extracción y obtención de biodiésel (Lam y Lee 2012). El secado de biomasa microalgal requiere un gran gasto energético, por lo que se tiende a usar métodos de extracción que permitan emplear biomasa húmeda, con lo que se puede conseguir una reducción del coste energético de hasta el 25% (Mubarak *et al.* 2015).

### 1.2.3. Extracción lipídica

Para la extracción de los lípidos microalgales se suelen utilizar diversos procedimientos clasificándose en físicos o químicos (Halim *et al.* 2012). Hasta la fecha no se ha desarrollado un proceso estándar de extracción, utilizándose los métodos anteriores, solos o en combinación (Hita Peña *et al.* 2015).

#### 1.2.3.1. Extracción física

Los métodos físicos más empleados son la extracción por presión mecánica, ultrasonidos y microondas (Mubarak *et al.* 2015).

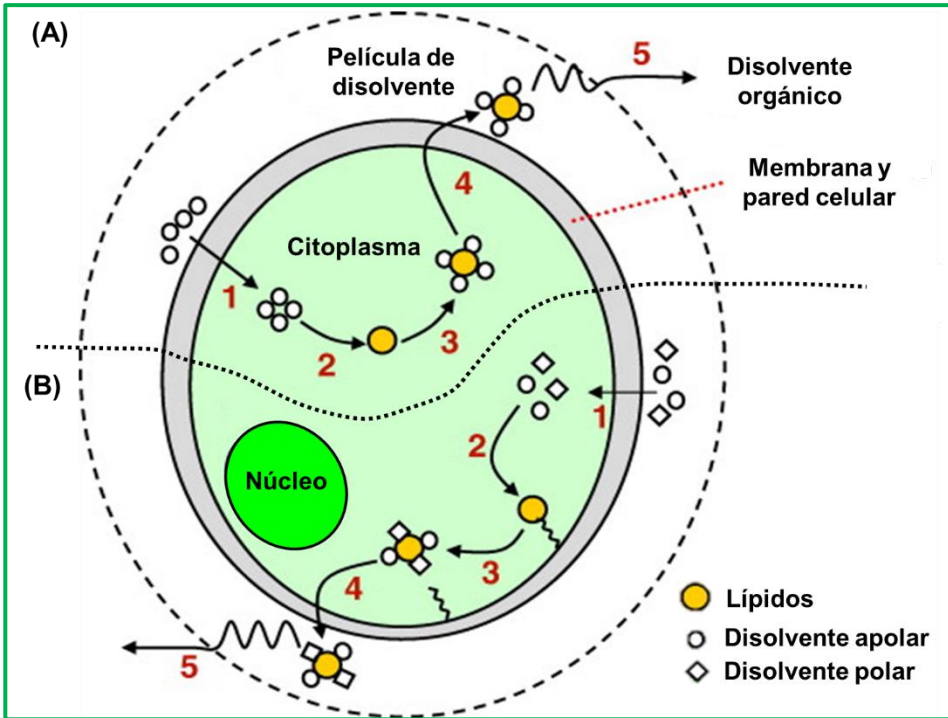
Estos procesos son lentos y con baja eficiencia. Además, algunos de ellos, como la ultrasonación, conllevan un alto gasto energético. En otros casos, como la presión mecánica, se necesita gran cantidad de biomasa microalgal para su funcionamiento (Mubarak *et al.* 2015).

#### 1.2.3.2. Extracción química

Los métodos químicos son, generalmente, más baratos y rápidos que los mecánicos, y utilizan disolventes orgánicos para extraer los lípidos. La extracción Soxhlet, la extracción subcrítica y la extracción mediante fluidos supercríticos, son las técnicas extractivas más comunes. Las dos primeras extracciones se han empleado en este trabajo.

##### *a) Extracción Soxhlet*

Este método químico utiliza disolventes orgánicos apolares, como *n*-hexano, benceno, tolueno o cloroformo, y disolventes polares, como metanol, acetona, acetato de etilo y etanol. La mezcla binaria cloroformo:metanol (1:2, v/v) es la más utilizada, ya que se obtienen grandes rendimientos en tiempos cortos (Folch *et al.* 1957). El mecanismo general de extracción de lípidos mediante disolventes orgánicos se muestra en la Figura 4.2.



**Figura 4.2: Esquema del mecanismo de extracción de lípidos mediante disolventes orgánicos.** **A:** Mecanismo de extracción de un disolvente orgánico apolar. **B:** Mecanismo de extracción de una mezcla de disolventes polar/apolar. Mecanismo de extracción: 1) Penetración del disolvente orgánico a través de la membrana celular. 2) Interacción del disolvente con los lípidos. 3) Formación del complejo disolvente-lípido. 4) Difusión del complejo a través de la membrana celular. 5) Difusión del complejo disolvente-lípido a través de la película de disolvente orgánico. Adaptado de Halim *et al.* (2012).

Esta técnica presenta una alta eficiencia siendo simple y barata. Sin embargo, los disolventes empleados son tóxicos y perjudiciales para el medio ambiente (Mubarak *et al.* 2015). Además, el empleo de ciertos disolventes en la extracción puede impedir dar otro uso a la biomasa deslipilizada, como por ejemplo la obtención de biogás.

#### *b) Extracción subcrítica*

Aunque las técnicas de extracción con disolventes son, generalmente, más baratas y fáciles de ejecutar, la necesidad de emplear disolventes tóxicos y los tiempos de extracción largos son los principales inconvenientes. Con el fin de

minimizar estos inconvenientes, se ha descrito la extracción subcrítica como un método con buen rendimiento (Herrero *et al.* 2005; Chen *et al.* 2011a; Pieber *et al.* 2012).

Esta técnica utiliza disolventes a temperaturas entre 50 y 200°C, y presiones entre 10 y 15 MPa, para garantizar que el disolvente permanezca siempre en estado líquido y para conseguir una extracción elevada y rápida (Mubarak *et al.* 2015). Esta extracción tiene un elevado coste energético y sólo se ha aplicado a escala de laboratorio (Halim *et al.* 2012).

### *c) Extracción por fluidos supercríticos*

La extracción con fluidos supercríticos evita el uso de disolventes tóxicos al utilizar CO<sub>2</sub> gas como disolvente. Con este método se obtienen buenos resultados y se puede procesar biomasa microalgal húmeda, lo que conlleva una importante reducción de costes. Sin embargo, su mayor desventaja radica en que esta tecnología es todavía demasiado costosa y difícil de operar a gran escala (Sathish y Sims 2012).

### **1.2.3.3. Saponificación directa**

Una alternativa a la extracción de TAGs es la extracción de FFAs de la biomasa microalgal por medio de una saponificación directa. Esta extracción permite obtener FFAs saponificados con sales de potasio o sodio en lugar de TAGs (Medina *et al.* 1995; González *et al.* 1998; Hita Peña *et al.* 2015).

La saponificación directa es más rápida y barata que la extracción tradicional de TAGs, aunque se requieren condiciones de operación más drásticas (Grima *et al.* 1994). La extracción de FFAs se realiza en tres pasos: i) saponificación directa de la biomasa húmeda, seguida de ii) la extracción de componentes insaponificables y, finalmente, iii) la extracción de FFAs purificados (Grima *et al.* 1994).

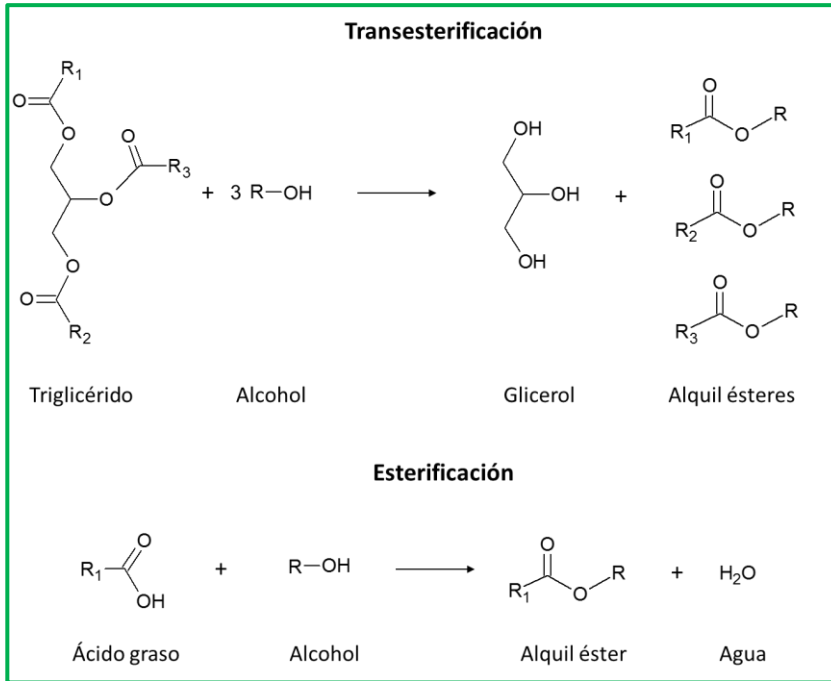
Aunque el alto contenido en agua de la biomasa húmeda de microalgas (aproximadamente el 80%, p/p) afecta al rendimiento de saponificación, es preferible utilizar biomasa húmeda en lugar de seca, porque su secado implica altos costes tanto en equipos como en energía (Hita Peña *et al.* 2015).

### 1.3. Obtención de biodiésel

Para utilizar los lípidos microalgales como biocombustible éstos han de experimentar antes una última transformación (Fukuda *et al.* 2001; Knothe 2006; Singh y Singh 2010). Existen diferentes tipos de modificación, tales como dilución, craqueo térmico (pirólisis), transesterificación y microemulsificación. De todos ellos, la transesterificación es el mejor método para obtener biodiésel (Balat y Balat 2010; Brennan y Owende 2010; Talebian-Kiakalaieh *et al.* 2013).

Es necesaria la transesterificación de los TAGs o la esterificación de los FFAs que componen el aceite para obtener biodiésel. En la trans/esterificación, también conocida como alcoholísis, los TAGs y FFAs que componen el aceite se convierten en ésteres alquilados de ácido graso. La reacción se lleva a cabo en presencia de alcoholes de cadena corta, tales como metanol o etanol, y un catalizador (Figura 4.3) (Lam *et al.* 2010).

El catalizador de la reacción puede ser de origen biológico (un enzima) o químico, es decir, un ácido o una base. Según el tipo de catalizador empleado se distinguen dos tipos de catálisis: química y enzimática.



**Figura 4.3: Esquema de la reacción de trans/esterificación de un aceite/FFAs para producir biodiésel.** La estequiometría de la reacción de transesterificación requiere un mínimo de 3 mol de alcohol por cada mol de triglicérido para la obtención de 3 mol de ésteres y 1 mol de glicerol. En la reacción no se muestran los derivados intermedios: diacilglicéridos y monoacilglicéridos. En cambio, la reacción de esterificación requiere un mol de alcohol por cada mol de FFAs.

### 1.3.1. Catálisis química

El método tradicional para producir biodiésel es mediante catálisis química. Para ello, se puede emplear un ácido (como el sulfúrico) o un compuesto alcalino (como hidróxido de sodio), como catalizador de la reacción de trans/esterificación. Ambos métodos presentan ventajas e inconvenientes.

#### 1.3.1.1. Catálisis alcalina

En la actualidad, el método químico más empleado es la transesterificación catalizada por un álcali (generalmente KOH y NaOH), ya que es una reacción muy rápida, y transcurre a una temperatura relativamente baja (entre 60 y 70°C) y tiene

mayor capacidad de conversión en biodiésel, en comparación con el proceso catalizado por un ácido (Shahid y Jamal 2011; Sankaran *et al.* 2016).

Sin embargo, existen limitaciones en la utilización del método alcalino ya que, por ejemplo, la presencia de agua y FFAs en la muestra origina la formación de jabones por saponificación de los TAGs. Estos jabones reducen la eficiencia catalítica, incrementan la viscosidad, forman geles y dificultan tanto la eliminación del glicerol como la recuperación y purificación del biodiésel (Robles-Medina *et al.* 2009; Lam *et al.* 2010).

### **1.3.1.2. Catálisis ácida**

Para la catálisis ácida se utilizan, generalmente, ácido sulfúrico, fosfórico, clorhídrico y ácidos orgánicos sulfónicos. La catálisis ácida permite utilizar aceites con alto contenido de FFAs y agua, pero la reacción es unas 4000 veces más lenta que la catálisis alcalina.

Este tipo de catálisis requiere emplear temperaturas entre 90-120°C y mucha más cantidad de catalizador, del orden de 30 mol de catalizador por cada mol de aceite (Vyas *et al.* 2010). Además, origina que los equipos se dañen por la corrosión provocada por los catalizadores, que se traduce en un mayor coste y gasto energético en la producción de biodiésel.

### **1.3.2. Catálisis enzimática**

La catálisis enzimática es más específica y requiere condiciones más suaves de reacción, con un consiguiente menor gasto energético (Zhao *et al.* 2015; Soler *et al.* 2016)

Por otra parte, la producción enzimática de biodiésel permite la fácil recuperación del glicerol, sin necesidad de purificar el producto y evitando la producción de residuos químicos. Además, el proceso enzimático tolera la



presencia de agua y de FFAs y aumenta el rendimiento de conversión en biodiésel evitando la formación de jabones (Dizge *et al.* 2009).

Asimismo, la biocatálisis de la reacción tiene un menor coste económico por la posible reutilización del biocatalizador y por el menor número de pasos requeridos hasta la obtención de los productos finales, siendo éstos de mayor pureza (Sankaran *et al.* 2016).

Estas ventajas sugieren que la producción de biodiésel catalizada por enzimas tiene un alto potencial por ser un proceso más ecológico y una alternativa prometedora al proceso químico. Sin embargo, el uso de enzimas en la industria está limitado ya que todavía quedan por resolver muchos inconvenientes, como los altos costes del enzima, su inactivación por disolventes y la lenta velocidad de reacción (Bajaj *et al.* 2010; Cesarini *et al.* 2013).

Para evitar la inactivación enzimática y aumentar la vida media del enzima se puede inmovilizar a diferentes soportes (véase Capítulo III de esta Memoria).

En este trabajo la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) se ha inmovilizado entre sí mediante entrecruzado de agregados de enzima (*Cross-Linked Enzyme Aggregates*, CLEAs) y, a su vez, con nanopartículas magnéticas funcionalizadas con grupos  $-NH_2$ . Este biocatalizador magnético resultante tiene los beneficios de las CLEAs, entre los que destaca una mayor estabilidad. Además, gracias a su carácter magnético, permite una recuperación rápida del mismo de la mezcla de reacción y su posible reutilización, rebajando considerablemente los costes de producción de biodiésel.

## 1.4. Optimización de las condiciones de la reacción

Se han publicado numerosos artículos sobre la optimización del proceso de trans/esterificación con diversas lipasas si bien, las condiciones operativas

óptimas varían dependiendo del tipo de lipasa y de la técnica de inmovilización (Zhao *et al.* 2015).

En la obtención enzimática de biodiésel se han de tener en cuenta varios factores para la trans/esterificación de los lípidos, como son el tipo de donador de grupos alquilo, la proporción del mismo, el uso o no de un co-disolvente en la reacción, la agitación de la reacción, la temperatura, la cantidad de agua presente en la mezcla de reacción y la cantidad de enzima (Zhao *et al.* 2015; Sankaran *et al.* 2016).

#### **1.4.1. Temperatura**

La temperatura de incubación es un factor importante en la velocidad de la reacción. En la producción enzimática de biodiésel se trabaja desde 25°C (López *et al.* 2015) hasta 50°C (Modi *et al.* 2007; Royon *et al.* 2007).

La lipasa CALB se ha utilizado para catalizar reacciones a temperaturas desde 30°C hasta 60°C (Uppenberg *et al.* 1995), pero se ha de emplear una en la que su actividad y reutilización no se vean comprometidas en los sucesivos ciclos catalíticos.

#### **1.4.2. Tipo de donador alquilo y proporción del mismo**

Se han utilizado varios alcoholes de cadena corta como donadores de grupo alquilo, incluyendo metanol, etanol, 2-propanol, *n*-butanol e isobutanol (Singh *et al.* 2013). Sin embargo, el metanol es el donador alquilo más utilizado para la producir biodiésel debido a su bajo precio. Además, algunos acetatos de alquilo de cadena corta, tales como acetato de metilo y acetato de etilo, se han empleado también como donador de grupos alquilo (Jeong y Park 2010).

La mayor velocidad de reacción se obtiene cuando se usa metanol. El aumento de la concentración del donador alquilo generalmente aumenta la velocidad de

reacción y la conversión final de aceite en biodiésel. Aunque, teóricamente, se necesitan 3 mol de alcohol para convertir completamente 1 mol de TAGs (relación molar 3:1), en la práctica se utiliza un exceso de alcohol (normalmente 6:1) ya que la transesterificación es una reacción reversible (Lotti *et al.* 2015; Zhao *et al.* 2015).

Sin embargo, altas concentraciones de alcohol (especialmente metanol), reducen significativamente la actividad de las lipasas. En este sentido Chen y Wu (2003) demostraron que la inactivación por alcohol se reduce según se aumenta el número de carbonos del alcohol, aunque cada lipasa tiene preferencia por un tipo de alcohol. En concreto CALB soluble es muy sensible al metanol siendo rápidamente inhibida a relaciones molares mayores que 1:1 (Shimada *et al.* 1999).

Para evitar este efecto negativo del alcohol, existen varias estrategias como la adición escalonada de metanol (Bonet-Ragel *et al.* 2015; Canet *et al.* 2017), la presencia de un co-disolvente que reduzca la concentración del alcohol en la mezcla de reacción (Zheng *et al.* 2009; Charpe y Rathod 2011; Rastian *et al.* 2016; Mehrasbi *et al.* 2017) o la utilización de lipasas modificadas genéticamente para que sean menos sensibles a altas concentraciones de alcohol (Park *et al.* 2012; Korman *et al.* 2013).

También se podrían sustituir los donadores alquilo de cadena corta por otros que no inactiven la lipasa, pero el elevado precio de estos últimos y la falta de beneficios adicionales hace que el etanol y metanol sean las únicas opciones viables desde el punto de vista económico y de disponibilidad (Lotti *et al.* 2015).

### 1.4.3. Tipos de co-disolvente

La reacción de transesterificación se puede llevar a cabo en disolventes orgánicos o en sistemas sin disolventes. La presencia de un disolvente en la mezcla de reacción disminuye la viscosidad del aceite y favorece la interacción

entre el sustrato y el centro activo de la lipasa al mejorar la transferencia de masa (Sankaran *et al.* 2016).

Se tiende a utilizar disolventes orgánicos hidrofóbicos, ya que permiten obtener mejores resultados al favorecer la agregación de las moléculas de agua presentes en la mezcla en torno al enzima mejorando su actividad (Fjerbaek *et al.* 2009). Sin embargo, con algunos disolventes hidrófilos, como el 1, 4-dioxano y t-butanol, se obtienen altos rendimientos de transesterificación, al reducir estos disolventes la viscosidad del aceite y disolver subproductos perjudiciales para la lipasa (Lotti *et al.* 2015).

Por el contrario, la adición de un co-disolvente en la reacción dificulta la extracción del biodiésel tras la catálisis, siendo necesarios otros mecanismos de extracción que conllevan un mayor coste energético (Sankaran *et al.* 2016).

A pesar del mayor coste energético que supone la utilización de un co-disolvente en la mezcla de reacción, se puede rentabilizar su uso ya que la velocidad de reacción es mucho mayor. Además, el co-disolvente es capaz de disolver el glicerol que se forma como subproducto y que puede afectar al enzima inmovilizado. El efecto del glicerol se debe a que es un compuesto muy hidrofílico e insoluble en aceite, por lo que puede adsorberse fácilmente en la superficie de las lipasas inmovilizadas (Du *et al.* 2007).

#### **1.4.4. Modo de agitación**

La transferencia de masa es un factor clave en la producción de biodiésel. Para evitar limitaciones en la transferencia de masa, se requiere de una adecuada agitación (Sankaran *et al.* 2016).

Hay algunos métodos de agitación, como el magnético, que puede acabar dañando al enzima o al soporte de inmovilización debido al contacto del imán con el biocatalizador, provocando con ello una pérdida de conversión (Itabaiiana Jr. *et*

*al.* 2013). Sin embargo, otros métodos como la agitación mecánica o la irradiación con ultrasonidos mejoran el rendimiento de obtención de biodiésel.

El uso de ultrasonidos en la producción de biodiésel presenta ventajas sobre otros métodos de agitación. La energía de los ultrasonidos mejora la transferencia de masa entre los reactivos inmiscibles por cavitación ultrasónica (Veljković *et al.* 2012), siendo esta última el crecimiento y el colapso implosivo de las burbujas (cavidades) en un líquido irradiado con ultrasonidos. Cuando las ondas ultrasónicas pasan a través del líquido forman burbujas, llenas de solvente y gases disueltos, que crecen y colapsan. El colapso de las burbujas de cavitación da lugar a la formación de pequeños remolinos que aumentan la transferencia de masa y calor en la mezcla de reacción (Veljković *et al.* 2012).

La aplicación de ultrasonidos a la mezcla de reacción mejora muchos factores de la reacción, como el tiempo necesario para la obtención de biodiésel, la temperatura de reacción, la eficiencia, etc. Además, el uso de ultrasonidos permite reducir el coste para producir biodiésel, ya que con este método de agitación se requiere una menor cantidad de catalizador (Stavarache *et al.* 2005) y se puede ahorrar hasta la mitad de energía que se consume en la agitación mecánica (Ji *et al.* 2006; Chand *et al.* 2010).

Aunque los ultrasonidos pueden ser beneficiosos a corto plazo, cuando se emplean en sucesivos ciclos catalíticos acaban afectando al enzima, provocando la pérdida de actividad y un descenso de conversión (Islam *et al.* 2014). Los ultrasonidos actúan sobre el enzima provocando cambios conformacionales en su estructura secundaria (Zhang *et al.* 2014) y, en el caso de enzimas inmovilizados, los ultrasonidos pueden afectar la estabilidad de los enlaces entre el soporte y el enzima provocando su rotura (Waghmare *et al.* 2015; Subhedar y Gogate 2016; Santin *et al.* 2017).

La utilización de ultrasonidos como método de agitación requiere ser estudiado con mayor detalle, en especial en lo relativo al diseño de nuevos reactores para mejorar la producción de biodiésel.

Aunque estos son los factores más importantes en la producción de biodiésel, hay que tener en cuenta otra serie de factores como la presencia de fosfolípidos en el aceite, la acidez del mismo, o la presencia de trazas de disolventes empleados en procesos anteriores, como en la extracción del aceite, entre otros.

## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la obtención de mCLEAs de CALB, se empleó el biocatalizador magnético para producir biodiésel. Se optimizó su obtención a la vez que se hizo lo propio en el método de cultivo, la elección de la microalga (*Chlorella vulgaris* var L3 o *Scenedesmus* sp.), así como en el método para la extracción de los lípidos microalgales.

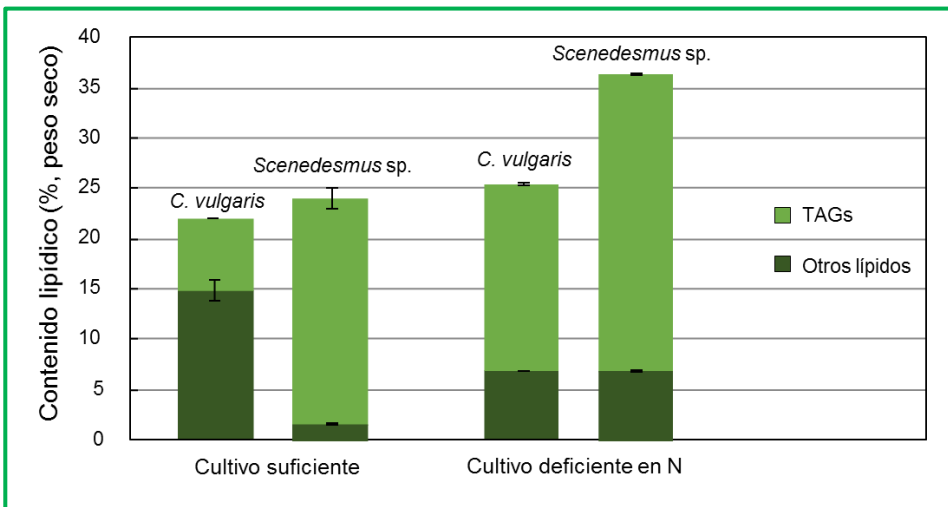
Como sustratos de las reacciones de trans/esterificación se utilizaron tanto aceites como ácidos grasos libres (FFAs). Se estudiaron los principales factores que afectan a la producción de biodiésel, como la temperatura de reacción, el tipo de donador de grupos alquilo, la proporción del mismo, así como el modo de agitación de la mezcla de reacción, el efecto de disolventes sobre las mCLEAs y su uso en la mezcla de reacción.

La cantidad del biocatalizador en proporción al sustrato (aceite o FFAs) se fijó inicialmente en 1% (mCLEAs:sustrato, p/p) para todas las reacciones.

### 2.1. Cultivo y caracterización de las microalgas

Según los resultados proporcionados por CENER, la mezcla total de lípidos extraída de biomasa de *C. vulgaris* contenía TAGs, fosfolípidos y glucolípidos, que representaban aproximadamente el 22% (p/p) de la biomasa seca. Sin embargo, sólo algunos de los lípidos totales se pueden convertir en biodiésel. La composición lipídica de *C. vulgaris* var L3 varió considerablemente en función de si la microalga había sido sometida o no a deficiencia de nitrógeno. En células deficientes en nitrógeno los lípidos totales suponían hasta el 25,5% (p/p) incrementándose notablemente la composición de TAGs, desde un 7% hasta un 18,5% (p/p) del contenido total de la biomasa (Figura 4.4).

En cuanto a *Scenedesmus* sp., la cantidad de lípidos totales almacenados fue sensiblemente mayor en ambas condiciones nutricionales de cultivo, alcanzando un 36,5% (p/p) en biomasa sometida a deficiencia de nitrógeno. En cultivos deficientes en nitrógeno muchas microalgas son capaces de dirigir sus vías metabólicas hacia la acumulación de lípidos de reserva (TAGs), que son los más adecuados para obtener biodiésel (Breuer *et al.* 2012).



**Figura 4.4:** Contenido lipídico de la biomasa de *C. vulgaris* y *Scenedesmus* sp. en cultivos sometidos o no a deficiencia de N. Se indica el porcentaje de TAGs y otros lípidos (glucolípidos, fosfolípidos...) presentes en el contenido de lípidos totales (% peso seco).

La deficiencia nitrogenada causaba en las microalgas cambios relevantes en su composición química, como una disminución en el contenido de proteína y clorofila (Ikarán *et al.* 2015) y un aumento progresivo en el de lípidos, específicamente TAGs. En cuanto a la composición de FFAs, los resultados variaban dependiendo del modo de cultivo de la microalga. Como han indicado Ikarán *et al.* (2015), la deficiencia de nitrógeno en cultivo de *C. vulgaris* var L3 modifica significativamente la composición de FFAs, apreciándose un notable aumento de los ácidos grasos saturados (C 16:0) y monoinsaturados (C 18:1) en



detrimento de los poliinsaturados (*Polyunsaturated Fatty Acids*, PUFAs), como, por ejemplo, C 18:2, C 18:3, C 16:3 y C 16:4 (Figura 4.5) (Picó et al. 2017).

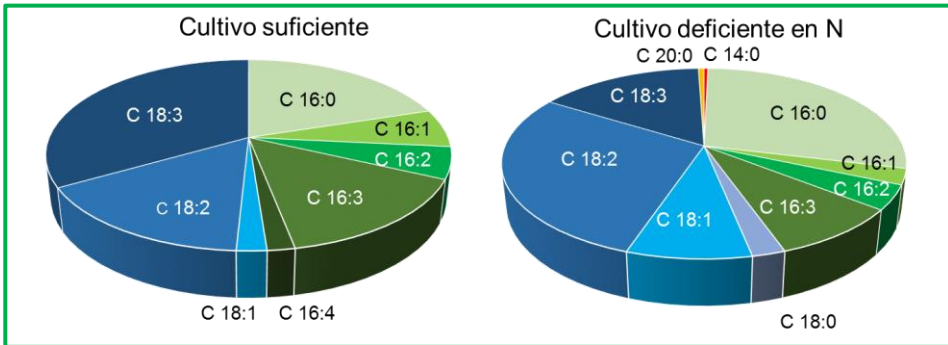


Figura 4.5: Composición de ácidos grasos de los lípidos de *C. vulgaris* var L3 cultivada en suficiencia y deficiencia de nitrógeno.

Por otra parte, *Scenedesmus* sp. presentó una respuesta similar al cultivo en deficiencia de nitrógeno, aumentando los ácidos grasos saturados (C 16:0 y C 18:0) y monoinsaturados (C 18:1) en detrimento de los PUFAs (C 18:3 y C 16:4) (Figura 4.6).

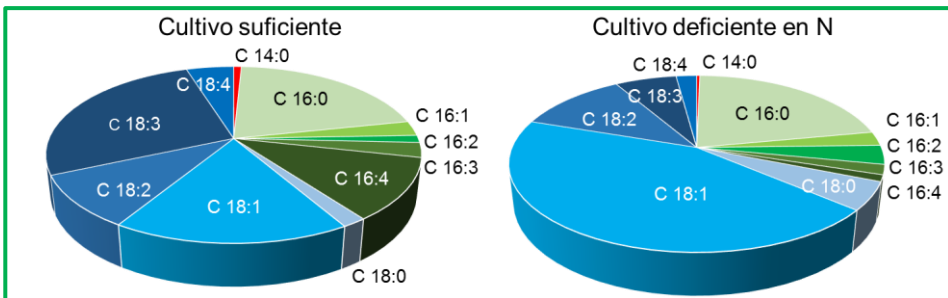


Figura 4.6: Composición de ácidos grasos de los lípidos de *Scenedesmus* sp. cultivada en suficiencia y deficiencia de nitrógeno.

Comparando la composición de FFAs de las dos microalgas se observa que, aunque presentan ácidos grasos parecidos, el porcentaje de cada uno de ellos difiere, siendo mayoritario el oleico (C 18:1) en *Scenedesmus* sp., mientras que *C. vulgaris* tiene una mayor proporción de linoleico (C 18:2).

## 2.2. Extracción lipídica

Los aceites microalgales se han considerado una fuente novedosa y prometedora para producir biocombustibles (Mubarak *et al.* 2015). Sin embargo, la viabilidad económica de la producción de biodiésel a partir de estos aceites depende principalmente del coste energético necesario para el procesado de la biomasa y la extracción de lípidos (Kim *et al.* 2013a). Uno de los principales problemas es la dificultad para extraer lípidos saponificables (que sean capaces de convertirse en biodiésel), sin extraer los lípidos estructurales insaponificables. Por lo tanto, encontrar el método más eficiente y las condiciones óptimas para extraer los lípidos microalgales adecuados son cuestiones importantes para reducir los costes de producción de biodiésel (Mubarak *et al.* 2015).

### 2.2.1. Extracción Soxhlet

Inicialmente, en el centro asociado CENER se extrajo de la biomasa seca de *C. vulgaris* un 2,2% (p/p) de lípidos con *n*-hexano, en los que los TAGS representando el 58% en peso, es decir, el 1,2% de la biomasa total. Sin embargo, se estimó que en la biomasa micoralgal era de un 10,78% en peso de TAGs según Lepage y Roy (1984).

Debido a los resultados obtenidos, se realizó una segunda extracción con cloroformo:metanol (2:1, v/v), en vez de *n*-hexano, obteniéndose así un 10,39% (p/p) de lípidos totales. Tras la extracción, la biomasa todavía presentaba color, indicando que la extracción era incompleta. Por este motivo se realizó una tercera extracción con cloroformo:metanol, extrayéndose un 8,69% en peso adicional de lípidos totales.

La extracción Soxhlet se optimizó antes de proceder a la extracción de lípidos con mayor cantidad de biomasa. Este método sirvió de referencia inicial para determinar el contenido de lípidos en muestras pequeñas, pero parece un método

poco fiable para extraer grandes cantidades de biomasa. Se concluyó que la mejor extracción, a partir de 7,5 g de biomasa seca, se conseguía utilizando 100 ml de cloroformo:metanol, (2:1, v/v), durante 8 h (Picó *et al.* 2017).

### 2.2.2. Extracción en matraz agitado

Las condiciones anteriormente determinadas se usaron para extraer mayores cantidades de biomasa seca en un matraz con agitación magnética. Utilizando estas condiciones, la mayor parte de los lípidos se obtenían en la primera extracción con cloroformo:metanol (22,99% en peso de lípidos y 12,22% en peso de TAG). Los lípidos obtenidos en la segunda extracción no superaban el 2% en peso y mostraban menor contenido de TAGs (0,55% en peso), siendo su perfil de FFAs algo diferente al obtenido en la primera extracción.

### 2.2.3. Extracción con H<sub>2</sub>O subcrítica

El centro asociado TECNALIA desarrolló un proceso de extracción diferente usando agua subcrítica (a 60 bares y 200°C). Los resultados de extracción fueron bastante pobres, alcanzando como máximo un 6,7% (p/p) de lípidos totales de la biomasa, de los cuales solo el 1,1% fueron TAGs.

### 2.2.4. Extracción por saponificación

Al extraer biomasa de *C. vulgaris* por saponificación, se obtuvo un 34,7% en peso de lípidos totales, que representaban el 95,95% en peso de FFAs en biomasa (Picó *et al.* 2017).

Ante estos buenos resultados, se empleó este método para extraer biomasa de *Scenedesmus* sp. obteniendo valores similares: 36,3% para lípidos totales y un 92,1% en peso para FFAs.

La saponificación presenta una serie de ventajas frente a los anteriores métodos de extracción:

- I. La evidente mejora de los rendimientos de extracción, pudiéndose extraer FFAs incluso de lípidos insaponificables.
- II. El menor gasto energético, al poder usar biomasa húmeda en vez de seca, ya que su secado supone el 25% del gasto energético en la producción de biodiésel (Yoo *et al.* 2012).
- III. El uso de disolventes menos tóxicos y más respetuosos con el medio ambiente.
- IV. La separación de la fracción insaponificable de una manera fácil, permitiendo la posterior extracción, a partir de estos residuos insaponificables, de carotenos, esteroides, tocoferol, etc.) como otros bioproductos de valor añadido.
- V. La obtención de una muestra más pura en FFAs para producir biodiésel.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos (Tabla 4.1), se fijó la saponificación como el método más adecuado para extraer lípidos de biomasa húmeda y para su posterior conversión en biodiésel. Esta extracción se empleó posteriormente para extraer lípidos de la biomasa de *Scenedesmus* sp.

**Tabla 4.1: Resumen de los métodos utilizados para la extracción de lípidos de la biomasa de *C. vulgaris* var L3.** Se muestran los disolventes empleados y el tiempo de extracción necesario, así como los rendimientos en porcentaje (p/p de la biomasa total) de lípidos y TAGs.

Método de extracción	Disolvente	Tiempo (h)	Lípidos (%)	TAGs (%)
Soxhlet	<i>n</i> -Hexano	14	2,2	1,2
	Cloroformo:metanol (2:1, v/v)	15	10,39	--
	Cloroformo:metanol (2:1, v/v)	15	8,69	--
		<b>44 h</b>	<b>21,28%</b>	<b>10,6%</b>
Matraz agitado	Cloroformo:metanol (2:1, v/v)	0,5	23	12,22
	Cloroformo:metanol (2:1, v/v)	0,5	2	0,55
		<b>1 h</b>	<b>25%</b>	<b>12,8%</b>
H <sub>2</sub> O subcrítica	Agua subcrítica (60 bares a 225°C)	<b>1 h</b>	<b>6,7%</b>	<b>1,1%</b>
Saponificación	Etanol y KOH	<b>3 h</b>	<b>34,7%</b>	<b>96%</b>

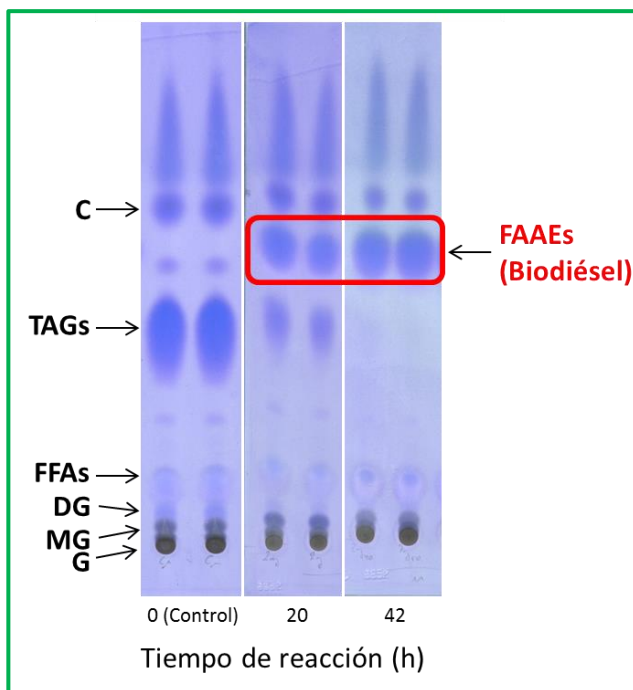
## 2.3. Producción de biodiésel

### 2.3.1. Aceites

#### 2.3.1.1. Aceite 1

La consistencia casi sólida dificultaba el manejo del aceite crudo, así como el control exacto de algunos parámetros de la reacción, como la relación molar aceite:alcohol. Además, la consistencia del aceite también dificultaba el posterior análisis del biodiésel obtenido. Ambos problemas se solventaron, en parte, añadiendo un disolvente a la mezcla de reacción (*n*-hexano) y siguiendo el progreso de la misma por análisis semicuantitativo en TLC.

Después de 42 h de reacción a 40°C, y utilizando 2-propanol como donador de grupos alquilo, el análisis por TLC mostró que la mayoría de TAGs se convirtieron en biodiésel (FAAEs) (Figura 4.7).

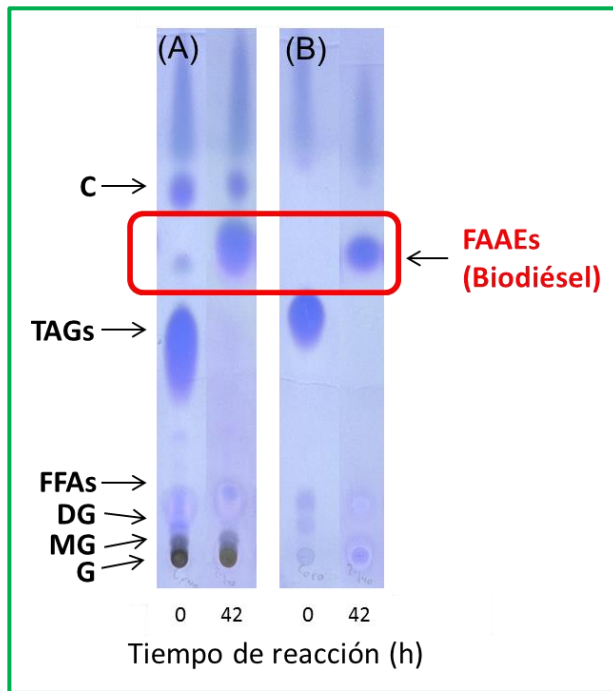


**Figura 4.7: Seguimiento por TLC de la conversión en biodiésel de “Aceite 1” a diferentes tiempos de reacción.** La muestra de “Aceite 1” 30 mg, (0,87 mmol), disuelto en 100  $\mu$ l de *n*-hexano y 400  $\mu$ l (5,2 mmol) de 2-propanol, se incubó a 40°C con un 1% (p/p) de mCLEAs durante los tiempos indicados. Posteriormente, se analizaron las muestras de la reacción en placas de gel de sílice, que se revelaron con Azul de Coomassie. **C:** Pigmentos amarillentos (carotenoides), **FAAEs:** Ácidos grasos alquilados (biodiésel), **TAGs:** Triglicéridos, **DG:** Diglicéridos, **MG:** Monoglicéridos, **FFAs:** Ácidos grasos libres, **G:** Pigmentos verdosos (clorofilas).

### 2.3.1.2. Aceite 2

El “Aceite 2” se obtuvo a partir de biomasa de *C. vulgaris*, utilizando la misma extracción que en el caso del “Aceite 1”. Sin embargo, el método de extracción difirió, en que se realizó en un matraz agitado magnéticamente, permitiendo una mejor extracción de los lípidos en un menor tiempo. Pese a esto, el “Aceite 2” también presentaba consistencia sólida por la presencia de pigmentos (carotenoides, clorofilas...) y lípidos no saponificables. El material no saponificable representaba el 50% (p/p) de la biomasa extraída.

Como muestra la Figura 4.8, los resultados obtenidos fueron semejantes a los obtenidos con el “Aceite 1”, y al cabo de 42 h la conversión de TAGs en biodiésel fue casi completa.



**Figura 4.8: Seguimiento por TLC de la conversión enzimática en biodiésel de “Aceite 2”.** (A) Muestra de “Aceite 2” (30 mg) y (B) aceite de oliva (15 mg) (control). Los aceites se disolvieron en 100 ul de *n*-hexano y 400 ul (5,2 mmol) de 2-propanol, se incubaron a 40°C con 1%, (p/p) de mCLEAs durante 42 h. **C:** Pigmentos amarillentos (carotenoides), **FAAEs:** Ácidos grasos alquilados (biodiésel), **TAGs:** Triglicéridos, **DG:** Diglicéridos, **MG:** Monoglicéridos, **FFAs:** Ácidos grasos libres, **G:** Pigmentos verdes (clorofilas).

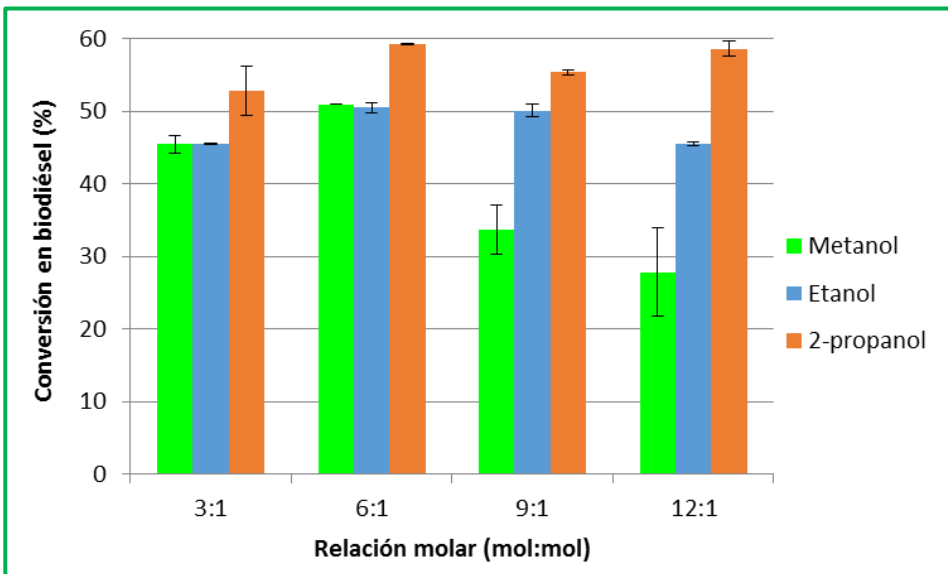
La presencia de lípidos no saponificables, en concreto fosfolípidos, no solo afecta a la consistencia del aceite y a su manipulación, sino que puede afectar a la actividad enzimática (Watanabe *et al.* 2002; Sankaran *et al.* 2016). Tanto con el “Aceite 1” como con el “Aceite 2” no se detectó, en principio, un descenso de actividad, ya sea por la robustez del biocatalizador o porque la muestra no presentaba una alta concentración de fosfolípidos que disminuyesen la actividad del enzima.

### 2.3.1.3. Relación molar

Debido a la problemática con los aceites de *C. vulgaris* anteriormente descrita, se decidió optimizar la reacción utilizando aceite de oliva como sustrato modelo.

La relación molar de alcohol en proporción al aceite es un parámetro importante en la reacción de producción de biodiésel, ya que la velocidad de la misma depende de la concentración de alcohol. Elevadas concentraciones de alcohol no siempre conllevan un aumento de la velocidad de reacción, incluso pueden llegar a inhibir el enzima.

Se siguió la conversión en biodiésel del aceite de oliva al cabo de 24 h en una reacción en la que, además, se comparó la respuesta de las mCLEAs a la presencia de dos alcoholes primarios (etanol y metanol) y uno secundario (2-propanol) (Figura 4.9).



**Figura 4.9: Efecto de la relación molar en la conversión de biodiésel.** El aceite de oliva (200 mg) se incubó a 30°C con 2 mg de mCLEAs (1%, p/p) durante 24 h en presencia de metanol, etanol o 2-propanol a las proporciones indicadas (alcohol:aceite). Se determinó la conversión mediante HPLC.



En las reacciones en las que se utilizó 2-propanol como donador de alquilo, no se apreció ningún aumento significativo de conversión a partir de la proporción 6:1 (alcohol:aceite), manteniéndose constante para proporciones mayores. De igual manera, las reacciones en las que se emplearon alcoholes primarios como donador de grupos alquilo alcanzaron su valor máximo en la proporción 6:1, pero a mayor proporción se apreció una clara disminución de la conversión.

Esta disminución puede deberse a que se ha superado el límite de solubilidad del alcohol en la mezcla de reacción, provocando la aparición de burbujas de alcohol puro, que acaban inhibiendo la actividad enzimática (Lam *et al.* 2010; Rodrigues *et al.* 2010; Kulschewski *et al.* 2013; Lotti *et al.* 2015).

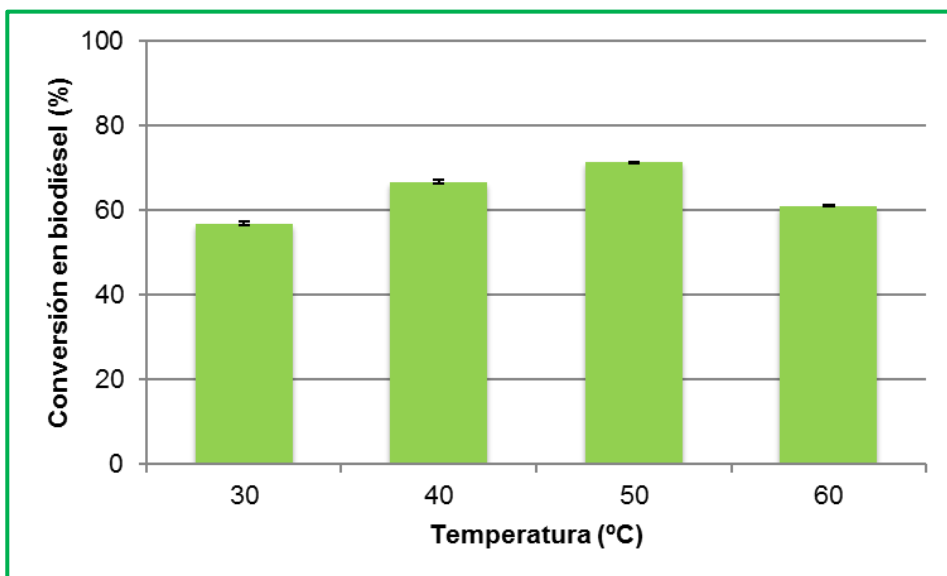
#### **2.3.1.4. Estudio de la temperatura**

Uno de los factores que mayor gasto energético requiere en la obtención de biodiésel es la temperatura a la que se realiza la transformación del aceite en biodiésel. Por ello, se determinó la temperatura óptima de la reacción.

Para ello, se seleccionaron 4 temperaturas que abarcaban el intervalo al que se puede trabajar con CALB (Uppenberg *et al.* 1995), desde 30°C hasta 60°C. Se empleó como sustrato aceite de oliva y 2-propanol como donador de grupos alquilo en una relación molar (alcohol:aceite) 6:1 (Figura 4.10).

La mayor producción de biodiésel se alcanzó al cabo de 24 h a 50°C, si bien fueron cercanos los valores a las demás temperaturas. En estudios previos realizados en este Grupo (Cruz-Izquierdo *et al.* 2014), se observó que la estabilidad del biocatalizador se veía comprometida a temperaturas altas (50 y 60°C), observándose una caída de la conversión en sucesivos ciclos de reacción. Por ello, y teniendo en cuenta otros factores (como la velocidad de reacción y el coste que supone mantener una reacción a una temperatura alta), se concluyó que era conveniente realizar las reacciones a 30°C, pues a esta temperatura se alcanzaba

un aceptable grado de conversión, a velocidad razonable y con bajo coste energético.



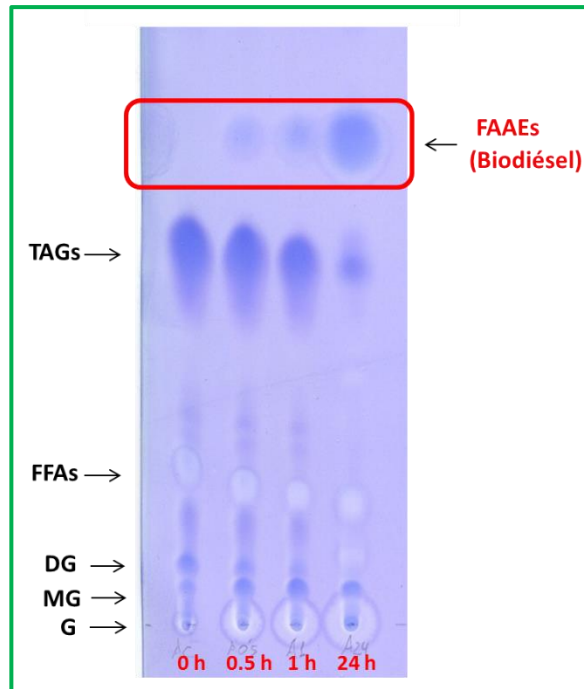
**Figura 4.10: Conversión en biodiésel de aceite de oliva a 24 h a diferentes temperaturas de reacción.** La mezcla de reacción contenía aceite de oliva, 200 mg (0,23 mmol) y 106,15  $\mu$ l (1,39 mmol) de 2-propanol (proporción 6:1, alcohol:aceite). Se incubó a 30, 40, 50 y 60°C con 2 mg de mCLEAs (1%, p/p) durante 24 h. Posteriormente, se analizaron muestras de la reacción mediante HPLC.

### 2.3.1.5. Aceite 3

Para un mejor estudio de la reacción, se decidió sustituir el aceite de oliva por un aceite modelo que simulase el aceite de *C. vulgaris*. Por ello, se diseñó el “Aceite 3” mezclando aceites de palma (80% v/v), soja (10% v/v) y oliva (10% v/v).

La alta volatilidad del *n*-hexano provocó errores metodológicos, por lo que se sustituyó este co-disolvente por el mismo alcohol utilizado en la reacción. Por lo tanto, a partir de ahora el alcohol tiene una doble función; actuar como co-disolvente y, simultáneamente, ejercer de donador de grupos alquilo. La utilización de alcohol como disolvente obligó a modificar la relación molar alcohol:aceite, siendo a partir de ahora 30:1 (alcohol:aceite) en las reacciones de transesterificación de aceites.

Se analizó la utilidad del “Aceite 3” siguiendo la reacción por TLC. La mezcla de reacción estaba compuesta por “Aceite 3” y etanol en una relación molar 30:1 (alcohol:aceite), incubándose a 30°C con agitación mecánica en un brazo giratorio durante 24 h (Figura 4.11).



**Figura 4.11: Seguimiento por TLC de la conversión en biodiésel del “Aceite 3”.** Muestra de “Aceite 3” (200 mg) y etanol en una proporción molar (30:1, alcohol:aceite), se incubaron a 30°C con 2 mg de mCLEAs durante 24 h. Posteriormente, se analizaron muestras de la reacción en placas de gel de sílice, que se revelaron con Azul de Coomassie. **FAAEs:** Ácidos grasos alquilados (biodiésel), **TAGs:** Triglicéridos, **DG:** Diglicéridos, **MG:** Monoglicéridos, **FFAs:** Ácidos grasos libres, **G:** Pigmentos verdosos (clorofilas).

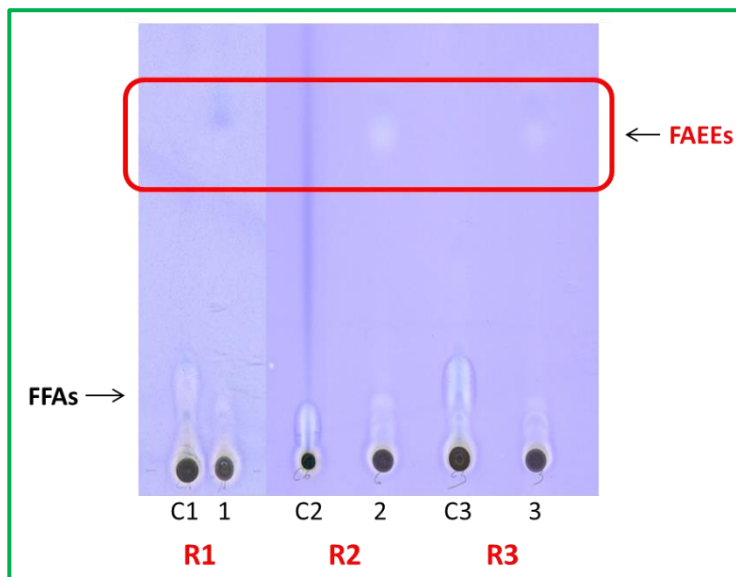
Se obtuvieron resultados satisfactorios, y en apenas 24 h se alcanzó una elevada conversión de TAGs y FFAs en biodiésel. A pesar de la elevada proporción alcohol:aceite empleada no se apreció un descenso en la actividad enzimática.

### 2.3.1.6. Aceite 4

Por otro lado, se empleó un método diferente para extraer los lípidos utilizando agua subcrítica, es decir, agua a alta temperatura y presión (a partir de 175°C y 60 bares).

Se estudiaron diferentes temperaturas y tiempos de extracción que dieron lugar a 3 muestras con consistencia sólida debido a su alto contenido de lípidos no saponificables. Al igual que ocurría con los aceites extraídos con disolventes orgánicos (“Aceite 1” y “Aceite 2”), la consistencia sólida del aceite originaba el difícil control de las variables de la reacción de transesterificación.

La muestra 1 de “Aceite 4” había sido extraída a 175°C durante 60 min, mientras que las 2 y 3 habían sido extraídas a 225°C durante 60 y 90 min, respectivamente. Cada muestra se mezcló con etanol en una relación molar (alcohol:aceite) 30:1, incubándose con 2 mg de mCLEAs a 30°C durante 24 h (Figura 4.12).



**Figura 4.12: Conversión en biodiésel del “Aceite 4”.** R1: 75 mg de la muestra 1, siendo C1 el control sin mCLEAs, y 1 la muestra de reacción. R2: 68 mg de la muestra 2, siendo C2 el control sin mCLEAs y 2 la muestra de reacción. R3: 57 mg de la muestra 3, siendo C3 el control sin mCLEAs y 3 la muestra de reacción. Se emplearon 2 mg de mCLEAs con etanol en una relación molar (alcohol:aceite) 30:1, a 30°C durante 24 h. **FAEs**: Ésteres etílicos de ácidos grasos (biodiésel), **FFAs**: Ácidos grasos libres.

Apenas se observó una aparición mínima de biodiésel en la placa de TLC tras 24 h de reacción. Además, no se detectó la presencia de TAGs en la muestra original, pero sí de FFAs. La observada falta de actividad del biocatalizador podría deberse a la presencia de alguna traza de los disolventes utilizados en la extracción, o al bajo contenido de lípidos saponificables de la muestra.

Los métodos de extracción de lípidos microalgales estudiados hasta ahora conllevan una serie de problemas con el aceite resultante:

- I. La consistencia sólida del aceite dificultaba su manejo y el control preciso de variables en la conversión enzimática.
- II. La viscosidad de los aceites dificultaba la catálisis alcalina realizada por el centro asociado CENER, que se traducía en una baja conversión, haciendo inviable esta vía de obtención de biodiésel.
- III. La utilización de disolventes tóxicos (*n*-hexano, cloroformo...) para extraer los lípidos impedía el aprovechamiento de la biomasa deslipidizada para otros usos como la producción de biogás.

Por todo ello, se modificó el método de extracción por una saponificación que permitiera la obtención de un producto más puro, admitiendo, además, el posible empleo de la biomasa deslipidizada para otros usos (Picó *et al.* 2017). Este nuevo método de extracción conlleva la obtención de FFAs en vez de aceite (triglicéridos).

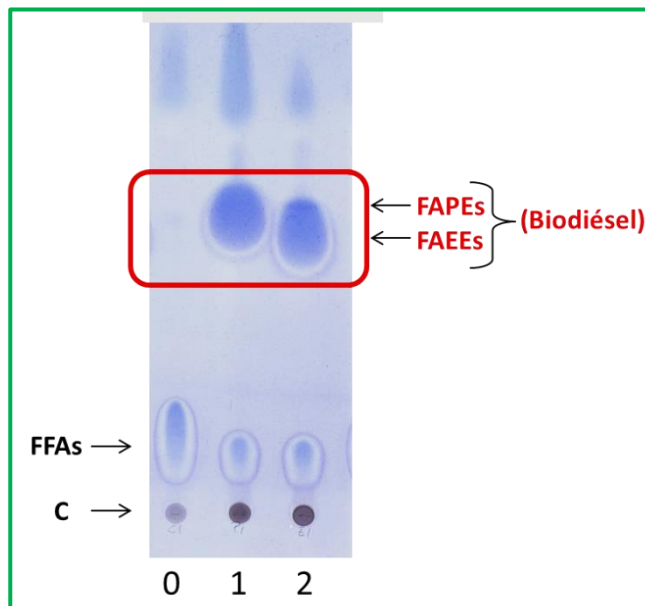
La lipasa CALB es capaz de catalizar reacciones tanto de transesterificación como de esterificación, por lo que este cambio de sustrato no influyó en la obtención de biodiésel. Sin embargo, la catálisis alcalina tuvo que sustituirse por una catálisis ácida, ya que la primera no admite muestras con alto contenido en FFAs.

## 2.3.2. Ácidos grasos

### 2.3.2.1. FFAs de *Chlorella vulgaris*

Ante el cambio de sustrato lipídico empleado se necesitó modificar algunos parámetros de la reacción, como la estequiometría de la producción de biodiésel. Esto se debe a que para producir biodiésel a partir de FFAs se requiere un mínimo de 1 mol de donador de alquilo por cada mol de ácido graso, en vez de la relación molar (alcohol:aceite) 3:1 usada cuando se emplea aceite como sustrato. Se modificó el papel del alcohol en la mezcla de reacción, siendo ahora donador de alquilos y disolvente, por lo que la relación molar (alcohol:FFAs) se modificó a 10:1.

Se estudió la conversión del nuevo sustrato en una mezcla de reacción que contenía FFAs y etanol ó 2-propanol en una relación molar (alcohol:FFAs) de 10:1, incubándose a 30°C con agitación mecánica durante 10 h (Figura 4.13).



**Figura 4.13: Conversión en biodiésel de muestras de FFAs de *C. vulgaris*.** Mezcla de reacción: FFAs (136 mg) con alcohol, relación molar (alcohol:FFAs) 10:1 y 1% mCLEAs (p/p), incubado a 30°C durante 10 h. **O**: Control sin mCLEAs; **1**: Muestra de reacción con 2-propanol; **2**: Muestra de reacción con etanol. **FAPEs**: Ésteres propílicos de ácidos grasos (biodiésel), **FAEEs**: Ésteres etílicos de ácidos grasos (biodiésel), **FFAs**: Ácidos grasos libres, **C**: Pigmentos verdes (clorofilas).

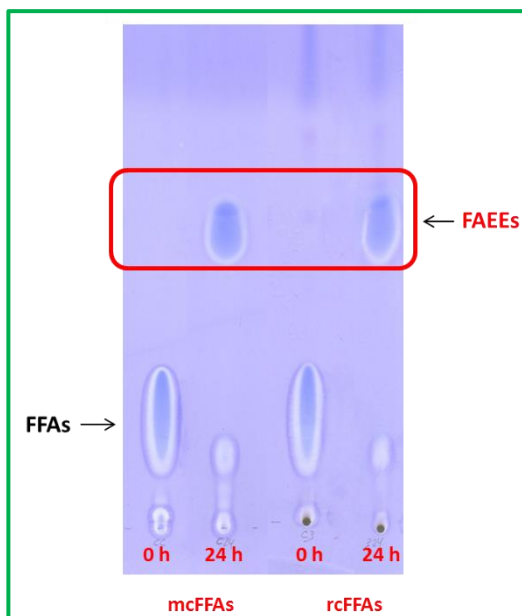
Como muestra, ya sea utilizando etanol ó 2-propanol como donador de grupos alquilo. Aunque la conversión fue notable, todavía quedaba sin transformar una cantidad apreciable de FFAs. Hay que señalar que esta reacción transcurrió sólo durante 10 h, y no durante las 24 h habituales en estudios previos.

### **2.3.2.2. FFAs modelo de *C. vulgaris* (mcFFAs)**

Ante la necesidad de esterificar una mayor cantidad de lípidos se diseñó una mezcla modelo de ácidos grasos comerciales (mcFFAs) que se parecía a la de ácidos grasos obtenidos a partir de *C. vulgaris* (rcFFAs). Se validó dicha mezcla comparando los resultados obtenidos con ella con los obtenidos con la mezcla real de ácidos grasos (Figura 4.14).

Las condiciones empleadas para la reacción de esterificación catalizada por mCLEAs fueron a 30°C, durante 24 h, utilizando etanol como donador de alquilo. Los resultados se analizaron por TLC y GC, calculando por este último método conversiones en biodiésel del 74,15% y 70,37%, para mcFFAs y rcFFAs, respectivamente.

Como muestra la Figura 4.14, y a tenor de los resultados de GC, se concluyó que la mezcla modelo (mcFFAs) reproduce con exactitud la mezcla real (rcFFAs), siendo su empleo como sustrato adecuado para futuros ensayos.



**Figura 4.14: Conversión en biodiésel de muestras de mcFFAs y rcFFAs.** Las incubaciones se realizaron a 30°C durante 24 h con 1% mCLEAs (p/p) y con etanol como donador a una relación molar (alcohol:FFAs) 10:1. **FAEEs:** Ésteres etílicos de ácidos grasos (biodiésel), **FFAs:** Ácidos grasos libres.

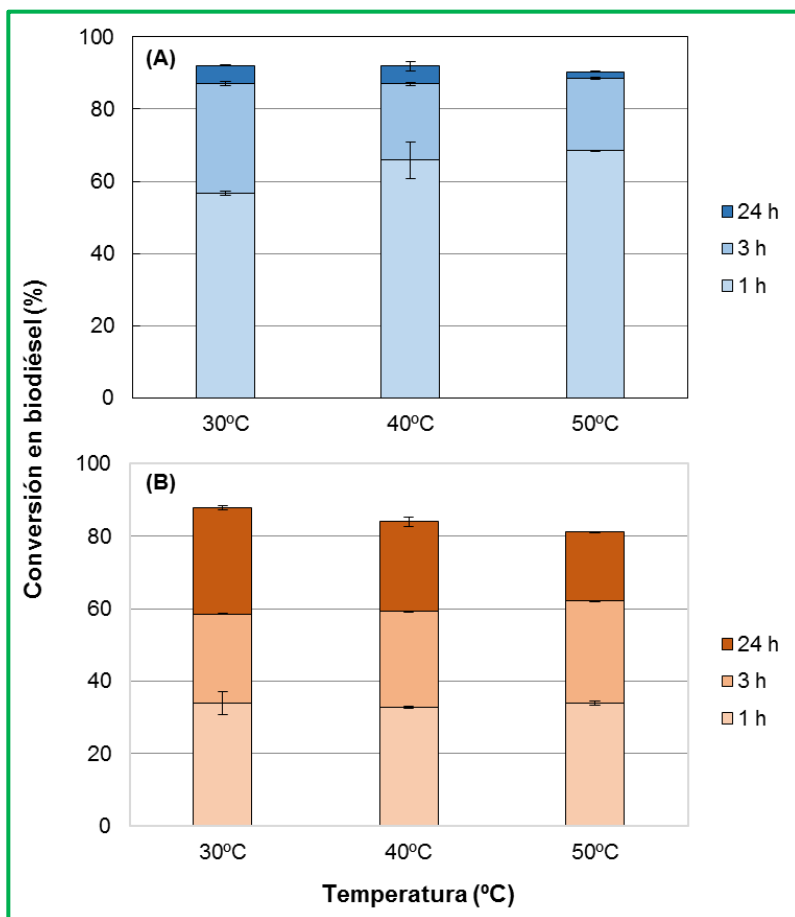
### 2.3.2.3. Estudio de la temperatura

Se realizó un estudio detallado de la temperatura óptima de reacción, aunque ya se habían obtenido resultados preliminares con los aceites. Para el ensayo se utilizó como sustrato la mezcla de ácidos grasos modelo (mcFFAs), y etanol (Figura 4.15; A) o 2-propanol (Figura 4.15; B) como donador de grupos alquilo.

Después de 3 h de reacción a 30°C, se observó una conversión del 87% con etanol, mientras que con 2-propanol fue más baja (aproximadamente 59%). Las reacciones con 2-propanol mostraron, en todos los tiempos y temperaturas, una menor conversión que con etanol. En las reacciones en las que se empleó etanol como donador se notaron diferencias entre las temperaturas a tiempos cortos, pero la conversión se había igualado a las 3 h. Por esto, se fijó 30°C como temperatura óptima para futuros ensayos, ya que a esa temperatura se alcanzaba



una alta conversión de biodiésel a bajo coste energético y empleando tiempos moderadamente cortos (3 h).



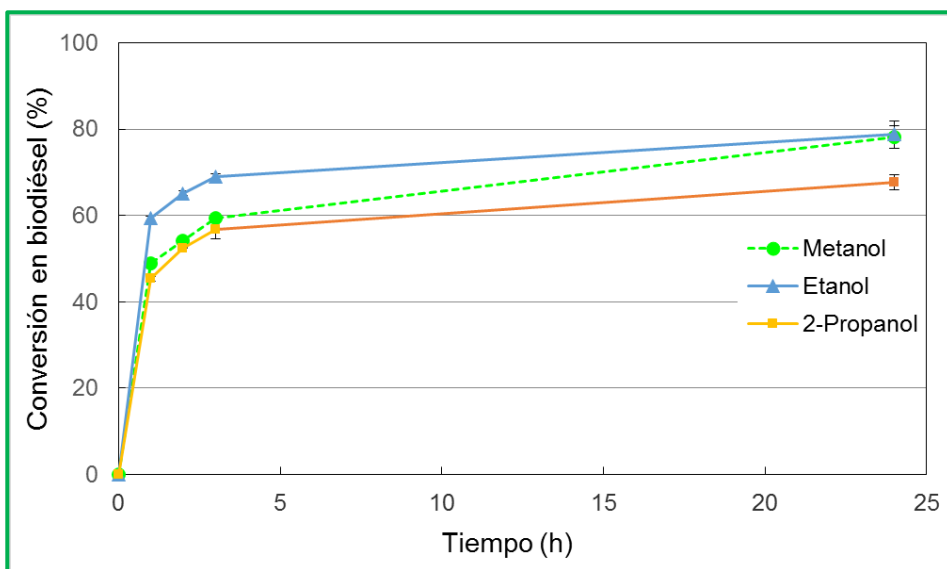
**Figura 4.15: Efecto de la temperatura en la conversión en biodiésel de una mezcla de FFAs modelo (mcFFAs).** La preparación de mFFAs se incubó en presencia de etanol (A) o 2-propanol (B), durante 1, 3 y 24 h a las temperaturas indicadas. La reacción se inició al añadir 1% mCLEAs (p/p) y la conversión en biodiésel se determinó por HPLC.

#### 2.3.2.4. Estudio del donador de grupos alquilo

Se utilizan diversos alcoholes como donantes de alquilo para obtener biodiésel, desde alcoholes primarios (etanol o metanol) hasta secundarios (2-propanol o butanol). En la catálisis química se tiende a utilizar alcoholes primarios debido a su menor coste económico, pero en la conversión enzimática

se evita su uso ya que son inhibidores de la actividad enzimática. La lipasa CALB puede utilizar gran variedad de alcoholes, incluso primarios, si bien la concentración ha de ser moderada para que la actividad enzimática no se vea comprometida.

Se estudió el efecto de los alcoholes primarios metanol y etanol, y del secundario 2-propanol como donadores de grupos alquilo en las reacciones de esterificación (Figura 4.16).



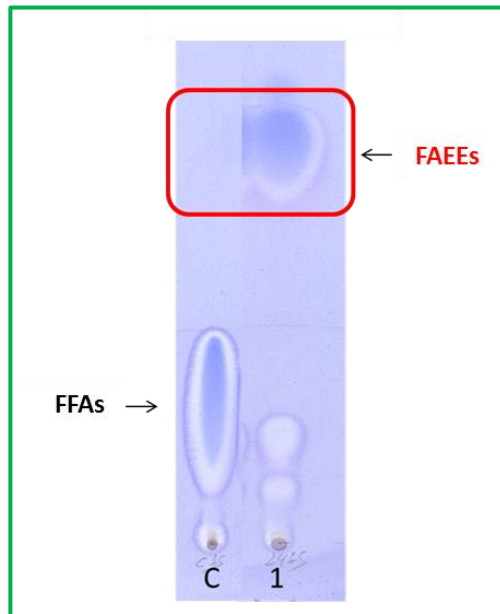
**Figura 4.16: Efecto del alcohol en la conversión de mcFFAs en biodiésel.** La preparación de mcFFAs se incubó a 30°C durante 24 h en presencia de metanol, etanol o 2-propanol. La reacción se inició por adición de 1% mCLEAs (p/p). Alícuotas de las muestras se retiraron a los tiempos indicados y la conversión se determinó por HPLC.

Aunque la tasa de conversión con etanol en las primeras 3 h fue mayor que con metanol, se obtuvo valores similares al cabo de 24 h de reacción ( $78 \pm 0,5\%$ ). Sin embargo, se midió una conversión a tiempos iniciales y finales más baja con 2-propanol (68%). Por estas razones, el 2-propanol se descartó como donador de grupo alquilo y no se volvió a usar en los siguientes experimentos.

### 2.3.2.5. FFAs de *Scenedesmus* sp.

Ajustados algunas condiciones de la extracción y reacción, se decidió estudiar otra microalga que, en un principio, presentaba mejores perspectivas en cuanto a almacenamiento de lípidos se refiere. Se realizó la extracción de lípidos según el método de saponificación anteriormente validado para *C. vulgaris*.

La biomasa extraída se esterificó mediante mCLEAs de CALB, empleando etanol como donador de grupos y disolvente, y agitando las muestras mecánicamente (Figura 4.17).

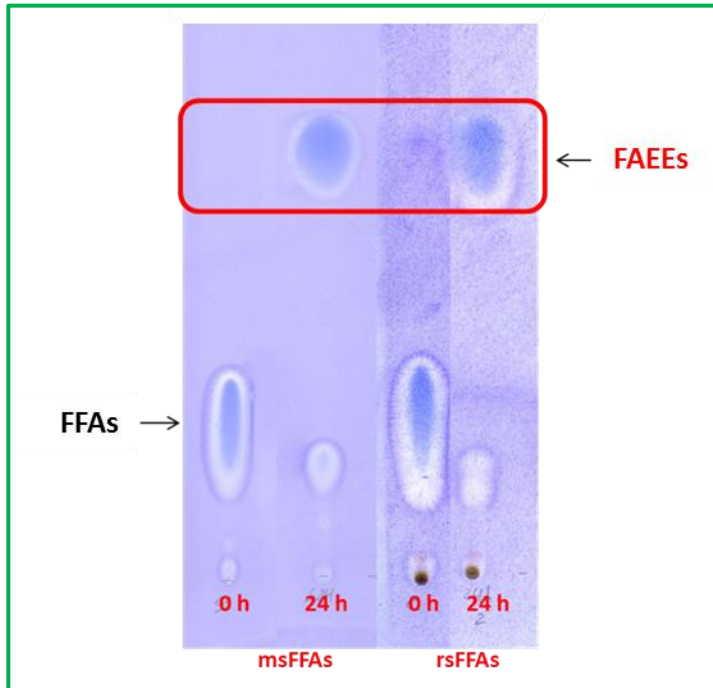


**Figura 4.17: Conversión en biodiésel de muestras de rsFFAs de *Scenedesmus* sp.** Mezcla de reacción: FFAs (155 mg) con etanol, relación molar (alcohol:FFAs) 10:1 y 1% mCLEAs (p/p), incubado a 30°C durante 24 h. **C:** Control sin mCLEAs; **1:** Muestra de reacción con etanol como donador de grupos alquilo y disolvente. **FAEEs:** Ésteres etílicos de ácidos grasos (biodiésel), **FFAs:** Ácidos grasos libres.

Tras 24 h de reacción a 30°C se consiguió una elevada conversión de FFAs en biodiésel, siendo casi indetectable los FFAs remanentes.

Al igual que con *C. vulgaris*, se diseñó una mezcla modelo de FFAs similar a la extraída de *Scenedesmus* sp. Se comprobó la validez de esta nueva mezcla,

denominada msFFAs, comparando las conversiones en biodiésel con la original (rsFFAs). Los resultados se muestran en la Figura 4.18.

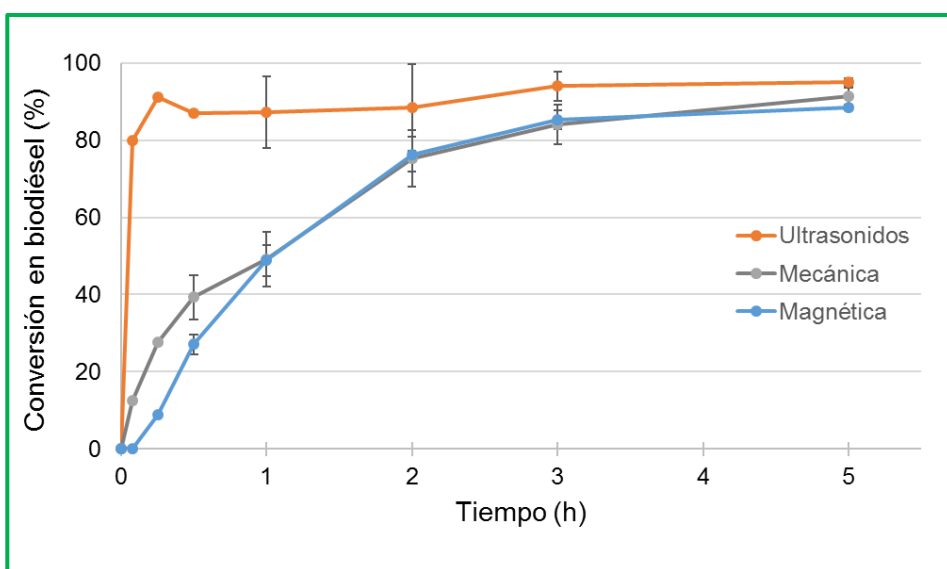


**Figura 4.18: Conversión en biodiésel de muestras de msFFAs y rsFFAs.** Las incubaciones se realizaron a 30°C durante 24 h con 1% mCLEAs (p/p) y con etanol como donador de alquilo en una relación molar (alcohol:FFAs) 10:1. **FAEEs:** Ésteres etílicos de ácidos grasos (biodiésel), **FFAs:** Ácidos grasos libres.

En la conversión a biodiésel analizada por TLC se aprecia un comportamiento similar de las dos mezclas. Las reacciones también fueron analizadas por GC, obteniendo valores del 98,5% de conversión de FFAs en ésteres para la mezcla modelo (msFFAs), y del 96,1% para la muestra original (rsFFAs). Con estos resultados, se concluyó que la mezcla modelo (msFFAs) reproduce con exactitud la mezcla real de FFAs (rsFFAs), siendo la msFFAs un sustrato válido para futuros ensayos.

### 2.3.2.6. Estudio de la agitación

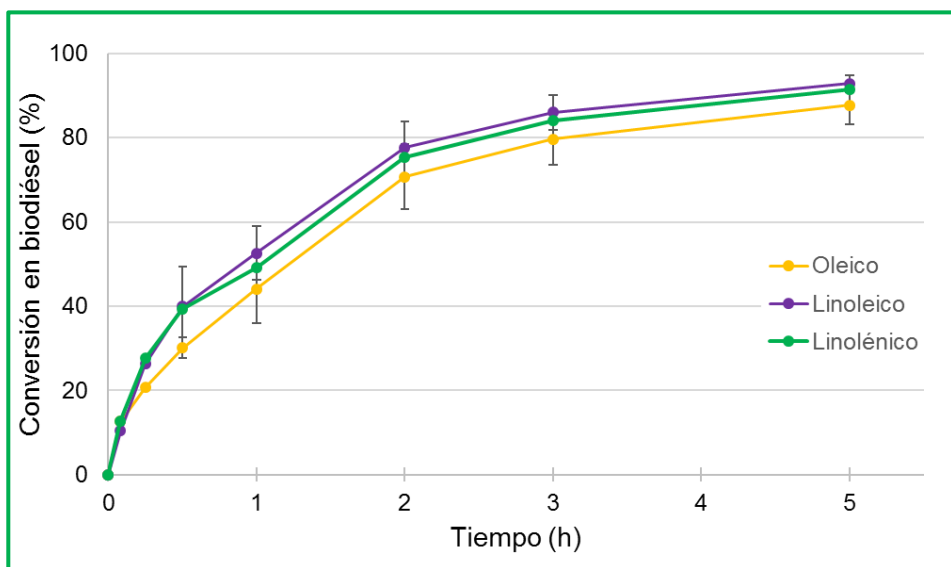
Debido a la inmiscibilidad de los FFAs y el alcohol, se estudió con detalle el efecto de la agitación en la mezcla de reacción. La mezcla estaba compuesta por msFFAs y etanol como donador de grupos alquilo en una relación molar (alcohol:FFAs) 10:1. Se agitó la mezcla mediante ultrasonidos en un sonorreactor, mecánicamente en un brazo giratorio o bien magnéticamente en un equipo Radleys (Figura 4.19). De igual manera, se analizaron por separado los 3 ácidos grasos/ésteres mayoritarios de msFFAs (oleico, linoleico y linolénico), por si hubiera alguna diferencia significativa en la velocidad de conversión de cada uno de ellos por separado (Figura 4.20).



**Figura 4.19: Efecto de la agitación en la conversión en biodiésel de msFFAs.** La preparación de msFFAs se incubó a 30°C durante 5 h en presencia de etanol con agitación mecánica, magnética y por ultrasonidos. La reacción se inició por la adición de 1% mCLEAs (p/p). Alícuotas de las muestras se retiraron a los tiempos indicados y la conversión se determinó por HPLC.

Aunque se obtuvo una conversión final similar con todos los tipos de agitación empleados (alrededor del 90%), la diferencia en sus velocidades iniciales fue considerable. La reacción en la que se empleó ultrasonidos alcanzó su máximo en

menos de 1 h, mientras que las agitadas mecánica y magnéticamente tardaron 4 h más en llegar a la misma conversión. La velocidad entre las reacciones agitadas de forma mecánica o magnética fue muy similar.



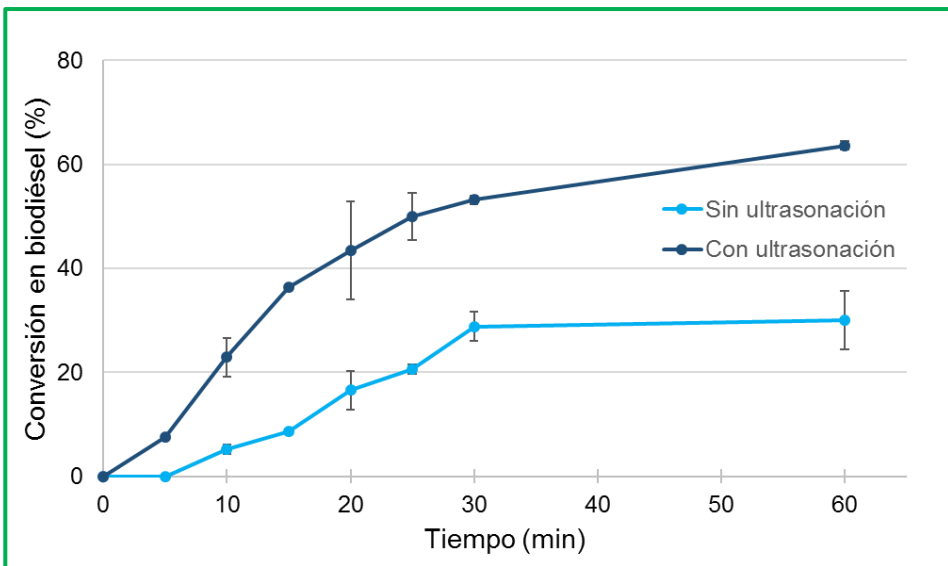
**Figura 4.20: Velocidad de conversión en biodiésel de los ácidos grasos mayoritarios en msFFAs.** La preparación de msFFAs se incubó a 30°C durante 5 h en presencia de etanol con agitación mecánica. La reacción se inició por la adición de 1% mCLEAs (p/p). Alícuotas de las muestras se retiraron a los tiempos indicados y la conversión se determinó por HPLC.

Se obtuvieron perfiles de conversión similares con todos los ácidos grasos empleados. Este resultado indica que la lipasa inmovilizada muestra una especificidad similar para esterificar todos los FFAs presentes, a pesar de sus diferentes longitudes de cadena y/o grado de insaturación. Por otra parte, también indica que la inmovilización de CALB en las mCLEAs no afecta, aparentemente, a su especificidad, y que las propiedades catalíticas de la lipasa inmovilizada son semejantes a las del enzima libre (Anderson *et al.* 1998).

Una vez comprobado el comportamiento similar de las mCLEAs para esterificar distintos FFAs, se empleó la conversión del ácido linolénico como estándar para medir la conversión en las futuras reacciones.

Volviendo a la agitación, la mayor velocidad de reacción observada cuando se agitaba por ultrasonidos se debió a que las mCLEAs se dispersan mejor con este procedimiento, lo que favorece una mejor transferencia de materia.

Ante los buenos resultados obtenidos por Shah y Gupta (2008) al ultrasonar el biocatalizador antes de iniciar la reacción, se estudió el efecto de los ultrasonidos en los primeros minutos de reacción para dispersar las mCLEAs. Para ello, la mezcla de reacción se incubó 1 min en el sonorreactor y después se agitó de forma magnética (Figura 4.21).



**Figura 4.21: Velocidad de conversión en biodiésel del ácido graso linolénico presente en msFFAs.** La preparación de msFFAs se incubó a 30°C durante 1 h en presencia de etanol con agitación magnética. Previamente las muestras se ultrasonaron durante 1 min a 24 kHz y 100 W de modo continuo. Alícuotas de las muestras se retiraron a los tiempos indicados y la conversión se determinó por HPLC.

Se apreció una clara diferencia entre las muestras agitadas inicialmente con ultrasonidos y las no agitadas. La ultrasonación provoca en las mCLEAs una mayor dispersión en el medio de reacción, aumentando así la relación superficie-volumen del biocatalizador (Shah y Gupta 2008; Subhedar y Gogate 2016).

En un principio, el empleo de ultrasonidos parece un método de agitación adecuado para producir biodiésel, a la espera de estudiar los efectos que los ultrasonidos tienen sobre la estabilidad de las mCLEAs (véase Capítulo V de esta Memoria).

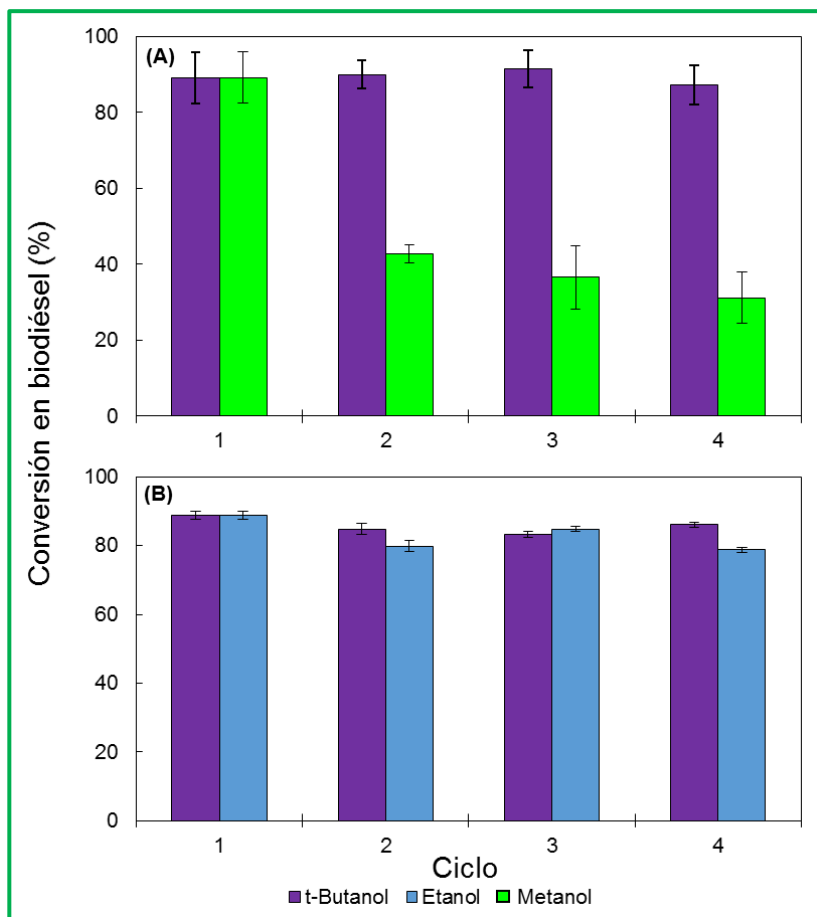
### **2.3.2.7. Efecto de los lavados sobre las mCLEAs**

Como se ha indicado anteriormente, antes de reutilizar el biocatalizador magnético se lavó 3 veces y se resuspendió en el mismo disolvente utilizado en la mezcla de reacción. Debido a esto, se estudió el efecto sobre las mCLEAs de los lavados con metanol o etanol, así como con *t*-butanol. Se incluyó el *t*-butanol ya que este alcohol es un co-disolvente asiduamente empleado en la producción de biodiésel, al no actuar como donante de grupos alquilo, y no afectar ni a la actividad ni a la estabilidad del biocatalizador (Halim y Kamaruddin 2008; Türkan y Kalay 2008).

En la Figura 4.22 (A) las mCLEAs se lavaron con *t*-butanol o metanol antes de su primer uso y en la reutilización en los consecutivos ciclos catalíticos, utilizándose metanol como donador de grupo alquilo en la mezcla de reacción. Por el contrario, en la Figura 4.22 (B) las mCLEAs se lavaron con etanol o *t*-butanol y luego se ensayaron con etanol.

Como muestra la Figura 4.22, se observaron distintos grados de conversión usando diferentes alcoholes como sustrato y/o disolvente de lavado. El metanol disminuyó significativamente la actividad enzimática, causando una fuerte caída de hasta un 35% de conversión (Figura 4.22; A). Este efecto negativo no podía revertirse y se mantuvo en ciclos posteriores. Por el contrario, este efecto sobre la actividad enzimática no se observó cuando se usa etanol o *t*-butanol en el lavado (Figura 4.22; B).



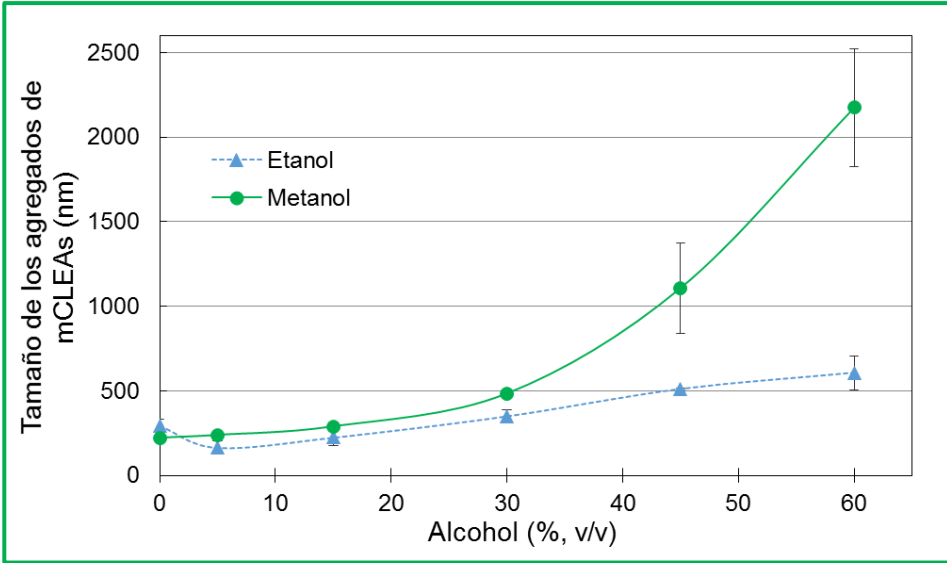


**Figura 4.22: Efecto en la conversión en biodiésel del disolvente usado para lavar las mCLEAs de CALB.** En (A) las mCLEAs se lavaron con metanol o *t*-butanol y luego se ensayaron con metanol como donador de alquilo, mientras que en (B) las mCLEAs se lavaron con etanol o *t*-butanol y luego se ensayaron con etanol. La mezcla de reacción contenía 500 mmol de mFFAs, metanol o etanol (relación molar 10:1, alcohol:FFAs) y 1% de mCLEAs (p/p de FFAs). La reacción transcurrió durante 3 h a 30°C con agitación mecánica.

### 2.3.2.8. Efecto del alcohol sobre las mCLEAs

Para determinar si el observado efecto negativo en la actividad enzimática era causado por el metanol, debido a su conocido efecto inhibitor sobre las lipasas (Shimada *et al.* 2002; Lam *et al.* 2010; Kulschewski *et al.* 2013), o a una pérdida de eficacia catalítica, debido a una disminución de la superficie de las mCLEAs, se estudió el efecto del metanol y etanol sobre la agregación del biocatalizador.

Para ello, el biocatalizador magnético se incubó durante 1 h a 30°C, con agitación mecánica a diferentes concentraciones de metanol o etanol (de 0 a 60% v/v, en agua). Posteriormente, se analizó por DLS la distribución de tamaños de los agregados resultantes (Figura 4.23).



**Figura 4.23: Efecto de dos alcoholes en el tamaño de los agregados de mCLEAs de CALB.** El biocatalizador se incubó durante 1 h a las concentraciones de etanol o metanol indicadas.

Después de 1 h, se observaron agregados de mCLEAs de 500 nm en las muestras que habían sido incubadas con alta concentración de etanol. Sin embargo, la incubación con alta concentración de metanol indució la formación de agregados mayores, de hasta 2,3  $\mu\text{m}$ . Por el contrario, las mCLEAs control, que no habían sido incubadas con alcohol, mostraron tamaños de aproximadamente 300 nm. En resumen, tanto el metanol como el etanol promovieron la aparición de agregados mayores de mCLEAs, principalmente a partir de un 30% (v/v) de alcohol.

La agregación de las mCLEAs conllevó una importante disminución del área superficial por unidad de volumen, aproximadamente 6,7 veces menos. De esta

forma se redujo el contacto enzima-sustrato y, por lo tanto, el catalizador presentó una menor actividad y tasa de conversión. El efecto del metanol sobre la CALB soluble ha sido estudiado por Fang *et al.* (2014), quienes sugirieron que el efecto negativo causado por el alcohol se debía a un mecanismo complejo, con la formación de agregados de la lipasa soluble, además del efecto inhibitor que sobre el enzima ejercía el propio metanol (Picó *et al.* 2017).

### 2.3.2.9. Efecto de los disolventes sobre las mCLEAs

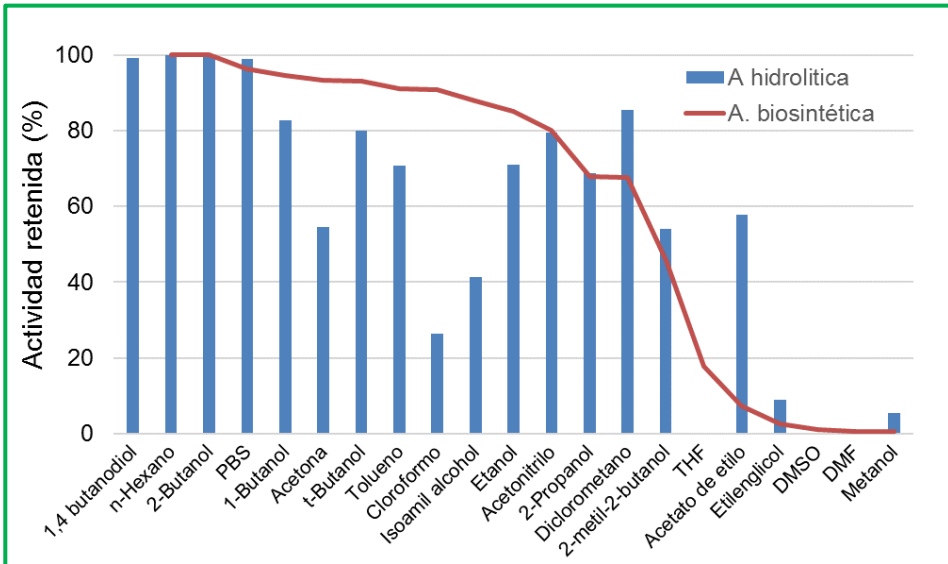
Para evitar la presencia de una elevada concentración de alcohol en la mezcla de reacción y la posible reducción de la actividad enzimática, se puede añadir alcohol de forma escalonada (Shimada *et al.* 1999; Bonet-Ragel *et al.* 2015; Canet *et al.* 2017) o bien utilizar, además del alcohol, un disolvente en la mezcla de reacción (Li *et al.* 2006; Tongboriboon *et al.* 2010; Azócar *et al.* 2011; Rastian *et al.* 2016; Mehrasbi *et al.* 2017).

Este disolvente desempeña dos funciones en la mezcla de reacción, el ya mencionado descenso de la concentración del alcohol, y el de facilitar la homogeneización de la mezcla de reacción, favoreciendo la mezcla entre el alcohol y los FFAs.

Para determinar el efecto de algunos disolventes sobre las mCLEAs, se incubaron 2 mg de mCLEAs con cada disolvente durante 48 h. Posteriormente, se retiró el disolvente y se analizaron la actividad esterasa (hidrolítica) y la conversión de ácidos grasos en biodiésel (biosintética) del biocatalizador (Figura 4.24).

Las mejores actividades se obtuvieron con mCLEAs que habían sido incubadas con alcoholes secundarios o terciarios, mientras que las que habían sido incubadas con alcoholes primarios (etanol y metanol) mostraron tasas bajas de actividad hidrolítica y biosintética. En general, las mCLEAs incubadas con disolventes polares (DMSO, acetato de etilo, THF, acetonitrilo...) presentaron

baja actividad, mientras que las incubadas con disolventes apolares (hexano, tolueno...) no vieron afectada su actividad.



**Figura 4.24: Efecto de diferentes disolventes sobre la actividad hidrolítica y biosintética de las mCLEAs.** Se incubaron durante 48 h 2 mg de mCLEAs con los diferentes disolventes, para después determinar la actividad hidrolítica y biosintética del biocatalizador magnético.

Tanto la actividad hidrolítica como la biosintética eran afectadas de forma parecida con cada disolvente, salvo con acetona, cloroformo y acetato de etilo.

Se seleccionaron 4 disolventes para realizar un estudio más detallado. En la selección se tuvo en cuenta que el enzima presentase en ese disolvente una alta actividad biosintética e hidrolítica y que ninguno de estos disolventes pudiese actuar como donador de grupos alquilo en la esterificación de ácidos grasos. También se consideró que fuesen miscibles con los alcoholes y los FFAs. Atendiendo a estas condiciones se seleccionaron *n*-hexano, *t*-butanol, tolueno y acetonitrilo.

Los disolventes seleccionados se compararon en cuanto a su coste económico, toxicidad, punto de ebullición, viscosidad y efecto en las ya analizadas actividades hidrolítica y biosintética de las mCLEAs (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2: Comparación de las diferentes características de los disolventes seleccionados.** Se consideraron el coste, la toxicidad, la viscosidad y el punto de ebullición del disolvente, así como su efecto en la actividad hidrolítica y biosintética. La toxicidad se determinó a través de la escala de Hodge y Sterner (1949). El coste se determinó según proveedores locales, normalizando el valor (€/L) a una escala sobre 5, tomando como valor máximo el precio más elevado.

Disolvente	<i>n</i> -Hexano	Acetonitrilo	<i>t</i> -Butanol	Tolueno
Coste	2,73	5	1,55	3
Toxicidad	Ligeramente tóxico (4)	Ligeramente tóxico (4)	Prácticamente no-tóxico (5)	Moderadamente tóxico (3)
Viscosidad (mPa·s)	0,3	0,3	3,4	0,6
P. ebullición (°C)	69	82	82	111
Act. Biosintética retenida (%)	100	80,2	93	91,1
Act. Hidrolítica retenida (%)	100	79,4	79,9	70,7

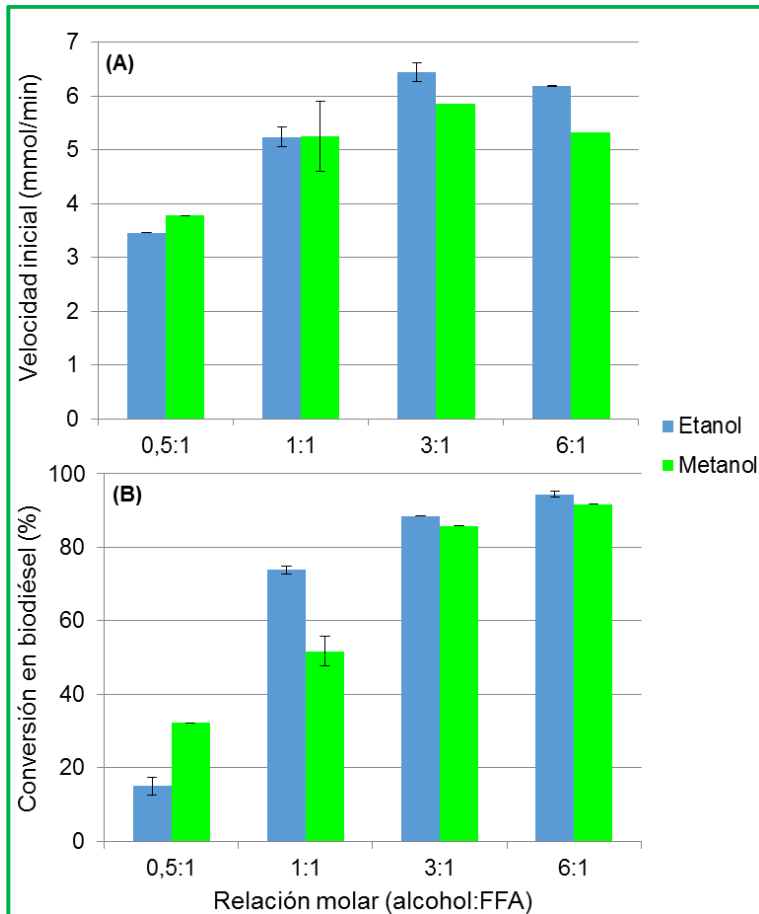
El alcohol terciario *t*-butanol fue el que mejores valores presentó en el conjunto de las características evaluadas. Además, otros autores también han utilizado este disolvente para la producción de biodiésel obteniendo altas conversiones (Li *et al.* 2006; Royon *et al.* 2007; Halim y Kamaruddin 2008; Chen *et al.* 2011b; Rastian *et al.* 2016; Mehrasbi *et al.* 2017). Por todo ello, se seleccionó el *t*-butanol como co-disolvente a emplear en la mezcla de reacción para futuros experimentos.

### 2.3.2.10. Estudio de la relación molar alcohol:FFAs

Por último, se determinó la relación molar óptima entre alcohol:FFAs en la mezcla de reacción. Como se ha demostrado anteriormente, la concentración de alcohol presente en la mezcla de reacción ejerce un importante efecto sobre el

biocatalizador, por lo que es de vital importancia emplear la concentración adecuada del mismo.

Se determinó la velocidad inicial de reacción con etanol y metanol a diferentes relaciones molares, así como la conversión en biodiésel al cabo de 24 h en una reacción en la que se incluyó *t*-butanol como co-disolvente (Figura 4.25).



**Figura 4.25: Efecto de la relación molar alcohol:FFAs sobre la velocidad inicial de la reacción y sobre la conversión.** Se representa la velocidad inicial (A) y la conversión total en biodiésel (B) al cabo de 24 h empleando etanol o metanol a la relación molar indicada. Las reacciones se incubaron a 30°C, con agitación mecánica y usando *t*-butanol como co-disolvente.

La velocidad inicial estaba afectada por la concentración de los alcoholes empleados, alcanzando su óptimo a una proporción molar 3:1 (alcohol:FFAs). Una

mayor concentración de alcohol provocó una caída de la velocidad, haciéndose este efecto más evidente empleando metanol como donador de grupos alquilo.

De igual manera, la conversión en biodiésel aumentó progresivamente hasta la relación 3:1. Por encima de esta proporción molar ya no fue significativo el aumento, por lo que se fijó la proporción 3:1 como óptima para futuros experimentos.

## 2.4. Comparación del biodiésel obtenido de las microalgas

Se comparó la conversión en biodiésel de los lípidos extraídos de *C. vulgaris* y *Scenedesmus* sp. Empleando las mismas condiciones de reacción, con la mezcla original de ácidos grasos de *C. vulgaris* se obtuvo conversiones en torno al 80%, mientras que con la de *Scenedesmus* sp. llegaban hasta un 96%.

La calidad del biodiésel obtenido, estimada por la transformación de los ácidos grasos en ésteres, está muy relacionada con la cantidad de lípidos presentes en la microalga empleada. A mayor contenido inicial de lípidos, como es el caso de *Scenedesmus* sp., mejor cantidad y calidad del biodiésel obtenido.

Además, la mayor presencia de ésteres de ácidos grasos saturados o monoinsaturados, como es el caso de la biomasa de *Scenedesmus* sp., favorece un biodiésel de mayor calidad. Esto es debido a que los PUFAs son más susceptibles a la oxidación durante el almacenamiento, reduciendo así la calidad del biodiésel (Rawat et al. 2013).

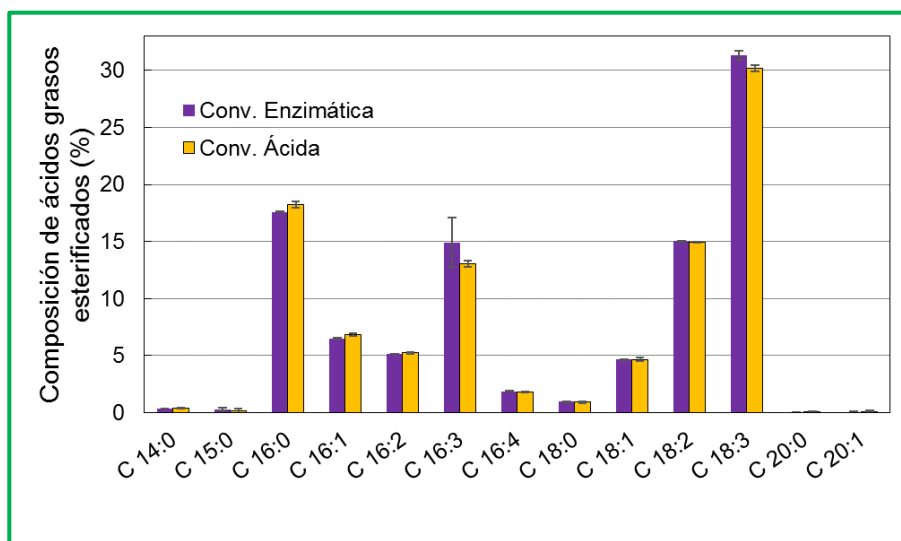
## 2.5. Comparación entre catálisis

### 2.5.1. *Chlorella vulgaris*

Paralelamente a la conversión enzimática de biodiésel realizada en nuestro laboratorio, el centro asociado CENER obtuvo biodiésel por catálisis ácida empleando las mismas muestras de FFAs extraídos por saponificación de la biomasa de *C. vulgaris*.

Aunque el biodiésel resultante de la catálisis ácida mostraba propiedades aceptables, es decir, era un líquido fluido y de baja viscosidad sin decantación, se obtuvo un valor de conversión bajo ( $80,2 \pm 4,4\%$ ).

Se compararon los resultados de transformación de FFAs en ésteres por catálisis enzimática y ácida, empleando diferentes donadores de grupo alquilo, esto es, etanol en la enzimática y metanol en la ácida (Figura 4.26).



**Figura 4.26: Composición de ésteres de ácidos grasos (FAMEs y FAEEs) después de la conversión de rcFFAs en biodiésel obtenido por catálisis ácida o enzimática.** La catálisis ácida se llevó a cabo con metanol como donador de grupos alquilo mientras que se utilizó etanol en la catálisis enzimática.



A pesar de las diferentes condiciones experimentales utilizadas en ambas formas de catálisis, se obtuvo biodiésel con un perfil similar de ésteres alquílicos de ácidos grasos (FAMEs y FAEEs), siendo la naturaleza del alcohol aparentemente irrelevante en los ésteres obtenidos (Picó *et al.* 2017).

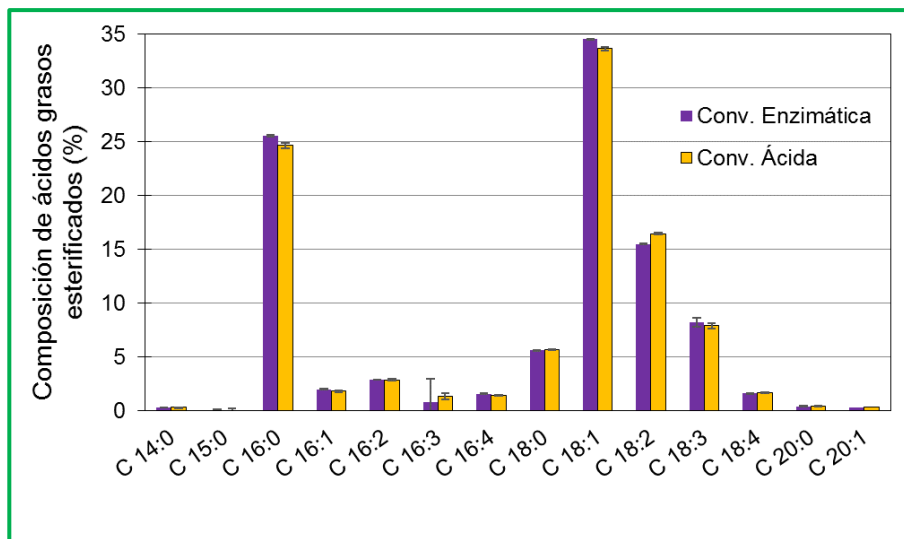
Este resultado indica que la lipasa inmovilizada muestra similar especificidad para esterificar los FFAs extraídos por saponificación de lípidos totales de *C. vulgaris* var L3, a pesar de la diferente longitud de cadena y/o grado de insaturación de los FFAs. Por otra parte, también indica que la inmovilización de CLEAs de CALB a MNPs no afectó, aparentemente, a la especificidad de la lipasa, y que las propiedades catalíticas del enzima inmovilizado son semejantes a las del libre.

La conversión en biodiésel obtenida fue notablemente diferente, indicando que la catálisis ácida proporciona, aparentemente, una mayor conversión ( $80,2 \pm 4,4\%$ ) que la enzimática ( $70,4 \pm 3,1\%$ ). Es necesario tener en cuenta que fueron muy diferentes las condiciones utilizadas en ambos tipos de catálisis, tanto en lo relativo a temperatura como al tiempo de reacción. Además, el valor de conversión de biodiésel de  $70,4 \pm 3,1\%$  se obtuvo cuando la reacción enzimática todavía no estaba optimizada y se empleaban mCLEAs para catalizar la esterificación con etanol en ausencia de *t*-butanol.

### 2.5.2. *Scenedesmus* sp.

Por otra parte, se analizó la conversión en biodiésel de lípidos extraídos de la biomasa de *Scenedesmus* sp., al igual que se realizó con *C. vulgaris*, obteniéndose valores muy altos de conversión en biodiésel, tanto por catálisis ácida como enzimática. Se obtuvo valores en torno al 97% de conversión para la catálisis ácida, mientras que por catálisis enzimática se obtuvo un 96,1% de conversión de ácidos grasos en sus respectivos ésteres.

De igual manera, se comparó el perfil de ésteres del biodiésel obtenido en las dos reacciones, a pesar del diferente donador de alquilo usado para obtener ésteres, metílicos (FAMEs) en la conversión ácida y etílicos (FAEEs) en la enzimática (Figura 4.27).



**Figura 4.27: Composición de ésteres de ácidos grasos (FAMEs y FAEEs) después de la conversión de rsFFAs en biodiésel obtenido por catálisis ácida o enzimática.** La catálisis ácida se llevó a cabo con metanol como donador de grupos alquilo mientras que en la catálisis enzimática se utilizó etanol.

Al igual que ocurría con *C. vulgaris* el perfil de ésteres fue semejante, aunque se observó por catálisis enzimática una mayor conversión en ésteres en todos los ácidos grasos.

Aunque ambos procesos catalíticos proporcionaron resultados parecidos, se ha de tener en cuenta que la catálisis ácida se llevó a cabo a 100°C durante 1 h, mientras que la enzimática se realizó a 30°C durante 3 h. Además, el empleo de biocatalizador magnético permitió:

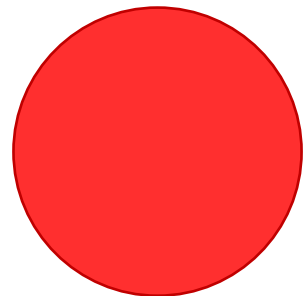
- I. Su fácil recuperación de la mezcla de reacción y reutilización en sucesivos ciclos catalíticos.

- II. El empleo de condiciones de reacción más suaves, evitando la oxidación de reactores y otros problemas secundarios propios de la catálisis ácida.
- III. Un menor gasto energético, al ser necesaria una menor temperatura de reacción.
- IV. Usar disolventes más respetuosos con el medio ambiente, que posibilita la reducción del coste del biodiésel obtenido.



# Capítulo V

## Reutilización y Escalado





## 1. INTRODUCCIÓN

La recuperación de la contaminación atmosférica constituye uno de los principales desafíos del siglo XXI. Entre las fuentes de contaminantes, el sector del transporte se encuentra entre los principales responsables al emitir a la atmósfera dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), hidrocarburos sin quemar, monóxido de carbono (CO), olores y óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) (Veillette *et al.* 2015).

Los biocombustibles son una alternativa sostenible y renovable a los combustibles fósiles, ya que generan menos emisiones de gases de efecto invernadero (Rodrigues *et al.* 2016). Además, debido a que las fuentes para obtener biocombustibles se pueden cultivar localmente (ya sean plantas o microalgas), los países pueden reducir su dependencia de fuentes de combustible fósil extranjeras.

Las potenciales ventajas ambientales y sociales de los biocombustibles han dado lugar a algunas medidas políticas encaminadas a apoyar su producción sostenible. Por ejemplo, la Directiva sobre Energías Renovables (Directiva

Europea 2009/28/E.C, 2009) obliga a los Estados Miembros de la UE a alcanzar un objetivo mínimo del 10% de energías renovables en toda la energía utilizada en el sector del transporte para el año 2020, estableciéndose un límite del 7% en biocombustibles basados en cultivos alimentarios (Rodrigues *et al.* 2016).

El hecho de que en la actualidad más del 95% de las materias primas empleadas para producir biodiésel provienen de aceites comestibles, causa una gran preocupación debido a su competencia con la cadena de suministro de alimentos (Rodrigues *et al.* 2016). En consecuencia, ahora existe un mayor interés en los cultivos de especies no comestibles para obtener biocombustibles de segunda generación, como *Jatropha curcas*, o en la utilización de microalgas para la producción de biodiésel de tercera generación.

La principal limitación asociada con el uso de biocombustibles de segunda generación es la sostenibilidad. Por ejemplo, para satisfacer completamente las necesidades de gasóleo del Reino Unido (estimado en 25 mil millones de litros en 2008) a partir de la producción de biodiésel de *Jatropha*, sería necesario cultivar la mitad de la superficie de este país (17,5 millones de hectáreas) (Rawat *et al.* 2013).

Además, existe cierto debate sobre si la producción de biodiésel alcanza un equilibrio energético positivo ya que, si se basa en cultivos de plantas oleaginosas como la colza o la soja, se estima que la energía total absorbida es la mitad de la energía total necesaria para producir biodiésel (Rawat *et al.* 2013).

Por otro lado, las microalgas presentan una elevada tasa de crecimiento y alta capacidad para almacenar lípidos, superando por mucha diferencia a las plantas. Además, estos microorganismos requieren mucha menos superficie para producir la misma cantidad de biodiésel, sólo un 2% de la que necesitan los cultivos terrestres (Ahmad *et al.* 2011).



Por otra parte, el biodiésel de microalgas no afecta negativamente al medio ambiente, ya que es un combustible neutro en carbono debido a la fijación fotosintética del dióxido de carbono atmosférico. Sirva de ejemplo que en el crecimiento de microalgas se utiliza 1,83 kg de CO<sub>2</sub> por cada kg de biomasa seca producida (Rawat *et al.* 2013).

## 1.1. Viabilidad del biodiésel

### 1.1.1. Optimización del proceso de producción

La producción de biodiésel a gran escala a partir de lípidos microalgales es actualmente inviable económicamente, ya que es demasiado elevado el gasto energético que se necesita en el cultivo, extracción de lípidos y obtención de biodiésel (Suali y Sarbatly 2012). En consecuencia, para aumentar la viabilidad económica del biodiésel sería necesario optimizar todas y cada una de las etapas en la producción del biocombustible usando tecnologías más rentables.

Con este fin, se han de estudiar y mejorar el cultivo, recolección y secado de la biomasa microalgal, así como la posterior extracción de lípidos y su transesterificación en biodiésel. Entre las claves para reducir el coste se sitúan los procesos que más energía emplean, como son el secado de la biomasa y la extracción de lípidos microalgales (Lardon *et al.* 2009). Para ello, se tiende a usar métodos de extracción que usen biomasa húmeda, evitando el paso de secar la biomasa y consiguiendo con ello una reducción energética de hasta el 25% (Mubarak *et al.* 2015).

Otra de las etapas en las que se ha de reducir el gasto energético es la transesterificación de los lípidos. En la obtención enzimática de biodiésel se han de optimizar varios parámetros de la reacción, como son la temperatura, la presencia de agua en la reacción, la cantidad de enzima, su reutilización, así como

el modo y tipo de reactor en el que se lleva a cabo la reacción (Zhao *et al.* 2015; Sankaran *et al.* 2016).

#### 1.1.1.1. Carga enzimática y reutilización

Uno de los problemas en la producción enzimática de biodiésel es el elevado coste del enzima. Por ello, es necesario optimizar la cantidad de enzima en la reacción y estudiar, en profundidad, su reutilización durante el máximo número posible de ciclos catalíticos.

En la actualidad, la cantidad de enzima utilizado en la producción de biodiésel se encuentra entre un 0,2% (biocatalizador:aceite, p/p) (Mendes *et al.* 2011) y un 75% (Li *et al.* 2007), situándose la media en torno a un 9% (p/p). En la Tabla 5.1 se resume las condiciones empleadas en la catálisis enzimática para producir biodiésel a partir de diferentes materias primas.

La cantidad de enzima que aparece en la Tabla 5.1 son muy elevadas si se comparan con la empleada en este Grupo de investigación, en donde se ha obtenido altas conversiones en biodiésel con sólo un 1% (p/p) de biocatalizador (Cruz-Izquierdo *et al.* 2014; Picó *et al.* 2017).

En cuanto a la reutilización de la lipasa inmovilizada, el número de ciclos depende en gran medida del tipo de lipasa, la inmovilización llevada a cabo y las condiciones de reacción en las que se ha empleado la lipasa. Por ejemplo, usando una agitación por ultrasonidos sólo se consigue reutilizar el biocatalizador 8 ciclos catalíticos (Waghmare *et al.* 2015; Tavares *et al.* 2017). Asimismo, utilizando metanol como donador de grupos alquilo, Mehrasbi *et al.* (2017) han observado un descenso de actividad de hasta un 40% al cabo de 10 ciclos catalíticos empleando una inmovilización de la lipasa parecida a la usada en este trabajo.

**Tabla 5.1: Resumen de las condiciones para la obtención enzimática de biodiésel.** La tabla esta ordenada en función de la materia prima utilizada para la obtención de biodiésel.

Materia prima	Co-disolvente	Donador	Lipasa	Enzima (% p/p)	Condiciones óptimas	Conversión (%)	Referencia
Aceite de alperujo	-	Metanol	rROL (inmo)	400U/ml aceite	30°C 6h	29	(Bonet-Ragel <i>et al.</i> 2015)
Aceite de babasú y palma	-	Etanol	<i>Thermomyces lanuginosus</i> TLL/ <i>P. fluorescens</i> PFL (inmo)	0,2	45°C 48 h	90	(Mendes <i>et al.</i> 2011)
Aceite de cambre	-	Acetato de metilo	Novozym 435	20	60°C 6 h	98	(Tavares <i>et al.</i> 2017)
Aceite de colza	<i>t</i> -Butanol	Metanol	Lipozyme TL IM; Novozym 435	3 1	35°C 12 h	95	(Li <i>et al.</i> 2006)
Aceite de colza	<i>t</i> -Butanol	Metanol	CALB (inmo)	9	40°C 15 h	92	(Rastian <i>et al.</i> 2016)
Aceite de colza	-	Metanol	Lipozyme TLIM	95	50°C 24 h	97	(Dizge <i>et al.</i> 2009)
Aceite de fritura	-	Dimetilcarbonato	Novozym 435	10	60°C 24h	78	(Gharat y Rathod 2013)
Aceite de fritura	-	Etanol	<i>Burkholderia cepacia</i> (inmo)	15	40°C 24 h	92	(Nikpour y Pazouki 2016)
Aceite de fritura	<i>t</i> -Butanol	Metanol	CALB (inmo)	22	50°C 96 h	48	(Mehrasbi <i>et al.</i> 2017)
Aceite de fritura	<i>t</i> -Butanol	Metanol	Novozym 435	4	40°C 12 h	88	(Halim y Kamaruddin 2008)
Aceite de fritura y colza	-	Metanol	Novozym 435	15	44,5°C 12 h	100	(Azócar <i>et al.</i> 2011)

**Tabla 5.1: Resumen de las condiciones para la obtención enzimática de biodiésel.** La tabla esta ordenada en función de la materia prima utilizada para la obtención de biodiésel (continuación).

Materia prima	Co-disolvente	Donador	Lipasa	Enzima (% p/p)	Condiciones óptimas	Conversión (%)	Referencia
Aceite de fritura	-	Acetato de metilo	Lipozyme TLIM	4	40°C 3 h	96	(Subhedar y Gogate 2016)
Aceite de girasol	<i>t</i> -Butanol o heptano	Metanol	Lipozyme TLIM; Novozym 435	10 mg TL + 50 mg N435	40°C -	-	(Türkan y Kalay 2008)
Aceite de girasol usado	<i>n</i> -Hexano	Metanol	Lipasa de <i>P. fluorescens</i>	5	45°C 24 h	66	(Charpe y Rathod 2011)
Aceite de jatropa	-	Metanol	rROL y rCPL (inmo)	5	30°C 48 h	65	(Rodrigues <i>et al.</i> 2016)
Aceite de oliva	-	Metanol	rROL (inmo)	2	30°C 10 h	49	(Canet <i>et al.</i> 2017)
Aceite de oliva	-	Metanol	Novozym 435	-	50°C 24 h	90	(Lee <i>et al.</i> 2010)
Aceite de oliva	<i>n</i> -Hexano	Metanol	Novozym 435	500U/ml aceite	60°C 24 h	41	(Sanchez y Vasudevan 2006)
Aceite de palma usado	<i>n</i> -Hexano	Etanol	Lipozyme TLIM; Novozym 435	10	45°C 12 h	100	(Tongboriboon <i>et al.</i> 2010)
Aceite de soja	-	Metanol	Lipasa <i>Callera</i> Trans L (inmo)	1	35°C 24 h	96	(Cesarini <i>et al.</i> 2013)
Aceite de soja	<i>t</i> -Butanol	Metanol	Novozym 435	-	52°C -	98	(Chen <i>et al.</i> 2011b)
Aceite de soja	Acetato de metilo	Metanol	Novozym 435	3	45°C 50 h	99	(Ognjanovic <i>et al.</i> 2009)
Aceite de soja	-	Metanol	Lipasa de <i>C. rugosa</i> y <i>P. cepacia</i> -MNP	17,3	40°C 24 h	48	(Wang <i>et al.</i> 2009)

**Tabla 5.1: Resumen de las condiciones para la obtención enzimática de biodiésel.** La tabla esta ordenada en función de la materia prima utilizada para la obtención de biodiésel (continuación).

Materia prima	Co-disolvente	Donador	Lipasa	Enzima (% p/p)	Condiciones óptimas	Conversión (%)	Referencia
Aceite de soja	-	Metanol	Lipozyme-TL en MNPs-NH <sub>2</sub>	40	50°C 12 h	90	(Xie y Ma 2009)
Aceite de soja	-	Metanol	Lipozyme-TL en MNPs-NH <sub>2</sub>	40	45°C 25 h	94	(Xie y Ma 2010)
Aceite de soja	<i>t</i> -Alcohol amílico	Metanol	Novozym 435	2	40°C 15 h	97	(Zheng <i>et al.</i> 2009)
Aceite de soja o aceite de macauba	-	Etanol	Novozym 435	20	70°C 4 h	88	(Santin <i>et al.</i> 2017)
Aceite vegetal	-	Metanol	Lipasa de <i>Alcaligenes</i> sp. (inmo)	20	40°C 10 h	80	(Soler <i>et al.</i> 2016)
Lípidos de microalgas	<i>t</i> -Butanol	Metanol	Novozym 435	10	40°C 48 h	86	(Lai <i>et al.</i> 2012)
Lípidos de microalgas	-	Metanol	<i>Candida</i> sp. (inmo)	75	38°C 12 h	98	(Li <i>et al.</i> 2007)
Lípidos de microalgas		Metanol	Novozym 435	2,5	25°C 4 h	92,6	(López <i>et al.</i> 2015)
Lípidos de microalgas	<i>Iso</i> -octano	Metanol	Lipasa de <i>Candida</i> sp.	10	40°C 10 h	-	(Teo <i>et al.</i> 2014)
Lípidos de microalgas	<i>n</i> -Hexano	Metanol	Lipasa de <i>Burkholderia</i> sp.	1200U/ml aceite	40°C 48 h	97	(Tran <i>et al.</i> 2012)
Semillas de algodón	<i>t</i> -Butanol	Metanol	Novozym 435	1,7	50°C 24h	95	(Royon <i>et al.</i> 2007)
Varios	-	Acetato de etilo	Novozym 435	10	50°C 12 h	92	(Modi <i>et al.</i> 2007)

Sin embargo, si se emplean condiciones de reacción moderadas, como la agitación mecánica y la utilización de etanol, se consigue mantener la actividad más de 10 ciclos (Nikpour y Pazouki 2016). Además, al emplear un co-disolvente en la reacción, Li *et al.* (2006) han conseguido mantener la actividad de las lipasas inmovilizadas comerciales Novozym 435® y Lipozyme TL IM durante 200 ciclos catalíticos (2400 h).

### **1.1.1.2. Presencia de agua en la reacción**

La cantidad de agua presente en la mezcla de reacción es un factor crítico. En medios orgánicos no acuosos, es necesaria una mínima presencia de agua para el correcto funcionamiento de la lipasa, ya que la ausencia de agua de solvatación afecta la estructura tridimensional de la lipasa y, con ello, su actividad catalítica (Zhao *et al.* 2015).

Sin embargo, un contenido de agua excesivo supone una disminución de la concentración del donador de grupos alquilo además de promover la actividad hidrolítica, con la consiguiente disminución del rendimiento de la trans/esterificación (Bajaj *et al.* 2010). El contenido óptimo de agua en la mezcla de reacción es muy variable y depende en gran medida del tipo de aceite y de lipasa empleada.

### **1.1.1.3. Tipo de reactor y modo de funcionamiento**

Para la producción de biodiésel se puede emplear un proceso operando en continuo o discontinuo. Las operaciones en continuo presentan mayores y mejores rendimientos, si bien las discontinuas son las más empleadas por su mayor facilidad de control (Kawakami *et al.* 2011). En concreto, el proceso continuo es más favorable para la lipasa inmovilizada debido al bajo coste, a la alta productividad y a la alta eficiencia energética (Poppe *et al.* 2015).

Los tipos de reactores utilizados para producir biodiésel con lipasa inmovilizada son: el de tanque agitado (STR), el de lecho fijo (PBR), el de lecho fluidizado (FBR) y el de columna de burbujas (BCR). Para la producción continua de biodiésel, el PBR tiene una ventaja añadida frente a los demás porque, al eliminar el glicerol de forma continua, se evita su efecto inhibitorio sobre la lipasa (Sankaran *et al.* 2016).

Además de todos los factores anteriormente citados, para rentabilizar la producción de biodiésel a partir de biomasa microalgal, es casi un asunto imperativo considerar el concepto de biorrefinería, es decir, obtener otros bioproductos de valor añadido, que hagan económicamente viable la producción a gran escala de biocombustibles obtenidos de microalgas (Urreta *et al.* 2014).

### **1.1.2. Biorrefinería de biomasa microalgal**

Las microalgas son capaces de acumular lípidos fijando CO<sub>2</sub> atmosférico con energía luminosa. Estos lípidos se pueden convertir en biodiésel y la biomasa residual deslipilizada todavía se puede utilizar como fuente para obtener otros bioproductos, tales como antioxidantes naturales, nutraceuticos, enzimas, proteínas, carbohidratos, pigmentos, biogás y bioetanol, entre otros (Figura 5.1). Las microalgas son los productores primarios más eficientes del Planeta y su biomasa es una materia prima ideal para la biorrefinería (Rawat *et al.* 2013).

Desafortunadamente, la combinación de tecnologías necesarias para implementar una biorefinería de microalgas se encuentra todavía en sus primeras etapas de desarrollo (Rawat *et al.* 2013). Se tienen que mejorar varios aspectos del proceso, como son una extracción de lípidos más suave para asegurar que se mantienen las funcionalidades de los diferentes componentes celulares.

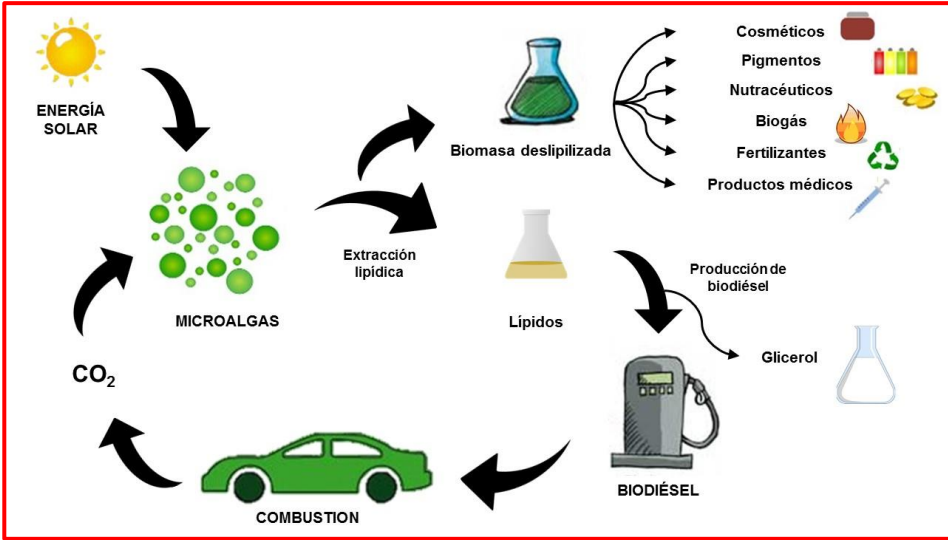


Figura 5.1: Esquema del ciclo de una biorrefinería a partir de biomasa microalgal. Adaptado de Cheng y Wang (2013).

Son muchos y valiosos los bioproductos extraídos de la biomasa microalgal, por lo que este enfoque de biorrefinería hace que el coste en la producción de biodiésel se reduzca, y sea viable su obtención a partir de microalgas (Rawat *et al.* 2013).



## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de determinar las condiciones óptimas para obtener biodiésel a microescala, se estudió la estabilidad y reutilización de las mCLEAs de CALB. Paralelamente, se inició el escalado de la mezcla de reacción desde 0,5 ml hasta un volumen máximo de 500 ml.

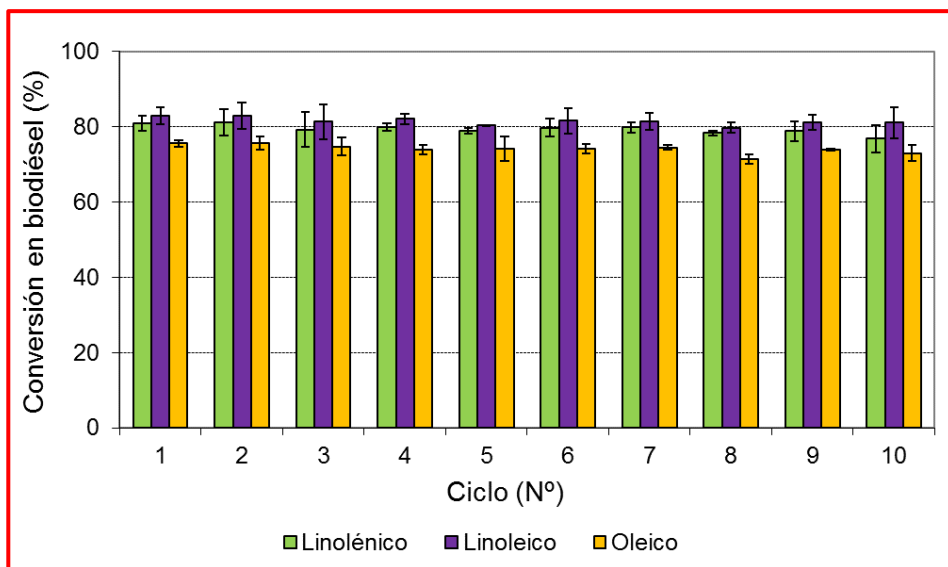
### 2.1. Estabilidad y reutilización de las mCLEAs

Una de las principales ventajas de utilizar mCLEAs es su fácil recuperación de la mezcla de reacción para ser reutilizadas en sucesivos ciclos catalíticos, lo que permite una considerable reducción de costes.

#### 2.1.1. Efecto de la agitación en la actividad y estabilidad de las mCLEAs

Inicialmente se estudió la estabilidad y reutilización de las mCLEAs con agitación mecánica. Para ello, se realizaron hasta 10 ciclos catalíticos consecutivos (de 3 h a 30°C) con una mezcla de incubación que contenía 2 mg de mCLEAs con 500  $\mu\text{mol}$  de msFFAs y etanol como donador de grupos alquilo en una relación molar (alcohol:FFAs) 10:1 (Figura 5.2).

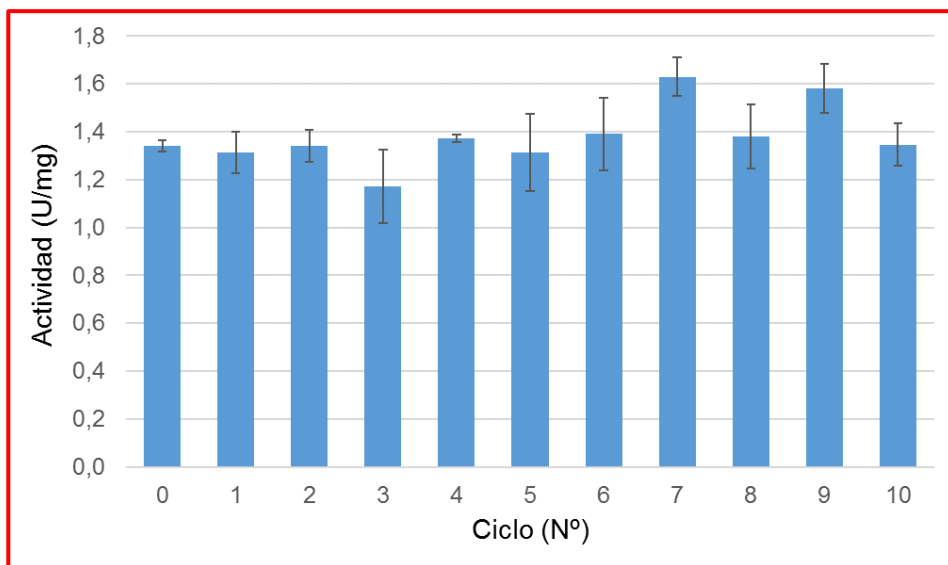
Se comprobó que la conversión en biodiésel se mantuvo cerca del 80% durante al menos 10 ciclos, aunque se apreció una leve disminución en los últimos ciclos.



**Figura 5.2: Conversión en biodiésel de los ácidos grasos mayoritarios de las msFFAs.** Las incubaciones se realizaron a 30°C con agitación mecánica durante 3 h, con 1%, (p/p) de mCLEAs y con etanol como donador en una relación molar (alcohol:FFAs) 10:1.

Por otra parte, se estudió el efecto que tenían los ultrasonidos sobre el biocatalizador. Para ello, se incubaron 2 mg de mCLEAs con etanol y msFFAs en una relación molar (alcohol:FFAs) de 10:1, a 30°C con agitación en un sonorreactor. La preparación se agitó de forma continua a una potencia de 100 W y a una amplitud del 100%. Se realizaron 10 ciclos catalíticos consecutivos de 30 min cada uno. Tras cada ciclo se evaluó la actividad esterasa de las mCLEAs midiendo la hidrólisis de *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA) (Cruz-Izquierdo *et al.* 2014) (Figura 5.3).

Se ha descrito que los ultrasonidos provocan la pérdida de actividad del enzima y el descenso de la conversión en sucesivos ciclos catalíticos (Islam *et al.* 2014), al inducir cambios conformacionales en la estructura secundaria del enzima (Zhang *et al.* 2014). Además, en el caso de enzimas inmovilizados, los ultrasonidos pueden afectar los enlaces entre el soporte y el enzima provocando su rotura (Waghmare *et al.* 2015; Subhedar y Gogate 2016; Santin *et al.* 2017).



**Figura 5.3: Actividad esterasa de las mCLEAS tras cada ciclo catalítico agitado por ultrasonidos.** Las incubaciones se realizaron a 30°C durante 30 min con 1%, (p/p) de mCLEAs y con etanol como donador en una relación molar (alcohol:FFAs) 10:1.

En este caso, las mCLEAs de CALB muestran gran estabilidad al ser sometidas a ultrasonidos y parecen que no sufren pérdida de actividad ni de la capacidad para la conversión en biodiésel durante al menos 10 ciclos catalíticos. Sin embargo, en otros estudios con enzimas inmovilizados (Novozym 435® y Lipozyme TLIM) se ha descrito que la actividad catalítica tras 7 ciclos se ve muy comprometida, descendiendo casi un 90% en todos los casos (Waghmare *et al.* 2015; Subhedar y Gogate 2016).

En general, tras 10 ciclos catalíticos no se apreció un descenso significativo en la actividad en ningún tipo de agitación empleada, si bien con agitación mecánica se observó una ligera caída de conversión en los últimos ciclos. Este pequeño descenso se podría atribuir a la ausencia de un co-disolvente en la mezcla de reacción y, por tanto, a la excesiva concentración de alcohol en la mezcla de reacción. El hecho de que la agitación por ultrasonidos no muestre este efecto

puede deberse a la brevedad de los ciclos (30 min), frente a las 3 h empleadas en los ciclos agitados mecánicamente.

### 2.1.2. Efecto del co-disolvente en la reutilización de mCLEAs

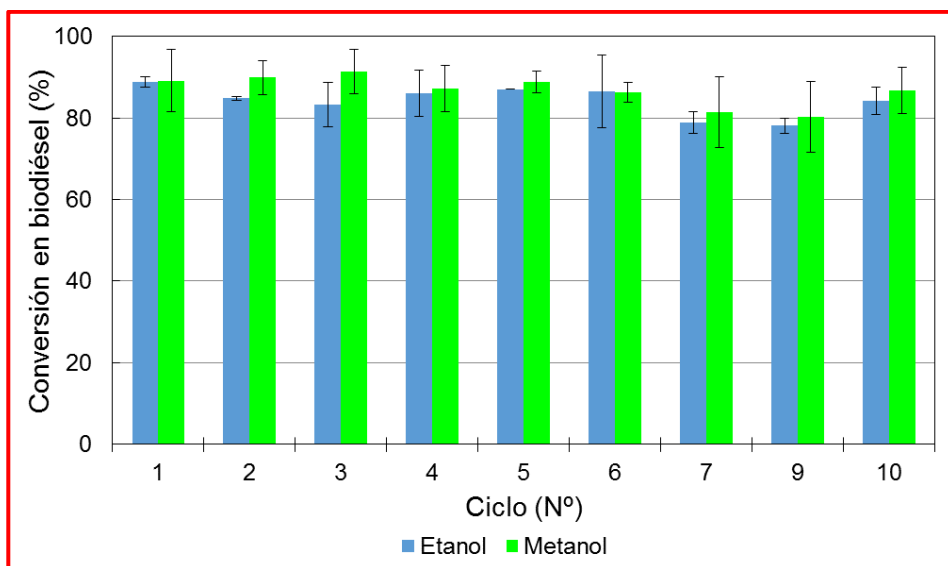
Teniendo en cuenta las ventajas que implica el uso de *t*-butanol en la mezcla de reacción (descritas en el Capítulo IV de esta Memoria), se introdujo este co-disolvente y se estudió la reutilización y estabilidad de las mCLEAs de CALB con diferentes donadores de grupos alquilo.

Para ello, se incubaron 1% de mCLEAs (p/p) con 500  $\mu\text{mol}$  mcFFAs y etanol o metanol en una relación molar (alcohol:FFAs) 3:1, a 30°C durante 10 ciclos catalíticos sucesivos de 3 h. A la mezcla de reacción se añadió *t*-butanol como co-disolvente hasta alcanzar el volumen final de 0,5 ml y se agitó mecánicamente. Antes de cada ciclo catalítico, las mCLEAs se recuperaron con un imán y se lavaron 3 veces con *t*-butanol (Figura 5.4).

Con metanol o etanol se obtuvieron conversiones de biodiésel similares (del 80 al 90%) después de 10 ciclos catalíticos, manteniendo las mCLEAs su actividad inicial después de 10 ciclos consecutivos con ambos donantes de alquilo. Se concluyó que el co-disolvente *t*-butanol no afectaba negativamente a las mCLEAs durante el tiempo empleado. Además, el uso del co-disolvente favoreció la conversión total en biodiésel, manteniéndose en torno al 100% la conversión relativa.

Xie y Ma (2009; 2010) observaron una disminución del 50% de actividad después de 5 ciclos de catálisis utilizando la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada en MNPs para producir biodiésel a alta temperatura (45-50°C). Recientemente, Mehrasbi *et al.* (2017) observaron que la actividad retenida del biocatalizador (CALB inmovilizada en partículas magnéticas) disminuía un 40%

después de 10 ciclos consecutivos de reacción. Por otra parte, Rosset *et al.* (2013) observaron una pérdida del 100% de actividad tras 6 ciclos de catálisis, utilizando la lipasa comercial inmovilizada Novozym 435® y metanol como donador de grupos alquilo. En cambio, en nuestro caso la catálisis con etanol mantuvo la actividad de la lipasa durante al menos 10 ciclos.



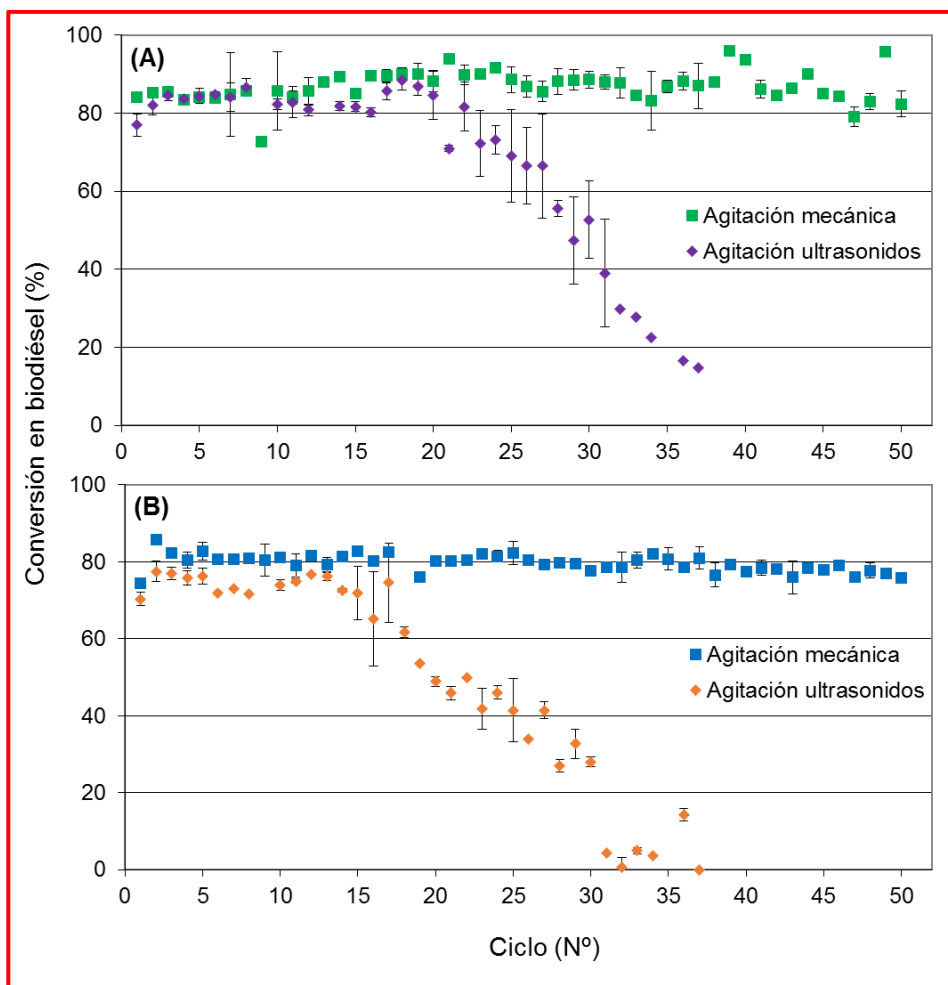
**Figura 5.4: Conversión en biodiésel de ácido linolénico de la mezcla mCFFAs en sucesivos ciclos.** Las incubaciones se realizaron a 30°C con agitación mecánica durante 3 h, con 1% (p/p) de mCLEAs y con etanol o metanol como donador en una relación molar (alcohol:FFAs) 3:1. Se empleó *t*-butanol como co-disolvente en la mezcla de reacción y para lavar el biocatalizador antes de cada ciclo.

Estos datos confirman que las mCLEAs de CALB son un biocatalizador robusto y estable, capaz de catalizar la síntesis de biodiésel a baja concentración enzimática y en condiciones en las que otras lipasas inmovilizadas no son capaces.

### 2.1.3. Vida media de las mCLEAs

Se estimó la vida media de la actividad de las mCLEAs mediante el análisis de la conversión total y la actividad inicial en sucesivos ciclos catalíticos, bien sea con agitación mecánica o con ultrasonidos, y empleando etanol o metanol como donador alquilo.

La mezcla de reacción contenía 2 mg de mCLEAs (1%, p/p), msFFAs, etanol o metanol en una relación molar (alcohol:FFAs) 3:1 y *t*-butanol hasta alcanzar un volumen final de 0,5 ml. La incubación se realizó a 30°C con la agitación correspondiente, durando 3 h el ciclo con agitación por ultrasonidos y 24 h con agitación mecánica (Figura 5.5).



**Figura 5.5: Conversión en biodiésel de la mezcla mCFFAs en sucesivos ciclos de reacción según la agitación y el alcohol empleado.** Los ciclos se realizaron a 30°C con agitación mecánica durante 24 h, o con agitación magnética durante 3 h. **A:** La mezcla de reacción contenía 500  $\mu\text{mol}$  msFFAs, metanol como donador en una relación molar (alcohol:FFAs) 3:1 y *t*-butanol hasta un volumen final de 0,5 ml. **B:** La mezcla de reacción contenía 500  $\mu\text{mol}$  msFFAs, etanol como donador en una relación molar (alcohol:FFAs) 3:1 y *t*-butanol hasta un volumen final de 0,5 ml. Antes de cada ciclo catalítico, las mCLEAs se recuperaron con un imán y se lavaron tres veces con *t*-butanol.

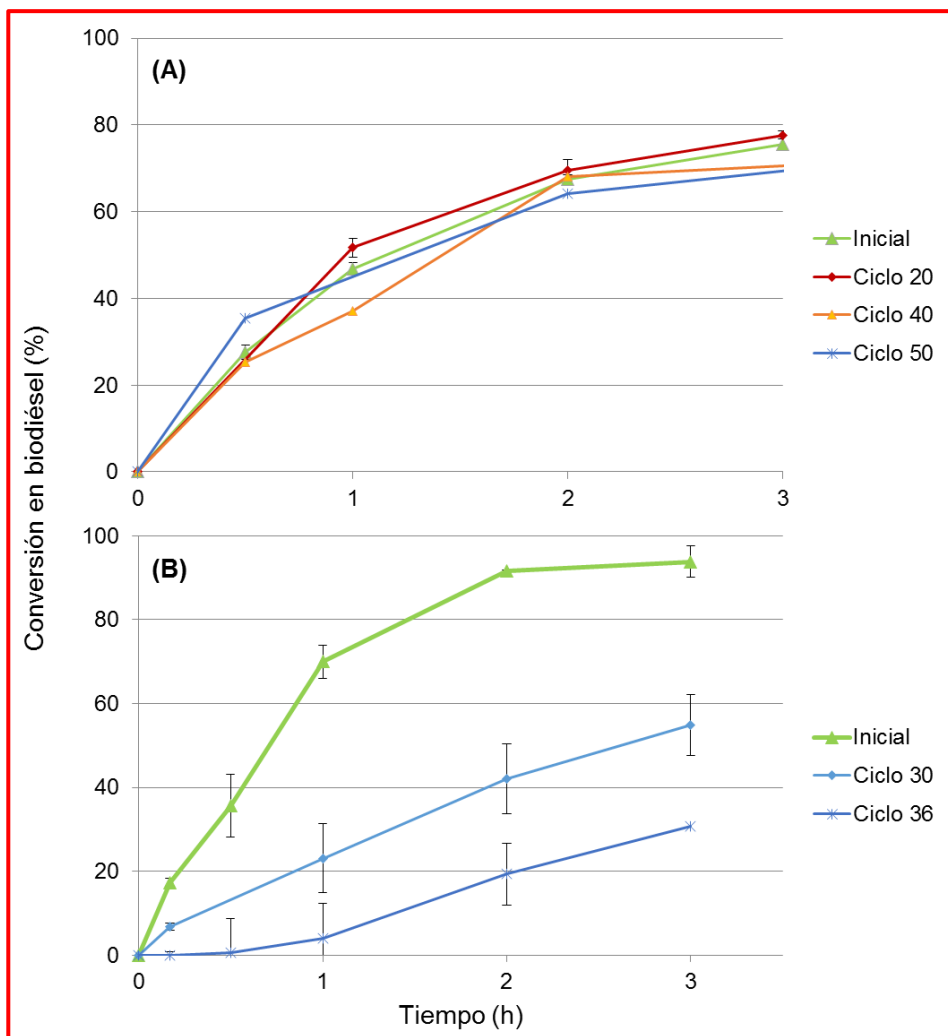
Se observó que la conversión total fue mayor, empleando metanol como donador de grupos alquilo (90% de conversión) frente al etanol (80%), en ambas agitaciones. La actividad inicial (Figura 5.6) fue mayor con agitación por ultrasonidos en los primeros ciclos. Sin embargo, debido a la progresiva disminución de la actividad, al cabo de 30 ciclos la velocidad de reacción con agitación mecánica fue muy superior a la obtenida con ultrasonidos.

Una vez más, se comprobó la robustez del biocatalizador, y tras 50 ciclos catalíticos de 24 h (un total de 1200 h), se comprueba la gran estabilidad de las mCLEAs en la agitación mecánica, ya sea con etanol o metanol como donador de grupos alquilo.

Rosset *et al.* (2013) consiguieron mantener la actividad del enzima (Novozym 435®) después de 10 ciclos catalíticos utilizando etanol como donador de grupos. Cuando utilizaron metanol, la actividad descendió hasta ser nula en el ciclo 10. Por otra parte, Ngo *et al.* (2013) consiguieron producir biodiésel utilizando metanol, pero el biocatalizador mostró los primeros signos de agotamiento tras 12 ciclos catalíticos.

Por otro lado, en las reacciones agitadas por ultrasonidos se apreció una reducción de la conversión de biodiésel a partir del ciclo 20, mostrando una paulatina caída de actividad. Se observó la misma tendencia con ambos alcoholes, si bien con etanol aparece 5 ciclos antes que con metanol.

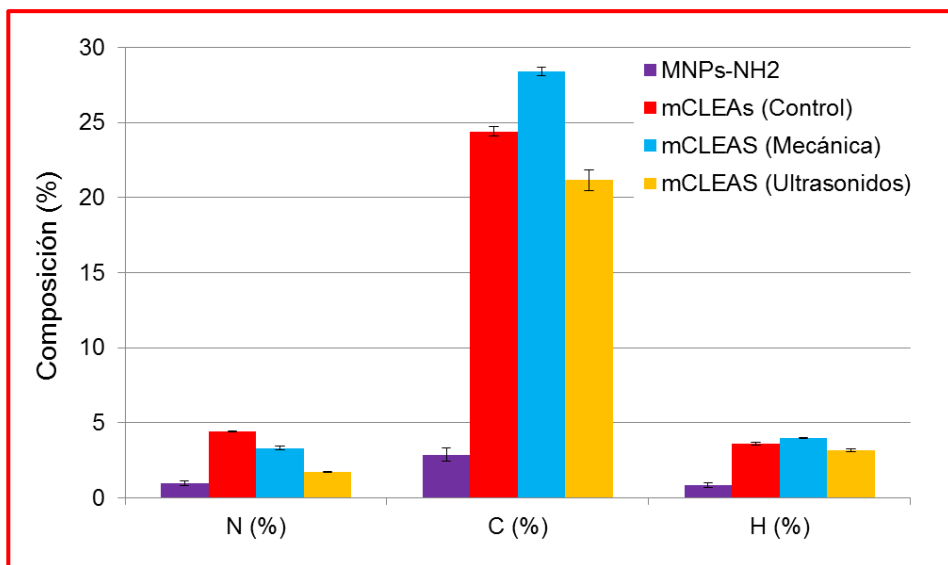
Se ha calculado la vida media de las mCLEAs agitadas por ultrasonidos en 31 ciclos con metanol y en 27 ciclos con etanol. Estos datos son muy superiores a los disponibles en la literatura en los que se ha conseguido, como máximo, reutilizar el catalizador entre 5 y 8 ciclos empleando la preparación comercial de CALB inmovilizada (Novozym 435®) (Yu *et al.* 2010; Michelin *et al.* 2015; Waghmare *et al.* 2015; Tavares *et al.* 2017).



**Figura 5.6: Actividad inicial de las mCLEAs con metanol en sucesivos ciclos de reacción. A:** Ciclos de reacción con agitación mecánica. **B:** Ciclos de reacción con agitación por ultrasonidos. Los ciclos se realizaron a 30°C con agitación mecánica durante 24 h, o con agitación magnética durante 3 h. La mezcla de reacción contenía msFFAs, metanol en una relación molar (alcohol:FFAs) 3:1 y *t*-butanol hasta un volumen final de 0,5 ml.

Para comprobar si la disminución de actividad se debía a la desnaturalización del enzima o a la liberación del mismo por rotura de los enlaces, se analizó la composición elemental de Nitrógeno (N), Carbono (C) e Hidrógeno (H) de las mCLEAs tras 50 ciclos catalíticos, en el caso de la agitación mecánica, o tras 37 ciclos catalíticos en el caso de la agitación por ultrasonidos (Figura 5.7).





**Figura 5.7: Análisis elemental (CNH) de las mCLEAs tras varios ciclos catalíticos.** Las mCLEAs habían sido utilizadas durante 50 ciclos en el caso de la agitación mecánica y durante 37 en la agitación por ultrasonidos.

Tras 50 ciclos de agitación mecánica se apreció una pequeña pérdida de enzima en las mCLEAs a juzgar por la disminución del porcentaje de N que se muestra en la Figura 5.7. Esto puede indicar que se ha liberado enzima por rotura de su unión. A pesar de lo anterior, las mCLEAs conservaron la mayoría del enzima inmovilizado y, según los datos de conversión, la lipasa se encontraba activa.

Las mCLEAs agitadas de forma más enérgica, como es la agitación por ultrasonidos, mostraron una evidente disminución en el contenido en N, aproximándose este valor al de las MNPs-NH<sub>2</sub> sin lipasa inmovilizada. Estos datos concuerdan con la falta de actividad que mostraron las mCLEAs en el último ciclo catalítico.

En conclusión, las mCLEAs de CALB son un biocatalizador muy robusto y capaz de reutilizarse en sucesivos ciclos catalíticos. Las mCLEAs no manifiestan, aparentemente, ninguna muestra significativa de agotamiento tras 50 ciclos, lo que sugiere que su empleo se podría prolongar durante otros muchos más ciclos.

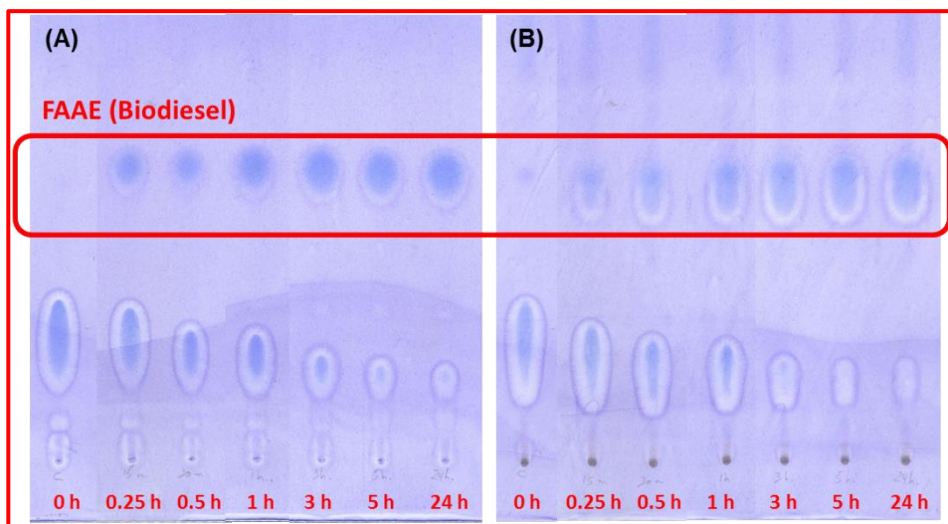
Estos resultados siguen la línea de los obtenidos por Li *et al.* (2006) quienes empleando condiciones de reacción semejantes a las empleadas en este trabajo (metanol como donador de grupos alquilo y t-butanol en la mezcla de reacción), consiguieron realizar 200 ciclos de 12 horas (2400 h) sin apreciar ningún descenso en la conversión total. Estos resultados los obtuvieron empleando Novozym435®, que es un biocatalizador menos resistente al metanol y a la agitación que las mCLEAs (Chen *et al.* 2011a; Tavares *et al.* 2017).

Por ello, se puede concluir que las mCLEAs son un biocatalizador robusto capaz de reutilizarse en numerosos ciclos, lo que conlleva una importante reducción del coste de producción del mismo. Este abaratamiento acaba repercutiendo en un descenso en el coste de producción del biodiésel, haciendo que éste pueda llegar a ser económicamente competitivo frente a los petrocombustibles tradicionales.

## **2.2. Escalado en la producción de biodiésel**

### **2.2.1. Escalado a 5 ml**

Inicialmente, se estudió un primer escalado de 0,5 ml a 5 ml y se comparó la velocidad de reacción empleando como sustrato las mezclas de ácidos grasos msFFAs y rsFFAs (Figura 5.8). La temperatura de reacción se mantuvo mediante contacto físico de los tubos en los que discurría la reacción, con una placa calefactora del equipo Radleys.



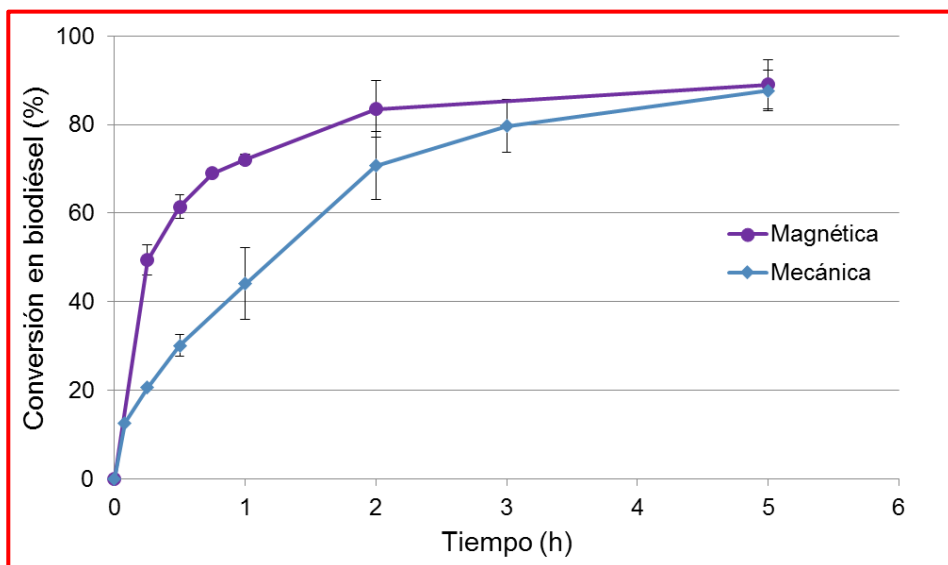
**Figura 5.8: Seguimiento por TLC de la conversión de FFAs en biodiésel con agitación magnética.** La mezcla de reacción contenía msFFAs o mrFFAs, etanol en una relación molar (alcohol:FFAs) 10:1 y sin co-disolvente. La reacción transcurrió a 30°C durante 24 h con agitación mecánica o magnética. Posteriormente, se analizaron muestras de la reacción en placas de gel de sílice, que se revelaron con Azul de Coomassie.

### 2.2.1.1. Estudio de la agitación

Tras comprobar que se obtenía una conversión en biodiésel parecida con ambas mezclas de FFAs, se estudió el efecto de la agitación con este volumen, empleando agitación mecánica o la agitación magnética en un equipo Radleys (Figura 5.9). La termostatación de la mezcla de reacción era diferente, ya que con agitación mecánica la temperatura se controlaba mediante una atmósfera a temperatura ambiente, mientras que en las muestras agitadas magnéticamente la temperatura se mantenía por contacto físico en una placa calefactora del equipo Radleys.

Se registró una mayor velocidad de reacción en las muestras agitadas magnéticamente, si bien este resultado puede estar influido por la forma de termostatación de la mezcla de reacción. Con volúmenes menores de 5 ml, la

agitación mecánica permitía velocidades de conversión algo superiores a la agitación magnética.

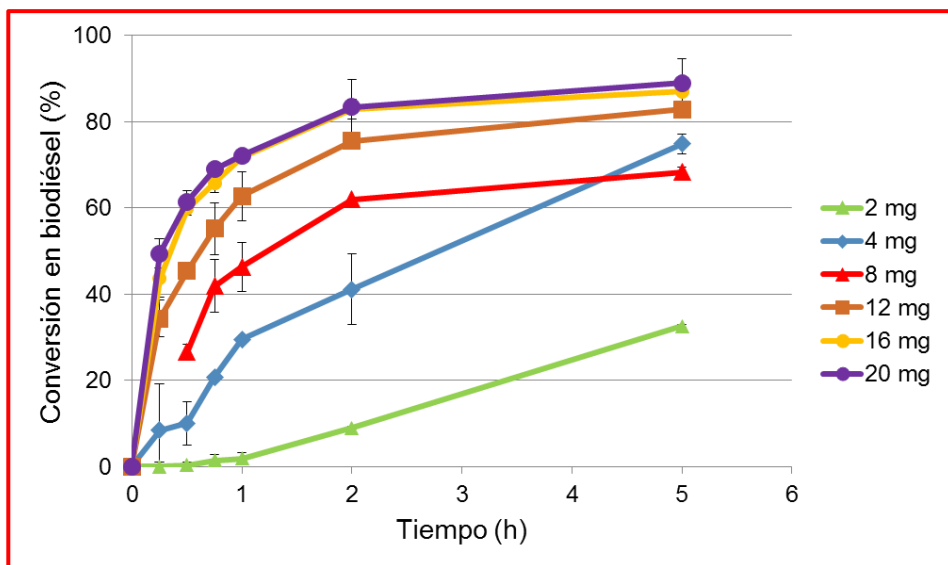


**Figura 5.9: Efecto de la agitación en la conversión de FFAs en biodiésel.** La mezcla de reacción contenía msFFAs, etanol en una relación molar (alcohol:FFAs) 10:1 y sin co-disolvente en un volumen de 5 ml. La incubación se mantuvo a 30°C con agitación magnética o mecánica.

### 2.2.1.2. Estudio de la cantidad de mCLEAs

Otro factor importante en la producción de biodiésel es la cantidad de catalizador utilizado. Por ello, se emplearon diferentes cantidades de mCLEAs en relación a la cantidad de FFAs en la reacción de esterificación, considerando como peso del catalizador todo el complejo magnético, no solamente a la proteína inmovilizada (Figura 5.10). Se ajustaron los factores de reacción según se habían optimizado para volúmenes menores, como es la adición de un co-disolvente en la reacción (*t*-butanol) y empleando metanol como donador de grupos alquilo.

Hasta ahora se había utilizado una concentración de biocatalizador de 1% (mCLEAs:FFAs, p/p), si bien para un escalado mayor se necesita reajustar este valor.



**Figura 5.10: Efecto de la cantidad de biocatalizador en la conversión de FFAs en biodiésel.** La mezcla de reacción contenía msFFAs, metanol en una relación molar (alcohol:FFAs) 3:1 y *t*-butanol hasta un volumen final de 5 ml. La incubación se mantuvo a 30°C con agitación magnética.

Al escalar la producción de biodiésel a 5 ml se comprobó que era excesiva la concentración de mCLEAs empleada hasta ahora (20 mg/5ml, 1% p/p), pudiendo reducirse a 16 mg/5 ml (0,8% p/p).

La mayoría de los autores coinciden en que altos rendimientos de conversión en la transesterificación requieren también emplear una alta concentración de enzima (Soler *et al.* 2016). Así, Hernández-Martín y Otero (2008) obtuvieron rendimientos del 100% en la transesterificación de aceites vegetales en 7 h de reacción con una concentración enzimática muy alta (50% biocatalizador:aceite, p/p). Por su parte, Chang *et al.* (2005) obtuvieron en 12 h un rendimiento del 98% usando también una cantidad de enzima elevada (42,3%, p/p). Sin embargo, con las mCLEAs de CALB se obtiene en 5 h una alta conversión (>90%) con una cantidad de enzima muy pequeña (0,8% p/p).

### 2.2.2. Escalado a 50 ml

Se aumentó el escalado para obtener biodiésel empleando un volumen de mezcla de reacción de 50 ml. Ante la gran cantidad de sustrato necesario, se sustituyó la mezcla de FFAs por aceite de oliva, reajustando por consiguiente la relación molar (alcohol:aceite) que se fijó en 6:1.

Debido a que la termostatación de volúmenes de 50 ml por la placa calefactora del equipo Radleys generaba un gradiente de temperatura en la mezcla de reacción, se empleó un incubador orbital (Kuhner ISF1-X, Birsfelden, Suiza) que mantenía la temperatura deseada.

#### 2.2.2.1. Estudio de la cantidad de mCLEAs

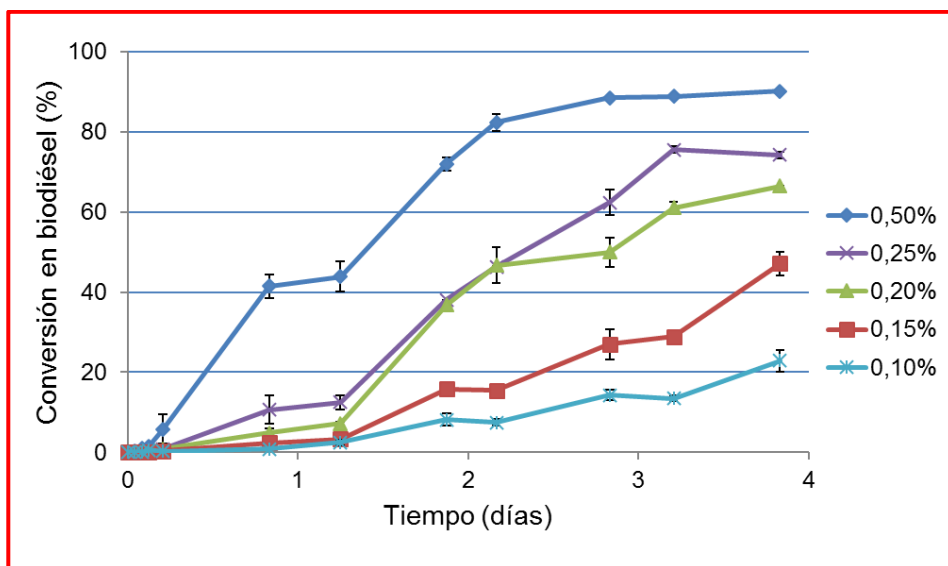
Con el nuevo volumen, fue necesario reajustar la concentración de biocatalizador respecto al aceite de oliva. Para ello, se incubaron diferentes concentraciones de mCLEAs con aceite de oliva, metanol en una relación molar (alcohol:aceite) 6:1 y t-butanol hasta un volumen final de 50 ml.

La reacción transcurrió en una atmósfera atemperada a 30°C en un incubador orbital (Kuhner ISF1-X, Birsfelden, Suiza), agitándose la mezcla con un agitador magnético. Las conversiones obtenidas se muestran en la Figura 5.11.

En el escalado de producción de biodiésel a 50 ml se determinó que la concentración óptima de mCLEAs en la reacción era de 0,5% (mCLEAs:aceite, p/p) ya que en un tiempo aceptable (48 h) se alcanzaba el máximo de conversión (90%), si bien se decidió ahorrar al máximo el uso de biocatalizador y se empleó en futuras reacciones 0,2% (p/p).

La cantidad de enzima empleado en la reacción es muy baja si se compara con la empleada por otros autores (Tabla 5.1). Solo Mendes *et al.* (2011) utilizaron una relación igual (0,2%, p/p) pero a una temperatura mucho mayor (45°C). Al comparar nuestros resultados con los de otros autores que emplean

preparaciones de lipasa inmovilizada de forma parecida a la empleada en este trabajo, Wang *et al.* (2009), Xie y Ma (2010), Rastian *et al.* (2016) y Mehrasbi *et al.* (2017), se comprueba que nuestras condiciones experimentales son más ventajosas económicamente: menor temperatura, menor relación de alcohol y la ya mencionada menor cantidad de enzima.



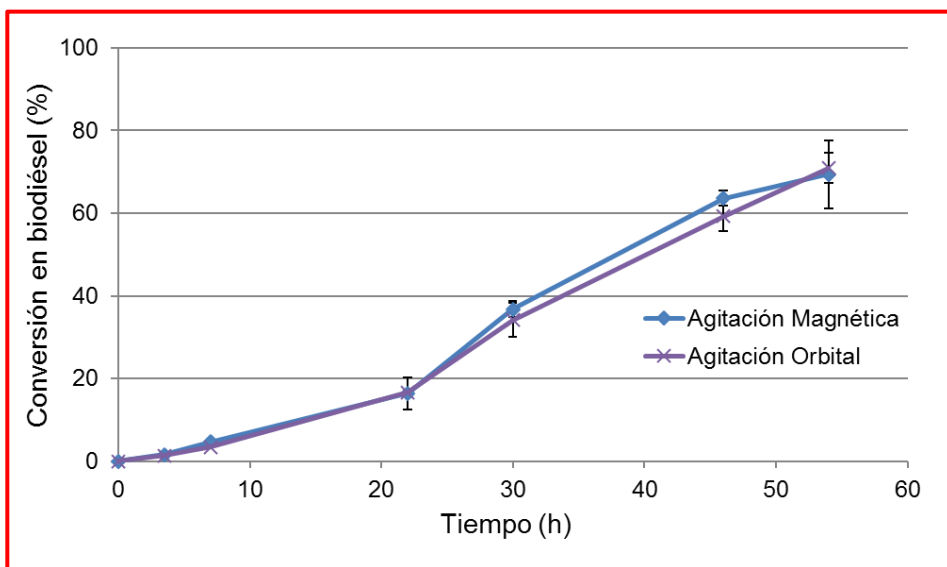
**Figura 5.11: Efecto de la cantidad de biocatalizador (p/p) en la conversión en biodiésel.** La mezcla de reacción contenía aceite de oliva, metanol en una relación molar (alcohol:aceite) 6:1 y *t*-butanol hasta un volumen final de 50 ml.

### 2.2.2.2. Estudio de la agitación

Se comparó la agitación magnética con la orbital propia del incubador donde se incubaron las reacciones (Figura 5.12). Para ello, se seleccionó inicialmente una velocidad orbital de 150 rpm, ya que el nivel de turbulencia de la mezcla se parecía al observado con agitación magnética.

En la Figura 5.12 se aprecia que los dos modos de agitación muestran una conversión semejante. Se decidió continuar con la agitación orbital por ser, aparentemente, la menos agresiva para la integridad física del biocatalizador, ya

que la agitación magnética podría dañar las mCLEAs, disminuyendo el rendimiento de la obtención de biodiésel (Itabaiana Jr. *et al.* 2013).

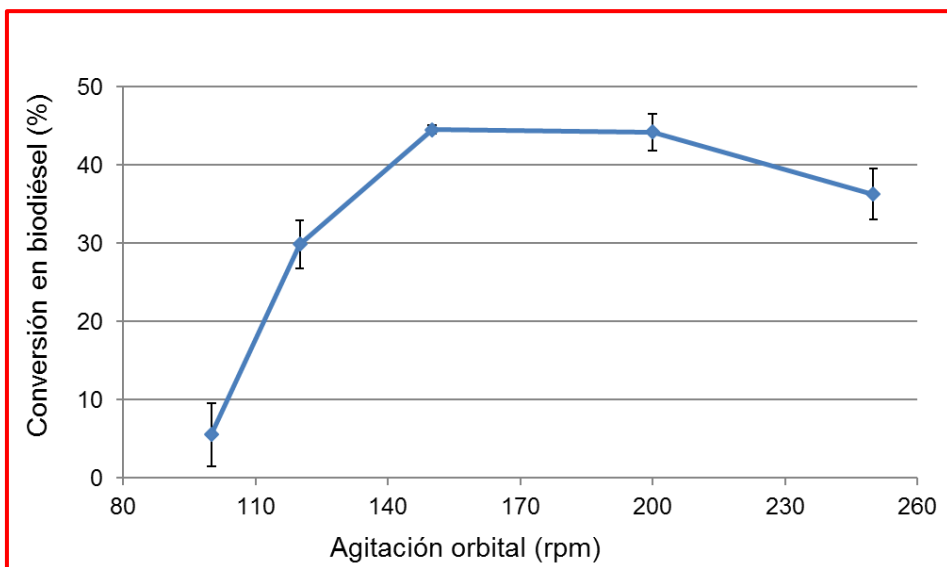


**Figura 5.12: Efecto de la agitación en la conversión de aceite en biodiésel.** La mezcla de reacción contenía aceite de oliva, metanol en una relación molar (alcohol:aceite) 6:1 y *t*-butanol hasta un volumen final de 50 ml. La incubación se mantuvo a 30°C con agitación magnética u orbital (150 rpm) en un incubador.

Posteriormente, se estudió la agitación orbital, desde un sistema poco agitado (100 rpm) hasta uno con agitación vigorosa (250 rpm) (Figura 5.13).

Se determinó que a 150 rpm se obtenía una agitación óptima para producir de biodiésel a partir de aceite de oliva. Mayores velocidades orbitales no se traducían en una mejor conversión, observándose incluso un descenso a 200 rpm. Velocidades de agitación menores de 150 rpm eran incapaces de mezclar adecuadamente los componentes de la mezcla de reacción, lo que se traducía en una menor conversión.





**Figura 5.13: Efecto de la agitación orbital en la conversión de aceite en biodiésel al cabo de 40 h.** La mezcla de reacción contenía aceite de oliva, metanol en una relación molar (alcohol:aceite) 6:1 y *t*-butanol hasta un volumen de 50 ml. La incubación se mantuvo a 30°C con agitación orbital.

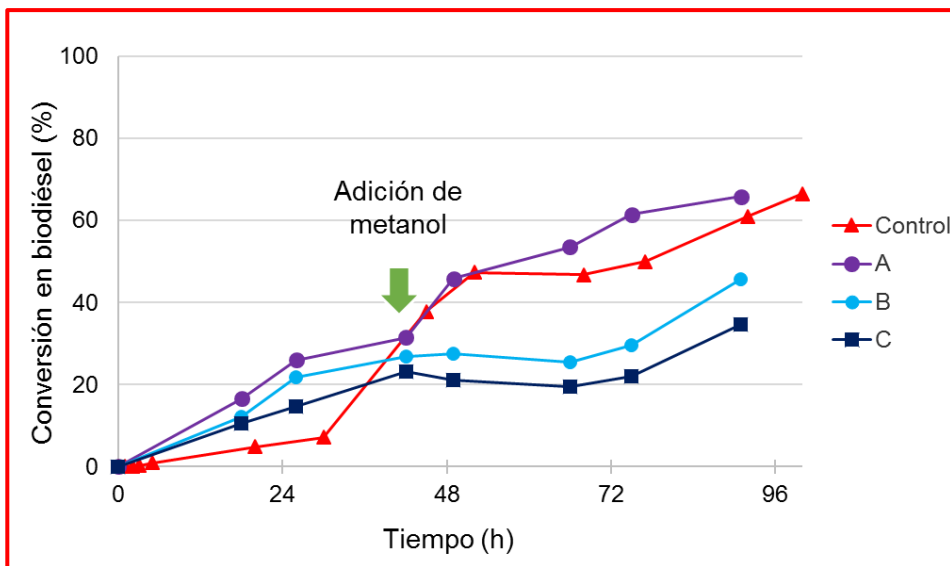
### 2.2.2.3. Efecto de la adición de metanol

Se ha descrito repetidamente en bibliografía el efecto inhibitorio del metanol, por lo que se evitó que su concentración fuera elevada en la mezcla de reacción. Existen diferentes posibilidades para conseguir este fin, como son el uso de un co-disolvente en la mezcla de reacción o la adición paulatina de metanol (Korman *et al.* 2013).

En este trabajo se ha empleado *t*-butanol como co-disolvente, pero también se estudió con detalle la adición paulatina de metanol para optimizar la reacción. Para ello, se añadió metanol a una concentración final de 6,9%, 13,7% y 20,65% (v/v), a las 42 h de reacción, y se siguió la evolución de la conversión. Los resultados se muestran en la Figura 5.14.

Tras la adición de metanol a las 42 h de reacción sólo se apreció aumento de conversión en la reacción que se suplementó con un 6,9% (v/v). La adición de

mayores cantidades de metanol se tradujo en una parada de la conversión, probablemente por el efecto inhibitorio que ejerce el metanol sobre la lipasa y sobre la agregación de las mCLEAs (véase apartado “2.3.2.8 Efecto del alcohol sobre las mCLEAs” del Capítulo IV de esta Memoria).



**Figura 5.14: Efecto de la adición de metanol en la conversión en biodiésel.** La mezcla de reacción contenía aceite de oliva, mCLEAs (0,2% p/p), inicialmente metanol en una relación molar (alcohol:aceite) 6:1, y *t*-butanol hasta un volumen final de 50 ml. La incubación se mantuvo a 30°C con agitación orbital. La adición de metanol a las 42 h de reacción es como sigue: En (A) Se añade 6,9% (v/v) de metanol, en (B) 13,7% (v/v) y en (C) 20,65% (v/v) de metanol. **Control:** Sin adición de metanol.

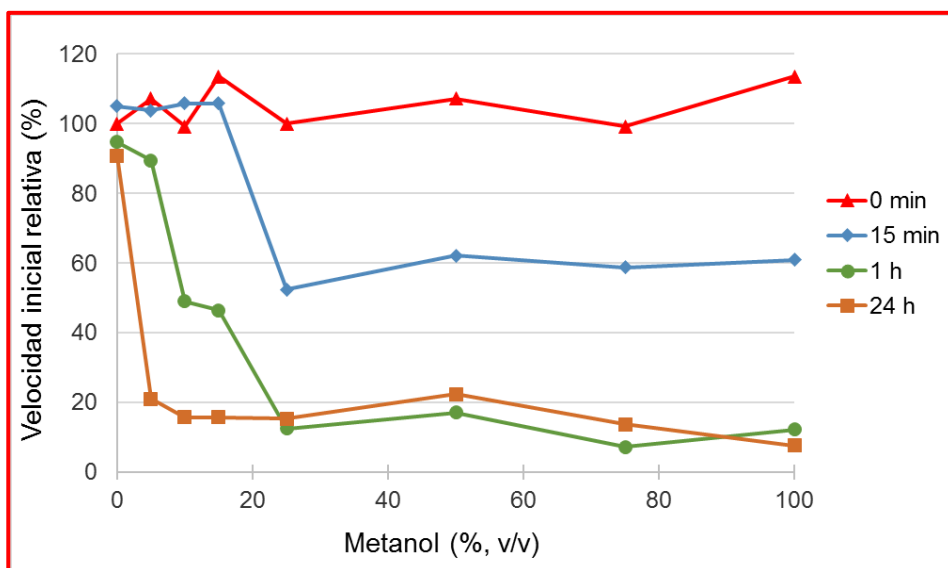
Rodrigues *et al.* (2010) consiguieron aumentar la conversión en un 10% mediante la adición de etanol en dos pasos, mientras que Soler *et al.* (2016) no apreciaron un aumento significativo en la conversión total añadiendo 1 mol de metanol a la mezcla de reacción cada 2 h. Esto sugiere que la reacción no está solamente condicionada por la inhibición o inactivación enzimática causada por metanol. De hecho, algunos autores han sugerido que el glicerol, que es el subproducto de la obtención de biodiésel, puede disminuir la actividad de la lipasa al adherirse a la superficie de la misma (Dizge y Keskinler 2008; Hernández-Martín y Otero 2008).

### 2.2.3. Escalado a 100 ml

A la vez que se realizó el escalado a 100 ml, se estudió con detalle el efecto que el metanol ejerce sobre las mCLEAs en la reacción. También se estudió el efecto sobre la velocidad enzimática de la presencia de agua en la mezcla de reacción.

#### 2.2.3.1. Efecto del metanol en la reacción

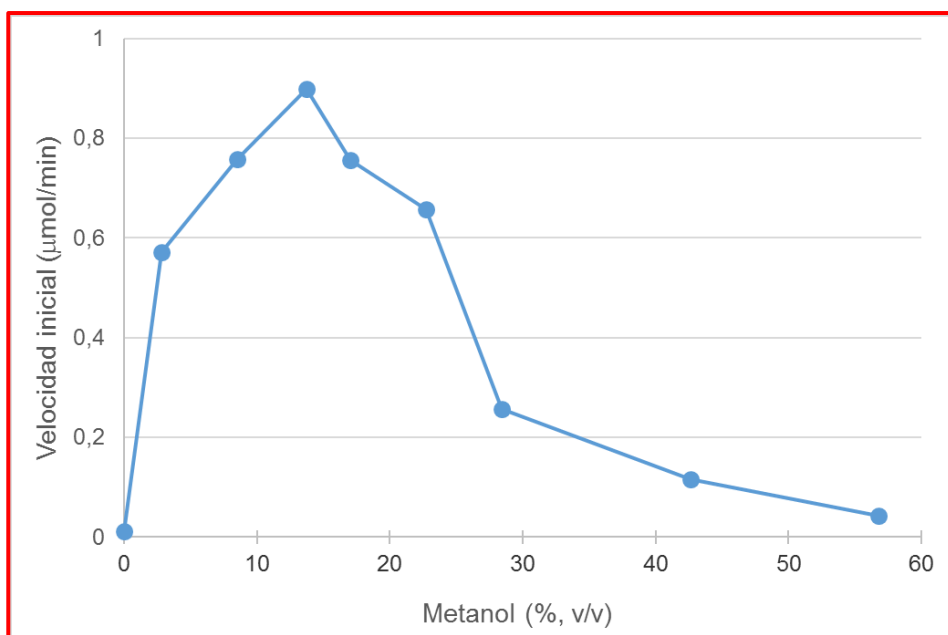
En primer lugar, se estudió el efecto del metanol sobre las mCLEAs. Para ello, se incubó a 30°C, lotes de 40 mg de mCLEAs con diferentes diluciones de metanol (0%, 5%, 10%, 15%, 25%, 50%, 75%, 100%) en agua durante diferentes tiempos (0, 15 y 60 min y 24 h). Posteriormente, se retiró la mezcla de metanol:agua y se inició la reacción a 30°C con agitación orbital y empleando aceite de oliva y metanol en una relación molar (alcohol:aceite) 6:1, y *t*-butanol hasta un volumen final de 100 ml (Figura 5.15).



**Figura 5.15: Velocidad inicial relativa de la conversión de aceite en biodiésel tras la incubación de las mCLEAs con metanol.** La mezcla de reacción contenía aceite de oliva, 0,2% (p/p) mCLEAs, metanol en una relación molar (alcohol:aceite) 6:1 y *t*-butanol hasta un volumen final de 100 ml. La incubación transcurrió a 30°C con agitación en un incubador orbital (150 rpm) y con *t*-butanol.

Los resultados de la Figura 5.15 muestran que la lipasa de las mCLEAs se inhibe por alta concentración de metanol a largo plazo. A tiempos cortos (15 min), las mCLEAs mantienen su actividad hasta cuando se incuban con 15% (v/v) de metanol, mientras que concentraciones mayores de alcohol se traducen en una fuerte caída de hasta el 50% de la velocidad inicial.

Posteriormente, se estudió el porcentaje óptimo de metanol en la reacción. Para ello, se añadieron diferentes porcentajes de metanol (en detrimento del *t*-butanol) desde 0% hasta 55% (v/v) en la mezcla de reacción (Figura 5.16).



**Figura 5.16: Efecto del metanol en la velocidad inicial de la reacción.** La mezcla de reacción contenía aceite de oliva, metanol a diferentes porcentajes, 0,2% (p/p) mCLEAs y *t*-butanol en un volumen final de 100 ml. La incubación se mantuvo a 30°C con agitación orbital (150 rpm).

Como muestra la Figura 5.16, la reacción con mayor velocidad inicial es la que transcurre con un porcentaje de metanol de 13,7% (v/v), que corresponde a una relación molar (alcohol:aceite) 6:1, es decir, la empleada hasta ahora. Mayores porcentajes de metanol parecen inhibir el enzima.

El efecto del metanol en la estabilidad de CALB se ha estudiado en detalle, ya que se ha descrito que este alcohol se comporta como inhibidor competitivo de lipasas libres (Shimada *et al.* 2002; Lam *et al.* 2010; Kulschewski *et al.* 2013). El enzima se inactiva irreversiblemente cuando el alcohol excede su límite de solubilidad en la mezcla de reacción (López *et al.* 2015), afectando a la producción de biodiésel.

La caída de la velocidad inicial observada a alto porcentaje de metanol se debe a un mecanismo complejo en el que actúan varios elementos (Fang *et al.* 2014). Por un lado, el metanol tiene un evidente efecto inhibitorio sobre la lipasa y, por otro lado, induce la formación de agregados mayores de mCLEAs, lo que se traduce en una importante reducción de la superficie de contacto enzima-sustrato (véase apartado “2.3.2.8. Efecto del alcohol sobre las mCLEAs” del Capítulo IV de esta Memoria).

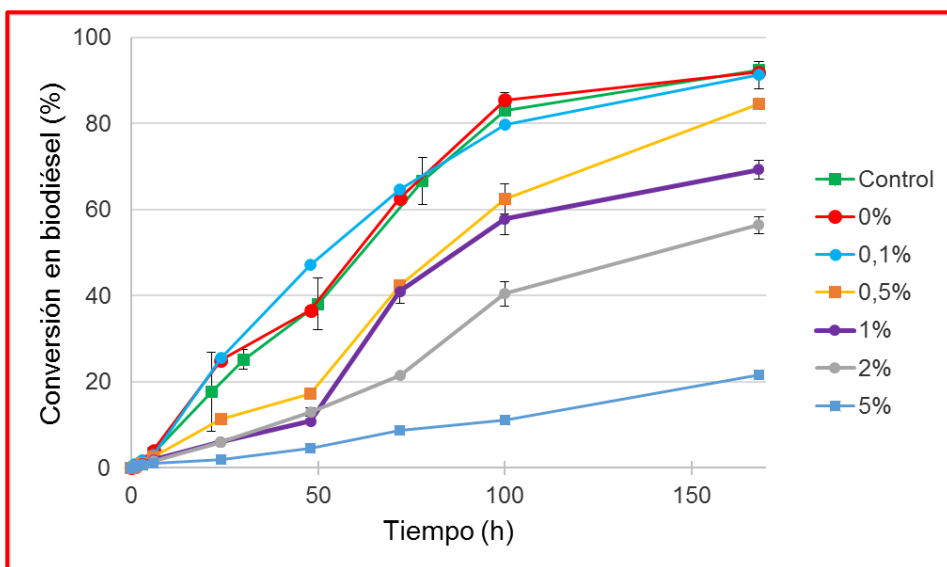
### **2.2.3.2. Estudio de la presencia de H<sub>2</sub>O en la reacción**

La cantidad de agua presente en la mezcla de reacción afecta la integridad estructural y a la flexibilidad del enzima. Las reacciones de transesterificación en medio orgánico transcurren en ambientes microacuados (Shimada *et al.* 2002) para que la lipasa mantenga su estructura tridimensional, ya que una excesiva concentración de agua puede inducir la hidrólisis del aceite en lugar de su transesterificación.

Hay aceites que contienen pequeñas cantidades de agua que hacen que se vea dificultada la reacción de esterificación. Por ello, se decidió estudiar el efecto que produce la presencia de agua añadida en la reacción y analizar cómo afecta a la conversión final de biodiésel y a la actividad de las mCLEAs.

Con este fin, se comparó la reacción de transesterificación en las condiciones hasta ahora empleadas, con reacciones en las que la mezcla de reacción contenía

diferentes porcentajes de agua (0,1%, 0,5%, 1%, 2% y 5%, p/p). También se incluyó una reacción control en la que se había eliminado al máximo la humedad, al tratar los disolventes con desecadores moleculares (Molecular Sieves) (Figura 5.17).



**Figura 5.17: Efecto del agua presente en la mezcla de reacción, en la conversión de aceite en biodiésel.** La mezcla de reacción contenía aceite de oliva, mCLEAs (0,2% p/p), metanol en una relación molar (alcohol:aceite) 6:1 y *t*-butanol hasta un volumen final de 50 ml. La incubación se mantuvo a 30°C con agitación orbital (150 rpm).

En la Figura 5.17 se muestra que la conversión de aceite de oliva en biodiésel fue mayor en muestras que no contenían agua añadida (0%), o que contenían agua en proporción muy pequeña (control y 0,1%). El rendimiento en la obtención de biodiésel fue mucho menor en las reacciones catalizadas en presencia de elevada concentración de agua ( $\geq 0,5\%$  p/p).

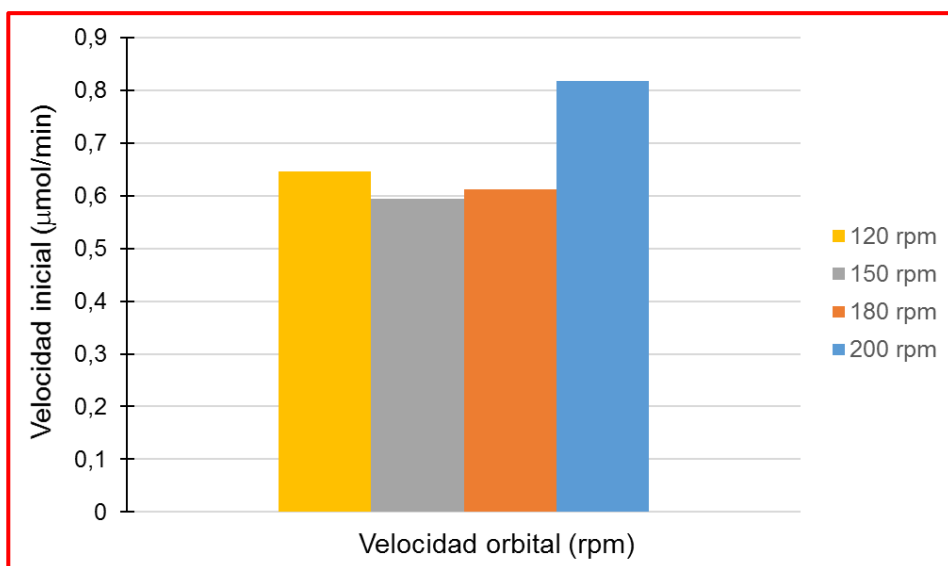
En presencia de una concentración pequeña de agua (0,1%, p/p) se aprecia una mejora en la velocidad inicial, si bien la conversión final es similar a la de las muestras sin agua añadida. Rastian *et al.* (2016) han obtenido resultados similares empleando, en su caso, una proporción de agua mayor, de en torno al 1-2% (p/p).

### 2.2.4. Escalado a 500 ml

Se continuó el escalado hasta un volumen de 500 ml y se reajustaron diferentes condiciones de reacción, como la temperatura y la agitación.

#### 2.2.4.1. Estudio de la agitación

Se comparó la velocidad inicial de reacción a diferentes velocidades de agitación orbital, desde un sistema poco agitado (120 rpm) hasta un sistema con agitación vigorosa (200 rpm) (Figura 5.18).



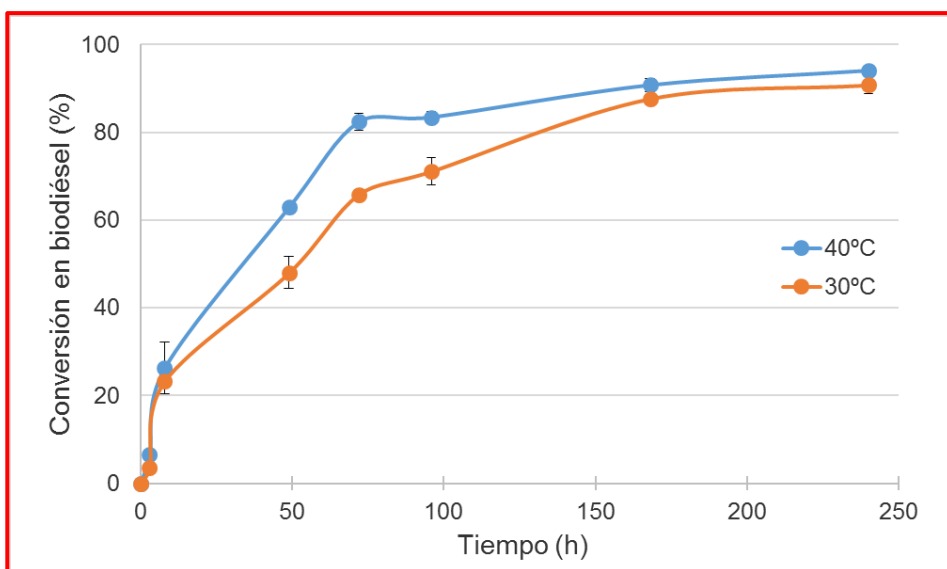
**Figura 5.18: Efecto de la agitación orbital en la velocidad inicial de conversión en biodiésel.** La mezcla de reacción contenía aceite de oliva, metanol en una relación molar (alcohol:aceite) 6:1, 0,2% (p/p) mCLEAs y *t*-butanol hasta un volumen final de 500 ml. La incubación se mantuvo a 30°C con agitación orbital.

Se determinó que a una velocidad orbital de 200 rpm se obtenía una mezcla óptima de los componentes de la reacción para producir biodiésel en un volumen de 500 ml.

### 2.2.4.2. Estudio de la temperatura óptima

Finalmente, se determinó la temperatura óptima comparando la conversión en biodiésel a dos temperaturas, 30°C y 40°C (Figura 5.19).

No se emplearon temperaturas superiores a 40°C ya que, en trabajos anteriores realizados en el Grupo (Cruz-Izquierdo *et al.* 2014), se sabía que incubaciones a temperaturas superiores a 40°C afectaban a la actividad del enzima, impidiendo la posible reutilización del biocatalizador.



**Figura 5.19: Efecto de la temperatura en la conversión de aceite en biodiésel.** La mezcla de reacción contenía aceite de oliva, 0,2% (p/p) de mCLEAs, metanol en una relación molar (alcohol:aceite) 6:1 y *t*-butanol hasta un volumen final de 500 ml. La incubación se mantuvo a 30°C y 40°C con agitación orbital (200 rpm).

Se comprobó que a 40°C se consiguió una mayor conversión en las primeras horas de reacción, obteniéndose valores cercanos al 90% de conversión en apenas 100 h, frente a las más de 150 h necesarias a 30°C. Sin embargo, al cabo de 250 h de incubación ya se obtuvieron conversiones parecidas (>95%) en ambas temperaturas.

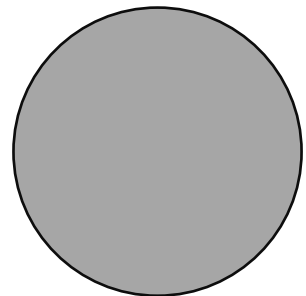


Además, según aparece en la bibliografía (Tabla 5.1), son pocos los trabajos que realizan la conversión en biodiésel a una temperatura tan baja como la empleada en este trabajo (30°C), situándose la temperatura media en torno a 40°C ó 50°C.



# Capítulo VI

## Discusión General





La necesidad de encontrar una alternativa adecuada a los combustibles derivados del petróleo, conlleva una intensa investigación para encontrar nuevas materias primas para producirlo. Un prometedor candidato puede ser el biodiésel, obtenido a partir de fuentes renovables y sostenibles, como son el aceite de plantas oleaginosas o de microalgas.

En este trabajo se ha obtenido biodiésel, catalizado por mCLEAs de CALB, a partir de lípidos (aceites y FFAs) extraídos de biomasa de las microalgas *Chlorella vulgaris* var L3 y *Scenedesmus* sp. Este biocatalizador magnético se ha obtenido al entrecruzar con glutaraldehído agregados de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) con nanopartículas magnéticas (MNPs) funcionalizadas con grupos  $-NH_2$ .

El biocatalizador magnético obtenido presenta un tamaño medio de partícula en torno a 300 nm y mantiene el superparamagnetismo de las MNPs de magnetita (de 10 nm de diámetro) que lo integran. Por esto, las mCLEAs son fáciles de recuperar de la mezcla de reacción utilizando un imán, permitiendo su reutilización en sucesivas reacciones. Esta característica es de suma importancia, ya que supone una reducción del coste económico de la producción de biodiésel.

El biodiésel es un derivado del aceite que es renovable y biodegradable. Además, su combustión no supone un aumento neto de los niveles atmosféricos

de CO<sub>2</sub> (Fukuda *et al.* 2001). Aunque se puede obtener biodiésel de plantas oleaginosas, el uso de esta materia prima implica problemas sociales y medioambientales. Por ejemplo, la producción de aceite de palma (uno de los más empleados actualmente), supone la deforestación de vastas áreas de bosques naturales que causan daños irreparables en la biodiversidad de los ecosistemas.

Además, existe cierto debate sobre si la utilización de plantas oleaginosas, como la palma, conlleva una reducción real en las emisiones de gases de efecto invernadero (Rawat *et al.* 2013). Incluso se duda si el equilibrio energético es positivo, ya que se estima que solo la mitad de la energía empleada en el proceso acaba en biodiésel (Scott *et al.* 2010).

En cambio, la utilización de microalgas para producir biodiésel podría solventar estos problemas. Asimismo, las microalgas tienen tasas de crecimiento rápidas y tiempos de generación cortos que permiten varias cosechas a lo largo del año. Además, las microalgas tienen mayores rendimientos y productividad de lípidos que las plantas, pudiendo éstos ser de reserva y con un alto nivel de saturación, siendo una materia prima adecuada (Rawat *et al.* 2013).

También se puede modificar y aumentar la cantidad de lípidos en la biomasa microalgal mediante el uso ingeniería genética o cultivando las células bajo determinadas condiciones nutricionales. Así, al someter a deficiencia nitrogenada cultivos de *C. vulgaris* y *Scenedesmus* sp. no sólo se aumenta el contenido lipídico de la biomasa microalgal, sino que también origina un aumento en la proporción de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, en detrimento de los polinsaturados (PUFAs), pudiendo obtenerse al final un biodiésel de mayor calidad (Rawat *et al.* 2013; Ikarán *et al.* 2015; Picó *et al.* 2017).

La viabilidad económica de la producción de biodiésel a partir de biomasa microalgal depende principalmente de la energía empleada en el cosechado de la biomasa y en la extracción de los lípidos (Kim *et al.* 2013a). Uno de los principales

problemas es la dificultad en extraer lípidos saponificables (que puedan convertirse en biodiésel), sin extraer los estructurales insaponificables. Por lo tanto, encontrar el método más eficiente y las condiciones óptimas para extraer los lípidos microalgales son cuestiones importantes para reducir los costes en la producción de biodiésel (Mubarak *et al.* 2015).

La saponificación directa de aceites parece un proceso adecuado de extracción, ya que proporcionan buen rendimiento, y extrae FFAs incluso de lípidos insaponificables. Además, este método supone una importante reducción del coste energético, ya que evita el secado de la biomasa microalgal. Asimismo, con la saponificación se logra una fácil separación y recuperación de la fracción saponificable, obteniéndose muestras más puras de la biomasa deslipilizada de la que todavía se puede conseguir otros bioproductos (Picó *et al.* 2017).

Después de obtener y caracterizar el biocatalizador magnético, así como de cultivar y extraer los lípidos de la biomasa microalgal, se evaluó la obtención de biodiésel mediante catálisis enzimática y química (ácida).

Las mCLEAs son capaces de catalizar la transesterificación de aceites, independientemente del proceso de extracción que se haya usado, de su viscosidad o de la presencia de lípidos no saponificables, como fosfolípidos, aunque la conversión en biodiésel es muy diferente entre los aceites empleados. Los mejores resultados se han obtenido de biomasa extraída de *Scenedesmus* sp. por saponificación, ya que la preparación lipídica es más pura, no contiene trazas de disolventes que puedan inhibir a la lipasa, y no contiene fosfolípidos que, según Watanabe *et al.* (2002), afectan a la actividad enzimática.

Para hacer económicamente viable la obtención de biodiésel a partir de microalgas se ha de optimizar todas las etapas de su producción. Por ello, en este trabajo se estudiaron y optimizaron diferentes factores de la reacción, como son:

- I. Temperatura
- II. Modo de agitación
- III. Tipo de donador de grupos alquilo y proporción del mismo
- IV. Uso de un co-disolvente en la mezcla de reacción
- V. Cantidad de agua presente
- VI. Cantidad de biocatalizador empleado
- VII. Reutilización del biocatalizador
- VIII. Escalado desde 0,5 ml hasta 500 ml de la mezcla de reacción

La temperatura óptima de reacción se sitúa entre 30 y 40°C, ya que a temperatura mayor no se incrementa significativamente la conversión de biodiésel. Además, estudios previos (Cruz-Izquierdo *et al.* 2014), han demostrado que la incubación a temperatura mayor de 50°C provoca la pérdida de actividad del biocatalizador en sucesivos ciclos catalíticos.

Otro de los factores estudiados con detalle es la agitación de la mezcla de reacción. Con ultrasonidos se obtiene una velocidad de reacción muy superior a la medida con agitación mecánica o magnética. Si bien se ha descrito que los ultrasonidos acaban dañando la estructura secundaria del enzima, lo que provoca su inactivación (Michelin *et al.* 2015; Waghmare *et al.* 2015; Tavares *et al.* 2017). Aunque los ultrasonidos a largo plazo afectan la estructura y agregación de las mCLEAs, se ha conseguido que las mCLEAs mantengan su actividad durante al menos 20 ciclos catalíticos, lo que supera a los 5 ciclos obtenidos por Waghmare *et al.* (2015), y por Tavares *et al.* (2017). Se ha demostrado que la pérdida de actividad de las mCLEAs se debe, probablemente, a la liberación de lipasa de los agregados entrecruzados. Para minimizar la liberación del enzima y conseguir alto rendimiento de conversión en biodiésel, se puede ultrasonar las mCLEAs durante el primer minuto de reacción. Con esto se consigue dispersar el biocatalizador en



la mezcla de reacción, aumentando la relación superficie-volumen de las mCLEAs, y en consecuencia la conversión en biodiésel.

Otro de los factores estudiados para optimizar la reacción es el tipo de donador de grupos alquilo, así como su relación molar en la mezcla de reacción. En reacciones de transesterificación (con ausencia de co-disolvente en la mezcla), una reacción molar elevada con alcoholes primarios resultaba en una menor conversión en biodiésel. En cambio, en reacciones de esterificación se obtiene un mejor rendimiento con alcoholes primarios que con el secundario 2-propanol, si bien, a lo largo de sucesivos ciclos catalíticos, los primarios inactivan el enzima.

Es bien conocido el efecto negativo que sobre la actividad de la lipasa ejercen los alcoholes primarios a elevada concentración (Shimada *et al.* 1999; Chen y Wu 2003). Por ello, una estrategia común para proteger al enzima así como para mejorar la solubilidad entre triglicéridos y alcoholes, es la adición a la mezcla de reacción de disolventes orgánicos (Lotti *et al.* 2015). El uso de un co-disolvente orgánico supone un mayor coste, tanto por su uso como por la necesidad de utilizar métodos más costosos para extraer el biodiésel final (Sankaran *et al.* 2016). Sin embargo, se puede rentabilizar el empleo de co-disolventes porque su uso aumenta el rendimiento en la obtención de biodiésel.

Las mCLEAs de CALB son un biocatalizador robusto que mantiene su actividad en presencia de diversos disolventes orgánicos apolares. Sin embargo, su actividad se ve afectada con disolventes polares, como DMSO o acetato de etilo, que secuestran el agua de solvatación del enzima y provocan la pérdida de su actividad. Sin embargo, el t-butanol presenta las mejores características para ser empleado como co-disolvente en la mezcla de reacción, ya que favorece un alto rendimiento de transesterificación, al reducir la viscosidad del aceite y disolver el glicerol. Por esta razón, este alcohol terciario se emplea con frecuencia en la

producción de biodiésel (Li *et al.* 2006; Lai *et al.* 2012; Rastian *et al.* 2016; Mehrasbi *et al.* 2017).

Posteriormente, se estudió el efecto del metanol en la reacción, esta vez ya utilizando t-butanol como co-disolvente en la mezcla de reacción, comprobándose que la relación molar (alcohol:aceite) óptima es 6:1, que corresponde a un 13,7% (v/v). La caída de velocidad inicial observada a alta concentración de metanol se debe a un mecanismo complejo en el que actúan varios elementos. Por un lado, el metanol es un inhibidor del enzima, y por otro induce la formación de agregados mayores de mCLEAs, que se traduce en una reducción significativa de la superficie de contacto enzima-sustrato.

También se estudió el efecto de la presencia de agua en la mezcla de reacción. Con una pequeña concentración de agua (0,1%, p/p) se obtiene una mayor velocidad inicial, si bien la conversión final en biodiésel es similar a la de muestras sin agua añadida. Rastian *et al.* (2016) han obtenido similares resultados pero empleando una mayor proporción de agua, en torno al 1-2% (p/p).

En cuanto a la cantidad de enzima utilizada en la reacción, ésta se disminuyó de un 1% hasta un 0,2% (p/p, biocatalizador/aceite). La cantidad de enzima empleado en este trabajo es muy baja, si se compara con la usada por otros autores. Sólo Mendes *et al.* (2011) utilizan una relación igual (0,2% p/p) pero a una temperatura de reacción mucho mayor (45°C). En resumen, si se compara los resultados obtenidos con preparaciones de lipasa inmovilizada de forma parecida a la aquí empleada [Wang *et al.* (2009), Xie y Ma (2010), Rastian *et al.* (2016) y Mehrasbi *et al.* (2017)], se comprueba que nuestras condiciones son mucho más ventajosas económicamente, ya que se emplean menor temperatura, menor relación de alcohol y, la ya mencionada, menor cantidad de enzima. Además, en estas condiciones las mCLEAs, se pueden reutilizar durante al menos 50 ciclos

catalíticos (un total de 1200 h) sin que se aprecie ningún descenso significativo en la conversión en biodiésel.

Por ello, se puede concluir que las mCLEAs de CALB son un robusto biocatalizador capaz de ser reutilizado en numerosos ciclos catalíticos consecutivos, lo que supone una importante reducción del coste de su obtención. Este abaratamiento del biocatalizador, repercute en un menor coste en la producción del biodiésel, haciendo que este biocombustible pueda llegar a ser económicamente competitivo frente a los petrocombustibles tradicionales.

Como ya se ha detallado, es muy parecida la conversión en biodiésel obtenida por catálisis química (ácida) y enzimática, a pesar que son muy diferentes las condiciones utilizadas en ambos casos. Así, la catálisis ácida se realiza a 100°C durante 1 h, mientras que la enzimática es a 30°C durante 3 h. Igualmente, el biocatalizador magnético permite:

- I. Su fácil recuperación de la mezcla de reacción para reutilizarse durante más ciclos catalíticos
- II. Condiciones de reacción más económicamente ventajosas
- III. Usar disolventes más respetuosos con el medio ambiente

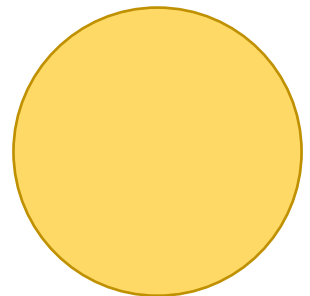
Como resumen final, en la Tabla 6.1 se sintetiza las mejores condiciones determinadas en este trabajo para obtener biodiésel enzimáticamente a partir de lípidos de microalgas.

**Tabla 6.1: Resumen de las condiciones óptimas para la obtención de biodiésel a partir de biomasa microalgal.**

<b>Microalga</b>	<i>Scenedesmus</i> sp.
<b>Cultivo</b>	Sometido a deficiencia nitrogenada
<b>Extracción de lípidos</b>	Saponificación
<b>Sustrato</b>	Ácidos grasos
<b>Catálisis</b>	Enzimática
<b>Temperatura</b>	30-40°C
<b>Donador grupos alquilo</b>	Metanol
<b>Relación molar</b>	3:1 (alcohol:FFAs) 6:1 (alcohol:aceite)
<b>Co-disolvente</b>	<i>t</i> -Butanol
<b>Agitación</b>	Mecánica (orbital), previa dispersión del biocatalizador por ultrasonación durante 1 min
<b>Cantidad de agua</b>	≤0,1% (p/p)
<b>Cantidad de biocatalizador</b>	0,2% (biocatalizador:aceite, p/p)
<b>Conversión en biodiésel</b>	>90%
<b>Tiempo de reacción</b>	72-96 h
<b>Estabilidad</b>	100% tras 50 ciclos catalíticos (1200 h)

# Capítulo VII

## Conclusiones





De los resultados obtenidos en este trabajo se pueden extraer, entre otras, las siguientes conclusiones:

- I. La inmovilización covalente por entrecruzado de agregados de CALB a MNPs permite obtener un biocatalizador magnético, robusto y estable.
  - a. Las mCLEAs son fácilmente recuperables de la mezcla de reacción con ayuda de un imán, y mantienen sus propiedades superparamagnéticas.
- II. Las condiciones de reacción empleadas en este trabajo son mucho más ventajosas económicamente que las de otros trabajos similares. Esto es, menor temperatura, menor relación de alcohol y menor cantidad de enzima.
  - a. La temperatura, agitación y cantidad de biocatalizador empleado son los factores que más influyen en la conversión de biodiésel.

- b. La ultrasonación de las mCLEAs durante 1 min dispersa el biocatalizador en la mezcla de reacción mejorando el rendimiento de conversión.
  - c. El metanol inhibe la actividad de la lipasa, y provoca la agregación de las mCLEAs, disminuyendo su superficie de contacto con el sustrato.
  - d. La adición en la mezcla de reacción de un co-disolvente, como *t*-butanol, permite mayor conversión al evitar la inhibición de la lipasa por el alcohol y aumentar la solubilidad entre los TAGs y el alcohol.
  - e. Una concentración de agua mayor que 0,1% (p/p) en la mezcla de reacción, reduce la velocidad inicial de conversión.
  - f. Un 0,2% (p/p, biocatalizador:aceite) es una relación adecuada para obtener alta conversión en un tiempo aceptable.
- III. Las mCLEAs de CALB catalizan eficazmente la conversión en biodiésel de los lípidos extraídos de la biomasa microalgal. Además:
- a. El biocatalizador puede transesterificar aceites, independientemente de cómo se hayan extraído, de su viscosidad o de la presencia de lípidos insaponificables.
  - b. La reutilización del biocatalizador durante al menos 50 ciclos catalíticos, sin aparente pérdida de actividad y con alta conversión en biodiésel (>90%), confirma la robustez y estabilidad de las mCLEAs de CALB.
  - c. Al cabo de 20 ciclos catalíticos agitados por ultrasonidos se observa menor conversión debido a que se libera lipasa del biocatalizador magnético.

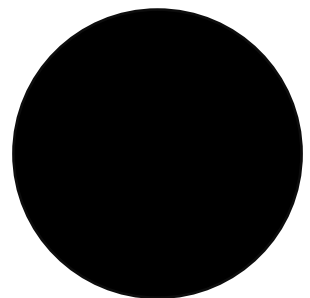


- d. Aunque la catálisis ácida y enzimática proporcionan parecida conversión de biodiésel, si se reutiliza el biocatalizador los costes se reducen en gran medida. Además, la catálisis enzimática permite utilizar disolventes menos agresivos con el medio ambiente, empleando condiciones de reacción más ventajosas económicamente, ya que transcurre a 30°C durante 3 h frente a los 100°C en 1 h necesarios en la catálisis química.



# Capítulo VIII

## Bibliografía





- Ahmad A, Yasin NM, Derek C, Lim J (2011)** Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15: 584-593
- Akoh CC, Chang S, Lee G, Shaw J (2007)** Enzymatic approach to biodiesel production. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 55: 8995-9005
- Al-Zuhair S (2007)** Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 1: 57-66
- Al-Zuhair S, Ling FW, Jun LS (2007)** Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. *Process Biochemistry* 42: 951-960
- Anderson EM, Larsson KM, Kirk O (1998)** One biocatalyst—many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation* 16: 181-204
- Arroyo M, Sinisterra JV (1994)** High enantioselective esterification of 2-arylpropionic acids catalyzed by immobilized lipase from *Candida antarctica*: a mechanistic approach. *Journal of Organic Chemistry* 59: 4410-4417
- Azócar L, Ciudad G, Heipieper HJ, Muñoz R, Navia R (2011)** Lipase-catalyzed process in an anhydrous medium with enzyme reutilization to produce biodiesel with low acid value. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 112: 583-589
- Bajaj A, Lohan P, Jha PN, Mehrotra R (2010)** Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 62: 9-14
- Balat M, Balat H (2010)** Progress in biodiesel processing. *Applied Energy* 87: 1815-1835

- Barbosa O, Torres R, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R (2012)** Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. *Process Biochemistry* 47: 1220-1227
- Barrera C, Herrera AP, Rinaldi C (2009)** Colloidal dispersions of monodisperse magnetite nanoparticles modified with poly (ethylene glycol). *Journal of Colloid and Interface Science* 329: 107-113
- Bayliss OB, Adams C (1979)** The pH dependence of borohydride as an aldehyde reductant. *The Histochemical Journal* 11: 111-116
- Bhari R, Kaur M, Singh RS (2016)** New trends in enzyme immobilization and nanostructured interfaces for biofuel production. *Biofuels* 19: 491-510
- Bhattacharya A, Pletschke BI (2014)** Magnetic cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): a novel concept towards carrier free immobilization of lignocellulolytic enzymes. *Enzyme Microbial Technology* 61: 17-27
- Bonet-Ragel K, Canet A, Benaiges MD, Valero F (2015)** Synthesis of biodiesel from high FFA *alperujo* oil catalysed by immobilised lipase. *Fuel* 161: 12-17.
- Brady D, Jordaan J (2009)** Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters* 31: 1639-1650
- Brennan L, Owende P (2010)** Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 557-577.
- Breuer G, Lamers PP, Martens DE, Draaisma RB, Wijffels RH (2012)** The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology* 124: 217-226
- Buzea C, Pacheco II (2017)** Nanomaterials and their Classification. *EMR/ESR/EPR Spectroscopy for Characterization of Nanomaterials*. Springer, 3-45

- Buzea C, Pacheco II, Robbie K (2007)** Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases 2*: MR17-MR71
- Cabrera L, Gutierrez S, Menendez N, Morales M, Herrasti P (2008)** Magnetite nanoparticles: electrochemical synthesis and characterization. *Electrochimica Acta 53*: 3436-3441
- Canet A, Bonet-Ragel K, Benaiges MD, Valero F (2017)** Biodiesel synthesis in a solvent-free system by recombinant *Rhizopus oryzae*: comparative study between a stirred tank and a packed-bed batch reactor. *Biocatalysis Biotransformation 35*: 1-6
- Cao L, van Langen L, Sheldon RA (2003)** Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Current Opinion in Biotechnology 14*: 387-394
- Cesarini S, Diaz P, Nielsen PM (2013)** Exploring a new, soluble lipase for FAMES production in water-containing systems using crude soybean oil as a feedstock. *Process Biochemistry 48*: 484-487
- Chand P, Chintareddy VR, Verkade JG, Grewell D (2010)** Enhancing biodiesel production from soybean oil using ultrasonics. *Energy Fuels 24*: 2010-2015
- Chang H, Liao H, Lee C, Shieh C (2005)** Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology 80*: 307-312
- Charpe TW, Rathod VK (2011)** Biodiesel production using waste frying oil. *Waste Manage 31*: 85-90
- Chen J, Wu W (2003)** Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. *Journal of Bioscience and Bioengineering 95*: 466-469
- Chen M, Chen X, Liu T, Zhang W (2011a)** Subcritical ethanol extraction of lipid from wet microalgae paste of *Nannochloropsis* sp. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy 5*: 385-389

- Chen HC, Ju HY, Wu TT, Liu YC, Lee CC, Chang C, Chung YL, Shieh CJ (2011b)** Continuous production of lipase-catalyzed biodiesel in a packed-bed reactor: optimization and enzyme reuse study. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011: 1-6
- Cheng H, Wang L (2013)** Lignocelluloses feedstock biorefinery as petrorefinery substitutes. *Biomass Now - Sustainable Growth and Use*. Intech Ltd. Viena (Austria). ISBN 978-953-51-1105-4
- Chisti Y (2007)** Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25: 294-306
- Clogston JD, Patri AK (2011)** Zeta potential measurement. Characterization of nanoparticles intended for drug delivery 697: 63-70
- Cruz-Izquierdo Á, Picó EA, Anton-Helas Z, Boeriu CG, Llama MJ, Serra JL (2012)** Lipase immobilization to magnetic nanoparticles: methods, properties and applications for biobased products. *New Biotechnology* 29: S100-S101
- Cruz-Izquierdo Á (2013)** Production of magnetic biocatalysts by immobilization of lipase to magnetic nanoparticles. Tesis Doctoral, Universidad del País Vasco (UPV/EHU)
- Cruz-Izquierdo Á, Picó EA, López C, Serra JL, Llama MJ (2014)** Magnetic Cross-Linked Enzyme Aggregates (mCLEAs) of *Candida antarctica* lipase: an efficient and stable biocatalyst for biodiesel synthesis. *PLoS One* 9: e115202
- Dalal S, Sharma A, Gupta MN (2007)** A multipurpose immobilized biocatalyst with pectinase, xylanase and cellulase activities. *Chemistry Central Journal* 1: 1-5
- Daroch M, Geng S, Wang G (2013)** Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Applied Energy* 102: 1371-1381



- Dewulf J, Van Langenhove H (2006)** Renewables-based technology: sustainability assessment. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester (Inglaterra). ISBN 978-0-470-02241-2
- Dizge N, Keskinler B (2008)** Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. *Biomass Bioenergy* 32: 1274-1278
- Dizge N, Aydiner C, Imer DY, Bayramoglu M, Tanriseven A, Keskinler B (2009)** Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Bioresource Technology* 100: 1983-1991
- Du W, Liu D, Li L, Dai L (2007)** Mechanism exploration during lipase-mediated methanolysis of renewable oils for biodiesel production in a *tert*-butanol system. *Biotechnology Progress* 23: 1087-1090
- Fang X, Zhan Y, Yang J, Yu D (2014)** A concentration-dependent effect of methanol on *Candida antarctica* lipase B in aqueous phase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 104: 1-7
- Farhang B (2007)** Nanotechnology and lipids. *Lipid Technology* 19: 132-135
- Fjerbaek L, Christensen KV, Norddahl B (2009)** A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and Bioengineering* 102: 1298-1315
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957)** A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509
- Fukuda H, Kondo A, Noda H (2001)** Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92: 405-416
- Gao L, Xu J, Li X, Liu Z (2004)** Optimization of *Serratia marcescens* lipase production for enantioselective hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 31: 525-530

- Ghaly A, Dave D, Brooks M, Budge S (2010)** Production of biodiesel by enzymatic transesterification: review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 6: 54-76
- Gharat N, Rathod VK (2013)** Enzyme catalyzed transesterification of waste cooking oil with dimethyl carbonate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 88: 36-40
- González MI, Medina AR, Grima EM, Giménez AG, Carstens M, Cerdán LE (1998)** Optimization of fatty acid extraction from *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 biomass. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75: 1735-1740
- Goodarzi A, Sahoo Y, Swihart M, Prasad P (2003)** Aqueous ferrofluid of citric acid coated magnetite particles. *MRS Online Proceedings Library Archive* 789
- Griffiths MJ, Harrison ST (2009)** Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology* 21: 493-507
- Grima EM, Medina AR, Giménez AG, Pérez JS, Camacho FG, Sánchez JG (1994)** Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 71: 955-959
- Halim R, Danquah MK, Webley PA (2012)** Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances* 30: 709-732
- Halim SFA, Kamaruddin AH (2008)** Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a *tert*-butanol system. *Process Biochemistry* 43: 1436-1439
- Hanotu J, Bandulasena H, Zimmerman WB (2012)** Microflotation performance for algal separation. *Biotechnology and Bioengineering* 109: 1663-1673
- Harris L, Goff J, Carmichael A, Riffle J, Harburn J, St. Pierre T, Saunders M (2003)** Magnetite nanoparticle dispersions stabilized with triblock copolymers. *Chemistry of Materials* 15: 1367-1377

- Heldt-Hansen HP, Ishii M, Patkar SA, Hansen TT, Eigtved P (1989)** A new immobilized positional nonspecific lipase for fat modification and ester synthesis. *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology* 389: 158-172
- Hermanson GT (2013)** *Bioconjugate Techniques*. Third edition. Elsevier Ltd, Amsterdam (The Netherlands). ISBN: 978-0-12-382239-0
- Hernández-Martín E, Otero C (2008)** Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. *Bioresource Technology* 99: 277-286
- Herrero M, Martín-Álvarez PJ, Senorans FJ, Cifuentes A, Ibáñez E (2005)** Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chemistry* 93: 417-423
- Hita Peña E, Robles Medina A, Jiménez Callejón MJ, Macías Sánchez MD, Esteban Cerdán L, González Moreno PA, Molina Grima E (2015)** Extraction of free fatty acids from wet *Nannochloropsis gaditana* biomass for biodiesel production. *Renew Energy* 75: 366-373
- Hodge HC, Sterner JH (1949)** Tabulation of toxicity classes. *American Industrial Hygiene Association Quarterly* 10: 93-96
- Holčapek M, Jandera P, Fischer J, Prokeš B (1999)** Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. *Journal of Chromatography A* 858: 13-31
- Hong J, Gong P, Xu D, Dong L, Yao S (2007)** Stabilization of  $\alpha$ -chymotrypsin by covalent immobilization on amine-functionalized superparamagnetic nanogel. *Journal of Biotechnology* 128: 597-605
- Ikaran Z, Suárez-Alvarez S, Urreta I, Castañón S (2015)** The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3. *Algal Research* 10: 134-144

- Illman AM, Scragg AH, Shales SW (2000)** Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microbial Technology* 27: 631-635
- Islam MN, Zhang M, Adhikari B (2014)** The inactivation of enzymes by ultrasound-a review of potential mechanisms. *Food Reviews International* 30: 1-21
- Issa B, Obaidat IM, Albiss BA, Haik Y (2013)** Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 21266-21305
- Itabaiana Jr. I, de Mariz e Miranda, Leandro Soter, de Souza, Rodrigo Octavio Mendonça Alves (2013)** Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 85–86: 1-9.
- Jeong G, Park D (2010)** Synthesis of rapeseed biodiesel using short-chained alkyl acetates as acyl acceptor. *Applied Biochemistry Biotechnology* 161: 195-208
- Ji J, Wang J, Li Y, Yu Y, Xu Z (2006)** Preparation of biodiesel with the help of ultrasonic and hydrodynamic cavitation. *Ultrasonics* 44: e411-e414
- Jolivet J, Cassaignon S, Chanéac C, Chiche D, Tronc E (2008)** Design of oxide nanoparticles by aqueous chemistry. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 46: 299-305
- Kawakami K, Oda Y, Takahashi R (2011)** Application of a *Burkholderia cepacia* lipase-immobilized silica monolith to batch and continuous biodiesel production with a stoichiometric mixture of methanol and crude *Jatropha* oil. *Biotechnology for biofuels* 4: 42-53
- Kegl B (2008)** Biodiesel usage at low temperature. *Fuel* 87: 1306-1317

- Kim SH, Kim S, Park S, Kim HK (2013a)** Biodiesel production using cross-linked *Staphylococcus haemolyticus* lipase immobilized on solid polymeric carriers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 85: 10-16
- Kim J, Yoo G, Lee H, Lim J, Kim K, Kim CW, Park MS, Yang J (2013b)** Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 31: 862-876
- Knothe G (2006)** Analyzing biodiesel: standards and other methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83: 823-833
- Kolhatkar AG, Jamison AC, Litvinov D, Willson RC, Lee TR (2013)** Tuning the magnetic properties of nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 15977-16009
- Korman TP, Sahachartsiri B, Charbonneau DM, Huang GL, Beauregard M, Bowie JU (2013)** Dieselzymes: development of a stable and methanol tolerant lipase for biodiesel production by directed evolution. *Biotechnology for biofuels* 6: 70-83
- Kralj S, Makovec D, Čampelj S, Drofenik M (2010)** Producing ultra-thin silica coatings on iron-oxide nanoparticles to improve their surface reactivity. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 322: 1847-1853
- Kulschewski T, Sasso F, Secundo F, Lotti M, Pleiss J (2013)** Molecular mechanism of deactivation of *C. antarctica* lipase B by methanol. *Journal of Biotechnology* 168: 462-469
- Kumar MR, Bakowsky U, Lehr C (2004)** Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials* 25: 1771-1777
- Kumar VV, Sivanesan S, Cabana H (2014)** Magnetic cross-linked laccase aggregates—Bioremediation tool for decolorization of distinct classes of recalcitrant dyes. *Science of the Total Environment* 487: 830-839
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

- Lai J, Hu Z, Wang P, Yang Z (2012)** Enzymatic production of microalgal biodiesel in ionic liquid [BMIm][PF<sub>6</sub>]. *Fuel* 95: 329-333
- Lam MK, Lee KT, Mohamed AR (2010)** Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: a review. *Biotechnology Advances* 28: 500-518
- Lam MK, Lee KT (2012)** Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances* 30: 673-690
- Lardon L, Hélias A, Sialve B, Steyer J-, Bernard O (2009)** Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environmental Science & Technology* 43: 6475-6481
- Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, Muller RN (2008)** Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical Reviews* 108: 2064-2110
- Lee KW, Min K, Park K, Yoo YJ (2010)** Development of an amphiphilic matrix for immobilization of *Candida antarctica* lipase B for biodiesel production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 15: 603-607
- Lemões JS, Alves Sobrinho RCM, Farias SP, De Moura RR, Primel EG, Abreu PC, Martins AF, Montes D'Oca MG (2016)** Sustainable production of biodiesel from microalgae by direct transesterification. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 3: 33-38
- Lepage G, Roy CC (1984)** Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *The Journal of Lipid Research* 25: 1391-1396
- Leung DY, Wu X, Leung M (2010)** A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy* 87: 1083-1095

- Li L, Du W, Liu D, Wang L, Li Z (2006)** Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 43: 58-62
- Li D, Teoh WY, Gooding JJ, Selomulya C, Amal R (2010)** Functionalization strategies for protease immobilization on magnetic nanoparticles. *Advanced Functional Materials* 20: 1767-1777
- Li X, Xu H, Wu Q (2007)** Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 98: 764-771
- Liu Z, Liu Y, Yao K, Ding Z, Tao J, Wang X (2002)** Synthesis and magnetic properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Journal of Materials Synthesis and Processing* 10: 83-87
- López BC, Cerdán LE, Medina AR, López EN, Valverde LM, Peña EH, Moreno PAG, Grima EM (2015)** Production of biodiesel from vegetable oil and microalgae by fatty acid extraction and enzymatic esterification. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 119: 706-711
- López C, Cruz-Izquierdo Á, Picó EA, García-Bárcena T, Villarroya N, Llama MJ, Serra JL (2014)** Magnetic biocatalysts and their uses to obtain biodiesel and biosurfactants. *Frontiers in Chemistry* 2: 72
- Lotti M, Pleiss J, Valero F, Ferrer P (2015)** Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel. *Biotechnology Journal* 10: 22-30
- Maity D, Agrawal DC (2007)** Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 308: 46-55
- Malcata FX, Reyes HR, Garcia HS, Hill CG, Amundson CH (1992)** Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme Microbial Technology* 14: 426-446

- Mallick N (2002)** Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *Biometals* 15: 377-390
- Martinelle M, Holmquist M, Hult K (1995)** On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 1258: 272-276
- Massart R (1981)** Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions on Magnetics* 17: 1247-1248
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010)** Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 217-232
- Mateo C, Fernández-Lorente G, Abian O, Fernández-Lafuente R, Guisán JM (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
- Matijošytė I, Arends IW, de Vries S, Sheldon RA (2010)** Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 62: 142-148
- Medina AR, Giménez AG, Camacho FG, Pérez JS, Grima EM, Gómez AC (1995)** Concentration and purification of stearidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids from cod liver oil and the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72: 575-583
- Mehrasbi MR, Mohammadi J, Peyda M, Mohammadi M (2017)** Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil. *Renewable Energy* 101: 593-602



- Mendes AA, Giordano RC, de LC Giordano R, de Castro HF (2011)** Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 68: 109-115
- Metting B, Pyne JW (1986)** Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme Microbial Technology* 8: 386-394
- Miao X, Wu Q (2006)** Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology* 97: 841-846.
- Michelin S, Penha FM, Sychoski MM, Scherer RP, Treichel H, Valério A, Di Luccio M, de Oliveira D, Oliveira JV (2015)** Kinetics of ultrasound-assisted enzymatic biodiesel production from *Macauba* coconut oil. *Renewable Energy* 76: 388-393
- Modi MK, Reddy J, Rao B, Prasad R (2007)** Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. *Bioresource Technology* 98: 1260-1264
- Morales MdP, Veintemillas-Verdaguer S, Montero M, Serna C, Roig A, Casas L, Martínez B, Sandiumenge F (1999)** Surface and internal spin canting in  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. *Chemistry of Materials* 11: 3058-3064
- Mubarak M, Shaija A, Suchithra T (2015)** A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Research* 7: 117-123
- Muela A, Muñoz D, Martín-Rodríguez R, Orue I, Garaio E, Abad Díaz de Cerio, Ana, Alonso J, García JÁ, Fdez-Gubieda ML (2016)** Optimal parameters for hyperthermia treatment using biomineralized magnetite nanoparticles: theoretical and experimental approach. *The Journal of Physical Chemistry C* 120: 24437-24448
- Mukherjee J, Gupta MN (2016)** Lipase coated clusters of iron oxide nanoparticles for biodiesel synthesis in a solvent free medium. *Bioresource Technology* 209: 166-171

- Muñoz R, Guieysse B (2006)** Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Research* 40: 2799-2815
- Naranjo JC, Córdoba A, Giraldo L, García VS, Moreno-Piraján JC (2010)** Lipase supported on granular activated carbon and activated carbon cloth as a catalyst in the synthesis of biodiesel fuel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 66: 166-171
- Ngo TPN, Li A, Tiew KW, Li Z (2013)** Efficient transformation of grease to biodiesel using highly active and easily recyclable magnetic nanobiocatalyst aggregates. *Bioresource Technology* 145: 233-239
- Nguyen LT, Seow N, Yang K (2017)** Hollow cross-linked enzyme aggregates (h-CLEA) of laccase with high uniformity and activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 151: 88-94
- Nigam S, Barick KC, Bahadur D (2011)** Development of citrate-stabilized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 323: 237-243
- Nikje MMA, Moghaddam ST, Noruzian M, Nejad MAF, Shabani K, Haghshenas M, Shakhesi S (2014)** Preparation and characterization of flexible polyurethane foam nanocomposites reinforced by magnetic core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ APTS nanoparticles. *Colloid and Polymer Science* 292: 627-633
- Nikpour M, Pazouki M (2016)** Lipase immobilized into novel GPTMS: TMOS derived sol-gels and its application for biodiesel production from waste oil. *Iranian Journal of Chemical Engineering* 13: 33
- Nogi K, Naito M, Yokoyama T (2012)** *Nanoparticle Technology Handbook*. Second edition. Elsevier Ltd, Amsterdam (The Netherlands). ISBN: 978-0-44-460228-2
- Ognjanovic N, Bezbradica D, Knezevic-Jugovic Z (2009)** Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: process optimization and the immobilized system stability. *Bioresource Technology* 100: 5146-5154

- Oliveira L, Da Silva M (2013)** Comparative study of calorific value of rapeseed, soybean, *Jatropha curcas* and crambe biodiesel. International Conference on Renewable Energies and Power Quality (ICREPQ'13) Bilbao (Spain). 20-22
- Orchard B, Denis J, Cousins J (2007)** Developments in biofuel processing technologies. *World Pumps* 2007: 24-28
- Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT (1999)** The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology Applied Biochemistry* 29: 119-131
- Park HJ, Joo JC, Park K, Yoo YJ (2012)** Stabilization of *Candida antarctica* lipase B in hydrophilic organic solvent by rational design of hydrogen bond. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 17: 722-728
- Picó EA, López C, Cruz-Izquierdo Á, Munarriz M, Iruretagoyena FJ, Serra JL, Llama MJ (2017)** Biodiesel production from *Chlorella vulgaris* lipids catalyzed by magnetic CLEAs of CALB. (Enviado a publicar)
- Pieber S, Schober S, Mittelbach M (2012)** Pressurized fluid extraction of polyunsaturated fatty acids from the microalga *Nannochloropsis oculata*. *Biomass Bioenergy* 47: 474-482
- Poppe JK, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, Ayub MAZ (2015)** Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: present status and future prospects. *Biotechnology Advances* 33: 511-525
- Praveenkumar R, Kim B, Choi E (2014)** Mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella* sp. KR-1 mediated by actual coal-fired flue gas for biodiesel production. *Bioprocess Biosystems Engineering* 37: 2083
- Răcuciu M (2009)** Synthesis protocol influence on aqueous magnetic fluid properties. *Current Applied Physics* 9: 1062-1066

- Rastian Z, Khodadadi AA, Guo Z, Vahabzadeh F, Mortazavi Y (2016)** Plasma functionalized multiwalled carbon nanotubes for immobilization of *Candida antarctica* lipase B: Production of biodiesel from methanolysis of rapeseed oil. *Applied Biochemistry Biotechnology* 178: 974-989
- Rawat I, Kumar RR, Mutanda T, Bux F (2013)** Biodiesel from microalgae: a critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy* 103: 444-467
- Razmi H, Mohammad-Rezaei R (2013)** Graphene quantum dots as a new substrate for immobilization and direct electrochemistry of glucose oxidase: Application to sensitive glucose determination. *Biosensors and Bioelectronics* 41: 498-504
- Robles-Medina A, González-Moreno P, Esteban-Cerdán L, Molina-Grima E (2009)** Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances* 27: 398-408
- Rodrigues J, Canet A, Rivera I, Osório NM, Sandoval G, Valero F, Ferreira-Dias S (2016)** Biodiesel production from crude *Jatropha* oil catalyzed by non-commercial immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* and *Carica papaya* lipases. *Bioresource Technology* 213: 88-95
- Rodrigues RC, Pessela BCC, Volpato G, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM, Ayub MAZ (2010)** Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochemistry* 45: 1268-1273
- Rosset IG, Cavalheiro MCHT, Assaf EM, Porto ALM (2013)** Enzymatic esterification of oleic acid with aliphatic alcohols for the biodiesel production by *Candida antarctica* lipase. *Catalysis Letters* 143: 863-872
- Royon D, Daz M, Ellenrieder G, Locatelli S (2007)** Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresource Technology* 98: 648-653

- Saini R, Saini S, Sharma S (2010)** Nanotechnology: the future medicine. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* 3: 32-33
- Samukawa T, Kaieda M, Matsumoto T, Ban K, Kondo A, Shimada Y, Noda H, Fukuda H (2000)** Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90: 180-183
- Sanchez F, Vasudevan PT (2006)** Enzyme catalyzed production of biodiesel from olive oil. *Applied Biochemistry Biotechnology* 135: 1-14
- Sangeetha K, Abraham TE (2008)** Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of subtilisin for controlled release applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 43: 314-319
- Sankaran R, Show PL, Chang J (2016)** Biodiesel production using immobilized lipase: feasibility and challenges. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 10: 896-916
- Santin CM, Michelin S, Scherer RP, Valério A, di Luccio M, Oliveira D, Oliveira JV (2017)** Comparison of macauba and soybean oils as substrates for the enzymatic biodiesel production in ultrasound-assisted system. *Ultrasonics Sonochemistry* 35: 525-528
- Sathish A, Sims RC (2012)** Biodiesel from mixed culture algae via a wet lipid extraction procedure. *Bioresource Technology* 118: 643-647
- Schmid G (2011)** *Nanoparticles: from theory to application*. Second edition. John Wiley & Sons Ltd, Essen (Germany). ISBN: 978-3-527-32589-4
- Scott SA, Davey MP, Dennis JS, Horst I, Howe CJ, Lea-Smith DJ, Smith AG (2010)** Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology* 21: 277-286
- Shah S, Sharma S, Gupta M (2004)** Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil. *Energy Fuels* 18: 154-159

- Shah S, Gupta MN (2008)** The effect of ultrasonic pre-treatment on the catalytic activity of lipases in aqueous and non-aqueous media. *Chemistry Central Journal* 2: 1
- Shahid EM, Jamal Y (2011)** Production of biodiesel: a technical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15: 4732-4745
- Shaw S, Chen Y, Ou J, Ho L (2006)** Preparation and characterization of *Pseudomonas putida* esterase immobilized on magnetic nanoparticles. *Enzyme Microbial Technology* 39: 1089-1095
- Sheldon RA (2007)** Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts. *Biochemical Society Transactions* 35: 1583-1587
- Shen X, Fang X, Zhou Y, Liang H (2004)** Synthesis and characterization of 3-aminopropyltriethoxysilane-modified superparamagnetic magnetite nanoparticles. *Chemistry Letters* 33: 1468-1469
- Shimada Y, Watanabe Y, Samukawa T, Sugihara A, Noda H, Fukuda H, Tominaga Y (1999)** Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76: 789-793
- Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, Tominaga Y (2002)** Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 17: 133-142
- Shimizu Y (1993)** Microalgal metabolites. *Chemical Reviews* 93: 1685-1698
- Singh P, Shrivastava R, Tiwari A (2013)** Effect of different amount of enzyme and acyl acceptor on lipase-catalyzed transesterification reaction for high yield of biodiesel from microalgal oil. *International Journal of ChemTech Research* 5: 780-788
- Singh S, Singh D (2010)** Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 200-216

- Soler L, Illanes A, Wilson L (2016)** Immobilization of *Alcaligenes* sp. lipase as catalyst for the transesterification of vegetable oils to produce biodiesel. *Catalysis Today* 259: 177-182
- Song D, Fu J, Shi D (2008)** Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel. *Chinese Journal Biotechnology* 24: 341-348
- Song JY, Kim BS (2009)** Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32: 79-84
- Stavarache C, Vinatoru M, Nishimura R, Maeda Y (2005)** Fatty acids methyl esters from vegetable oil by means of ultrasonic energy. *Ultrasonics Sonochemistry* 12: 367-372
- Suali E, Sarbatly R (2012)** Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16: 4316-4342
- Subhedar PB, Gogate PR (2016)** Ultrasound assisted intensification of biodiesel production using enzymatic interesterification. *Ultrasonics Sonochemistry* 29: 67-75
- Šulek F, Drofenik M, Habulin M, Knez Ž (2010)** Surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles for covalent attachment of cholesterol oxidase. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 322: 179-185
- Talebian-Kiakalaieh A, Amin NAS, Mazaheri H (2013)** A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. *Applied Energy* 104: 683-710
- Tavares GR, Gonçalves JE, dos Santos WD, da Silva C (2017)** Enzymatic interesterification of crambe oil assisted by ultrasound. *Industrial Crops and Products* 97: 218-223
- Taylor R, Coulombe S, Otanicar T, Phelan P, Gunawan A, Lv W, Rosengarten G, Prasher R, Tyagi H (2013)** Small particles, big impacts: a review of the diverse applications of nanofluids. *Journal of Applied Physics* 113: 011301

- Teo CL, Jamaluddin H, Zain NAM, Idris A (2014)** Biodiesel production via lipase catalysed transesterification of microalgae lipids from *Tetraselmis* sp. *Renewable Energy* 68: 1-5
- Toh PY, Yeap SP, Kong LP, Ng BW, Chan DJC, Ahmad AL, Lim JK (2012)** Magnetophoretic removal of microalgae from fishpond water: feasibility of high gradient and low gradient magnetic separation. *Chemical Engineering Journal* 211: 22-30
- Tongboriboon K, Cheirsilp B, Aran H (2010)** Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 67: 52-59
- Tran D, Yeh K, Chen C, Chang J (2012)** Enzymatic transesterification of microalgal oil from *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized *Burkholderia* lipase. *Bioresource Technology* 108: 119-127
- Tredici MR (2010)** Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution. *Biofuels* 1: 143-162
- Tudorache M, Nae A, Coman S, Parvulescu VI (2013)** Strategy of cross-linked enzyme aggregates onto magnetic particles adapted to the green design of biocatalytic synthesis of glycerol carbonate. *RSC Advances* 3: 4052-4058
- Türkan A, Kalay Ş (2006)** Monitoring lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: elucidation of the mechanisms of lipases. *Journal of Chromatography A* 1127: 34-44
- Türkan A, Kalay Ş (2008)** Study of the mechanism of lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil in *tert*-butanol and heptane. *Turkish Journal of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi* 33: 45-49



- UNE (2010) (Norma)** UNE EN ISO 659, Edición: 2010-02. Oilseeds - Determination of oil content (Reference method). (ISO 659:2009); Spanish version EN ISO 659:2010. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR)
- Unión Europea (2009)** Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de abril de 2009, relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables (2009/28/CE). Diario Oficial de la Unión Europea 5 de junio de 2009, L 140: 16e62.
- Unión Europea (2011)** Recomendación de la Comisión del 18 de octubre del 2011 sobre la definición de nanomaterial (2011/696/EU). The Official Journal of the European Communities. 275: 38-40
- Uppenberg J, Oehrner N, Norin M, Hult K, Kleywegt GJ, Patkar S, Waagen V, Anthonsen T, Jones TA (1995)** Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry* 34: 16838-16851
- Urreta I, Ikarán Z, Janices I, Ibañez E, Castro-Puyana M, Castañón S, Suárez-Alvarez S (2014)** Revalorization of *Neochloris oleoabundans* biomass as source of biodiesel by concurrent production of lipids and carotenoids. *Algal Research* 5: 16-22
- Vaishampayan A, Sinha R, Hader D, Dey T, Gupta A, Bhan U, Rao A (2001)** Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. *The Botanical Review* 67: 453-516
- Vayssieres L, Chanéac C, Tronc E, Jolivet JP (1998)** Size tailoring of magnetite particles formed by aqueous precipitation: An example of thermodynamic stability of nanometric oxide particles. *Journal of Colloid and Interface Science* 205: 205-212
- Veillette M, Giroir-Fendler A, Faucheux N, Heitz M (2015)** High-purity biodiesel production from microalgae and added-value lipid extraction: a new process. *Applied Microbiology Biotechnology* 99: 109-119

- Veljković VB, Avramović JM, Stamenković OS (2012)** Biodiesel production by ultrasound-assisted transesterification: State of the art and the perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16: 1193-1209.
- Vyas AP, Verma JL, Subrahmanyam N (2010)** A review on FAME production processes. *Fuel* 89: 1-9
- Waghmare GV, Vetal MD, Rathod VK (2015)** Ultrasound assisted enzyme catalyzed synthesis of glycerol carbonate from glycerol and dimethyl carbonate. *Ultrasonics Sonochemistry* 22: 311-316
- Wang L, Zhao W, Tan W (2008)** Bioconjugated silica nanoparticles: development and applications. *Nano Research* 1: 99-115
- Wang X, Dou P, Zhao P, Zhao C, Ding Y, Xu P (2009)** Immobilization of lipases onto magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for application in biodiesel production. *ChemSusChem* 2: 947-950
- Watanabe Y, Shimada Y, Sugihara A, Tominaga Y (2002)** Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 17: 151-155
- Widjaja A, Chien C, Ju Y (2009)** Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40: 13-20
- Wijffels RH, Barbosa MJ, Eppink MHM (2010)** Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 4: 287-295
- Woo M, Lim M, Chang H, Choi S (2016)** Paper-based colorimetric sensor utilizing peroxidase-mimicking magnetic nanoparticles conjugated with aptamers. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering* 10: 1270-1274

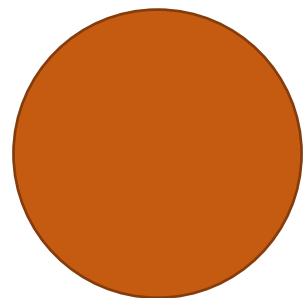
- Xie W, Ma N (2009)** Immobilized lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production. *Energy Fuels* 23: 1347-1353
- Xie W, Ma N (2010)** Enzymatic transesterification of soybean oil by using immobilized lipase on magnetic nano-particles. *Biomass Bioenergy* 34: 890-896
- Yoo G, Park W, Kim CW, Choi Y, Yang J (2012)** Direct lipid extraction from wet *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using osmotic shock. *Bioresource Technology* 123: 717-722
- Yu D, Tian L, Wu H, Wang S, Wang Y, Ma D, Fang X (2010)** Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435. *Process Biochemistry* 45: 519-525
- Zhang JC, Zhang C, Zhao L, Wang CT (2014)** Lipase-catalyzed synthesis of sucrose fatty acid ester and the mechanism of ultrasonic promoting esterification reaction in non-aqueous media. *Advanced Materials Research Journal* 881: 35-41
- Zhang W, Yang X, Jia J, Wang N, Hu C, Yu X (2015)** Surfactant-activated magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of *Thermomyces lanuginosus* lipase for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 115: 83-89
- Zhang Y, Yang M, Portney NG, Cui D, Budak G, Ozbay E, Ozkan M, Ozkan CS (2008)** Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. *Biomedical Microdevices* 10: 321-328
- Zhao X, Qi F, Yuan C, Du W, Liu D (2015)** Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 44: 182-197

**Zheng Y, Cheng Y, Bao F, Wang Y (2006)** Synthesis and magnetic properties of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles. *Materials Research Bulletin* 41: 525-529

**Zheng Y, Quan J, Ning X, Zhu L, Jiang B, He Z (2009)** Lipase-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production in *tert*-amyl alcohol. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 41

# Capítulo IX

## Anexo 1: Publicaciones







## Magnetic biocatalysts and their uses to obtain biodiesel and biosurfactants

Carmen López<sup>1,2</sup>, Álvaro Cruz-Izquierdo<sup>1</sup>, Enrique A. Picó<sup>1</sup>, Teresa García-Bárcena<sup>1</sup>, Noelia Villarroel<sup>1</sup>, María J. Llama<sup>1</sup> and Juan L. Serra<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Enzyme and Cell Technology Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Science and Technology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Bilbao, Spain

<sup>2</sup> IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain

### Edited by:

Carissa M. Soto, Naval Research Laboratory, USA

### Reviewed by:

Jin Montclare, New York University Polytechnic School of Engineering, USA

Terence Schull, Naval Surface Warfare Center IHEDDT, USA

### \*Correspondence:

Juan L. Serra, Enzyme and Cell Technology Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Science and Technology, University of the Basque Country (UPV/EHU), PO Box 644, 48080 Bilbao, Spain  
e-mail: juan.serra@ehu.es

Nanobiocatalysis, as the synergistic combination of nanotechnology and biocatalysis, is rapidly emerging as a new frontier of biotechnology. The use of immobilized enzymes in industrial applications often presents advantages over their soluble counterparts, mainly in view of stability, reusability and simpler operational processing. Because of their singular properties, such as biocompatibility, large and modifiable surface and easy recovery, iron oxide magnetic nanoparticles (MNPs) are attractive super-paramagnetic materials that serve as a support for enzyme immobilization and facilitate separations by applying an external magnetic field. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) have several benefits in the context of industrial applications since they can be cheaply and easily prepared from unpurified enzyme extracts and show improved storage and operational stability against denaturation by heat and organic solvents. In this work, by using the aforementioned advantages of MNPs of magnetite and CLEAs, we prepared two robust magnetically-separable types of nanobiocatalysts by binding either soluble enzyme onto the surface of MNPs functionalized with amino groups or by cross-linking aggregates of enzyme among them and to MNPs to obtain magnetic CLEAs. For this purpose the lipase B of *Candida antarctica* (CALB) was used. The hydrolytic and biosynthetic activities of the resulting magnetic nanobiocatalysts were assessed in aqueous and organic media. Thus, the hydrolysis of triglycerides and the transesterification reactions to synthesize biodiesel and biosurfactants were studied using magnetic CLEAs of CALB. The efficiency and easy performance of this magnetic biocatalysis validates this proof of concept and sets the basis for the application of magnetic CLEAs at industrial scale.

**Keywords:** magnetic nanoparticles (MNPs), magnetic cross-linked enzyme aggregates (mCLEAs), biodiesel, biosurfactants, sucrose monopalmitate

### INTRODUCTION

The use of nanobiocatalysts, with the combination of nanotechnology and biocatalysis, is considered as an exciting and rapidly emerging area. Thus, nanobiocatalysis, as a new frontier of biotechnology, is a new innovative sub-field of biocatalysis which explores more advanced materials as enzyme carriers as well as provides robust nanostructured materials with properties tailored to their applications as enzyme scaffolds (Xin et al., 2010).

One of the great challenges that the industries face nowadays is the transition to greener and more sustainable manufacturing processes that minimize, or preferably avoid, the generation of waste and the use of toxic and/or hazardous materials. Biocatalysis has many benefits to offer in this respect, since enzymatic processes generate less waste than conventional synthetic routes, are more energy efficient, and provide products in higher purity (Sheldon, 2011).

Enzymes are versatile nanoscale biocatalysts which can be used in many areas of application, including industrial biocatalysis and bioremediation. However, the use of enzymes in soluble form is often hampered by their price, instability and the difficulty in

its recovery and reutilization. These drawbacks can generally be overcome by immobilizing the enzyme to solid supports, since the immobilized biocatalyst shows improved storage and operational stability (e.g., toward denaturation by heat or organic solvents or by autolysis) and it can be easily separated from the products in the reaction mixture and reused. Moreover, reutilization of enzyme in consecutive catalytic cycles significantly decreases the costs of the biocatalyst which otherwise would not have been economically viable using the free enzyme (Sheldon, 2011; Sheldon and van Pelt, 2013).

Recent advances in nanotechnology provide a range of more diverse nanomaterials and the approach to immobilize enzymes on these nanosupports has grown in popularity in recent years. At the present time, the use of iron oxide magnetic nanoparticles (MNPs) as enzyme immobilization carriers, has drawn great attention because of their unique properties, such as controllable particle size, large surface area, modifiable surface, and easy recovery by applying a magnetic field which allows its reuse for successive catalytic cycles (Johnson et al., 2011; Liese and Hilterhaus, 2013; Verma et al., 2013; Kopp et al., 2014).

Enzyme immobilization on magnetic supports was first reported by Matsunaga and Kamiya (1987) who used magnetic particles isolated from magnetotactic bacteria. Later Dyal et al. (2003) reported magnetic (maghemite) nanoparticles for the immobilization of *Candida rugosa* lipase. Further progress in the use of magnetic materials for enzyme immobilization has been dependent on developments in MNP synthesis/handling and control over magnetic properties (Yiu and Keane, 2012).

Magnetic nanomaterials greatly facilitate separation, allowing the use of a magnet to quickly and efficiently remove the immobilized enzyme from the product (Safarik and Safarikova, 2009; Ren et al., 2011). This allows greater reusability and preservation of stability of the attached enzyme as compared to conventional matrices, where centrifugation/filtration is the only option to separate the enzyme from the product. Such operations might lead to enzyme leaching/instability due to mechanical shear while mixing the pellet with the appropriate buffer to begin a new reaction (Yiu and Keane, 2012). The low process costs of magnetic nanocarriers have therefore shown them to be an interesting and economic option (Verma et al., 2013).

In the past couple of decades, cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) have emerged as a novel and versatile carrier-free immobilization technique (Cao et al., 2000; Sheldon, 2011). Moreover, the use of CLEAs presents several advantages compared to the free enzyme, since they are more stable with temperature and show good reusability, retaining a high percentage of their initial activity after several cycles. The preparation of CLEAs involves the precipitation of the enzyme (that does not need to be pure) and subsequent chemical cross-linking of the resulting protein aggregates with glutaraldehyde. This bi-functional reagent is generally the cross-linker of choice as it is inexpensive and readily available in commercial quantities (Sheldon and van Pelt, 2013).

Despite the advantages of CLEAs, the number of enzymes immobilized by this technology is limited, mainly due to the low Lys residue contents in the external surface of some enzymes (Sheldon, 2007), and the increased size (clumping) of CLEAs clusters due to separation of CLEAs from reaction mixture by centrifugation or filtration (Montoro-García et al., 2010; Wang et al., 2011). The latter limitation can be overcome if the CLEAs are magnetically-separable and their recovery can be easily achieved using a magnet instead of using centrifugation or filtration methods which inevitably lead to clumping of CLEAs. mCLEAs of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. (Talekar et al., 2012) and lipase from *Aspergillus niger* (Tudorache et al., 2013) were successfully prepared and used to hydrolyze starch and to obtain glycerol carbonate, respectively.

Biodiesel is as a mixture of fatty acid alkyl esters (FAEs) which can be produced by transesterification of oils or by esterification of free fatty acids (FFAs) catalyzed either chemically or enzymatically using a lipase. Chemically-catalyzed production of biodiesel is industrially acceptable for its high conversion and reaction rates. However, downstream processing costs, environmental issues associated with biodiesel production and byproducts recovery have led to the search for alternative more eco-friendly production methods (Bisen et al., 2010). Thus, lipase-mediated biodiesel production presents more advantages

over the chemical method since it is eco-friendly, chemically selective and requires lower temperatures (Verma et al., 2013).

Sugar fatty acid esters (SFAEs), synthesized from renewable resources, have broad applications in detergent, food and cosmetic industries (van Kempen et al., 2013). Moreover, these biodegradable biosurfactants present antitumor, antimicrobial and insecticidal properties. SFAEs can be synthesized by chemical methods, although these reactions must be performed at high temperature and pressure in alkaline media and result in poor selectivity and colored side-products (Huang et al., 2010; Gumel et al., 2011; van den Broeck and Boeriu, 2013). SFAEs were also enzymatically synthesized using immobilized lipase and obtaining high production yields (Ferrer et al., 2002), with recovery of the granulated enzyme by decantation.

In this work, by using the aforementioned advantages of MNPs of magnetite and those of CLEAs, we prepared two robust magnetically-separable types of nanobiocatalysts by binding either the soluble lipase B of *Candida antarctica* (CALB) onto the surface of MNPs functionalized with  $-NH_2$  groups (MNP-CALB) or by cross-linking with glutaraldehyde aggregates of enzymes among themselves and to MNPs to obtain magnetic CLEAs (mCLEA-CALB). Both biocatalysts were used to obtain: (i) fatty acid ethyl and propyl esters (biodiesel) by esterification of FFAs and transesterification of non-edible vegetable oils; (ii) sucrose monopalmitate (biosurfactant) from sucrose and vinyl, ethyl and methyl palmitate. The rapid magnetic recovery of the biocatalysts, their stability and the simple reaction media are exploited to establish an enzymatic process which could be easily transferable to industrial scale.

## MATERIALS AND METHODS

### MATERIALS

3-Aminopropyltriethoxysilane (APTS),  $NaBH_4$ ,  $FeCl_2$ ,  $FeCl_3$ , dimethylsulfoxide (DMSO), 2-methyl-2-propanol (2M2P), *p*-nitrophenyl acetate (*p*NPA), 4 Å molecular sieves and Triton X-100 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA). Coomassie Blue (PhastGel<sup>TM</sup> Blue R) was obtained from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Vinyl, methyl and ethyl palmitate and FFAs were purchased from TCI Chemicals (Portland, OR, USA). Non-edible vegetable oils (unrefined soybean, jatropha and cameline) were obtained from Bunge Ibérica, S.A. (Zierbena, Spain), Jatropha Hispania, S.L. (Toledo, Spain), and Camelina Company (Madrid, Spain), respectively. Olive oil used as a control was purchased from Carbonell (Madrid, Spain). All other chemicals were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

### ENZYME

Lipozyme<sup>®</sup> CALB L, lipase B of *C. antarctica* (CALB, EC 3.1.1.3, 19.1 U/mg protein; 7.50 mg protein/ml) was kindly provided by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark).

### SYNTHESIS AND FUNCTIONALIZATION OF MAGNETIC NANOPARTICLES (MNPs)

MNPs of magnetite ( $Fe_3O_4$ ) were synthesized by coprecipitation of iron salts in alkaline medium following the method described by Cruz-Izquierdo et al. (2012). Briefly, an aqueous solution



containing 0.36 M FeCl<sub>2</sub> and 0.72 M FeCl<sub>3</sub> was pumped to 1 M NH<sub>4</sub>OH solution under continuous mechanic stirring at room temperature. The obtained black precipitate was separated from the liquid phase using a magnetic field, and then magnetically washed with water and PBS buffer (100 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4). In order to functionalize the resulting MNPs with -NH<sub>2</sub> groups, MNPs were incubated with APTS, washed with PBS and maintained at 4°C until use.

#### PREPARATION OF IMMOBILIZED ENZYMES ON MNPs

MNP-NH<sub>2</sub> (20 mg dry weight) was functionalized with aldehyde groups by incubation with 250 mM glutaraldehyde for 4 h in a final volume of 10 ml (phosphate buffer solution 100 mM, pH 7.4). The protein (50 µg/mg MNPs) was added to the mixture, which was maintained overnight at 4°C. After the immobilization, the MNP-enzyme was washed with 2 M NaCl and 1% Triton X-100 (v/v) in order to remove ionic and hydrophobic interactions, respectively. Finally, the enzyme was washed with buffer and maintained at 4°C.

#### PREPARATION OF MAGNETIC CLEAs

mCLEAs of CALB (mCLEA-CALB) were prepared following the methodology proposed by Cruz-Izquierdo et al. (2012). MNP-NH<sub>2</sub> was incubated with the corresponding enzyme to obtain 25–100 µg CALB/mg MNP-NH<sub>2</sub> in the presence of 100 mmol ammonium sulfate/mg protein. After 10 min, a solution of glutaraldehyde was added to reach a final concentration of 12.5 mM and the suspension was maintained for 5 h in agitation. mCLEAs were then washed with 2 M NaCl, 1% (v/v) Triton X-100 and 200 mM bicarbonate buffer, pH 9.0.

#### CHARACTERIZATION OF MNPs AND IMMOBILIZED ENZYMES

Elemental analysis was performed using a Euro EA Elemental Analyzer CHNS (EuroVector, Milan, Italy) with quantification limit of 0.1%. The particle size and morphology of MNPs was determined by transmission electron microscopy (TEM, JEOL 1010, Peabody, MA, USA). The magnetic characteristics were measured using different devices: for the calculation of magnetic saturation ( $M_s$ ) 2 K hysteresis loops were performed using a vibrating sample magnetometer (VSM) in a superconducting magnet (14 T) cooled by a closed circuit of He (CFMS, Cryogenic Ltd., London, UK). To calculate coercivity ( $H_c$ ) and remanence ( $M_r$ ) an electromagnet was used at room temperature and moderate fields (0.9 T). The size distribution of magnetic particles was calculated from the magnetization data according to Langevin's equations adjusted for non-interacting superparamagnetic model. MNPs dry weight and concentration were analyzed using a vacuum concentrator (Savant SpeedVac concentrator, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

#### ENZYMATIC ACTIVITY MEASUREMENTS

##### Esterase activity of CALB

The activity of soluble and immobilized CALB was assayed with pNPA as substrate according to Gao et al. (2004) with minor modifications. Specifically, soluble or immobilized lipase (1–2 µg protein) was added to a reaction mixture which contained 10 µl of pNPA (100 mM in DMSO) in 980 µl of PBS. The reaction mixture was maintained for 15 min at room temperature with rotational

mixing at 30 rpm (Intelli-Mixer RM-2, Elmi Ltd., Riga, Latvia). Samples were withdrawn every 5 min (in the case of immobilized lipase the magnetic biocatalysts were separated from the liquid phase using a magnet) and the appearance of p-nitrophenol (pNP) was measured spectrophotometrically (Beckman Coulter DU 800, Brea, CA, USA) at 405 nm ( $\epsilon_{pNP} = 9.43 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). One unit (U) of esterase activity was defined as the amount of enzyme that catalyzes the appearance of 1 µmol pNP per min under the assay conditions.

##### Hydrolytic activity of CALB

The hydrolytic activity of CALB was analyzed by the hydrolysis of tributyrin, and the release of butyric acid was volumetrically measured using a pH-stat (Metrohm 842 pH-Stat Autotitrator, Herisau, Switzerland) with 10 mM NaOH as alkaline solution. CALB (0.01 mg of free enzyme, 1 mg of MNP-CALB or 0.25 mg of mCLEA-CALB) was incubated in 9 ml of 5 mM phosphate buffer, pH 7.3, at 30°C. Tributyrin was then added (0.5 ml) and the increase of pH was registered. One unit (U) of activity was defined as the amount of enzyme that catalyzes the release of 1 µmol butyric acid per min under the assay conditions.

##### Transesterification activity of CALB

Olive oil (0.2 g) and 2-propanol (1:6 molar ratio oil:alcohol) were incubated with 1% (w/w of oil) of magnetic catalyst. The reaction was maintained at 40°C and 30 rpm with rotational mixing. The initial reaction rate for biodiesel production was assessed by withdrawing aliquots (5 µl) of the liquid phase at defined intervals which were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) as indicated below. Transesterification activity was defined as mg of oil transformed to biodiesel (fatty acid propyl esters, FAPes) per mg of MNP-NH<sub>2</sub> and time (h) considering the initial reaction rate of transesterification.

#### SYNTHESIS OF BIOPRODUCTS

##### Synthesis of biodiesel

Biodiesel (Fatty Acid Ethyl Esters, FAEEs) was obtained by esterification of FFAs. For that, a mixture of FFAs which simulates the composition of FFAs coming from microalgae (*Scenedesmus* sp.) was applied: 4.1% stearic acid, 23.6% palmitic acid, 52.1% oleic acid, 12.4% linoleic acid, and 7.8% linolenic acid. Ethanol (10:1 alcohol:FFA, mol:mol) was added to FFAs mixture (500 µmol) and 2 mg mCLEA-CALB. FAEEs were also obtained by transesterification of a mixture (0.2 g) of vegetable oils, composed of 80% palm oil, 10% soybean oil and 10% olive oil, with ethanol as alkyl donor in molar ratio of 30:1 (alcohol:oil) and 1% (w/w of oil) of magnetic biocatalyst. FAPes were produced by transesterification of vegetable oil (0.2 g) using 2-propanol as alkyl donor (6:1 molar ratio alcohol:oil) and 1% (w/w of oil) of magnetic catalyst. In all the cases, the reactions were carried out in a solvent-free medium at 25°C with rotational mixing (Intelli-Mixer RM-2, Elmi Ltd., Riga, Latvia). The reactions were followed by withdrawing aliquots (10 µl) of the liquid phase. Semi-quantitative analyses of samples were performed by thin layer chromatography (TLC) and the quantitative analysis using control FFAs and olive oil was performed by HPLC, as described above.

### Synthesis of biosurfactant

Sucrose 6'-monopalmitate (SMP) was synthesized by transesterification of sucrose and vinyl, methyl or ethyl palmitate catalyzed by mCLEA-CALB. Sucrose (100 mg/ml) was added to DMSO and stirred for 10 min at 70°C, or to 2M2P and stirred for 24 h at 70°C, in order to obtain a homogeneous mixture. Molecular sieves (4 Å) were added to solid sucrose, DMSO and 2M2P stocks in order to absorb their water content. Vinyl, methyl or ethyl palmitate was then added in a molar sucrose:alkyl palmitate ratio of 1:1, 1:2, or 1:3. mCLEA-CALB were washed with the corresponding solvent and used as catalysts in a concentration of 4 mg/ml. The reactions (5 ml) were incubated at 60°C and stirred using magnetic agitation (Carousel 12 Plus, Radleys, UK). Samples (100 µl) were withdrawn and the liquid phase was separated from the solid biocatalyst using a magnetic field. When using DMSO, the same volume of ethanol was added to the aliquots in order to overcome the immiscibility between palmitate esters and DMSO. Semi-quantitative and quantitative analyses of samples were performed by TLC and HPLC-MS, respectively, as described above.

### ANALYTICAL METHODS

#### HPLC analysis of biodiesel

Five microliter of samples withdrawn from the reaction mixture were diluted in 250 µl of *n*-hexane and analyzed by HPLC (Waters™ Corporation, Milford, MA, USA) using a diode array detector according to Holčápek et al. (1999). The C<sub>18</sub> column (5 µm, 4.6 × 250 mm, Tracer Lichrosorb RP18) was eluted at a flow rate of 1 ml/min using a mixture of acetonitrile:H<sub>2</sub>O (1:1 v/v) (phase A) and 100% pure methanol (phase B) as mobile eluting phase and a gradient from 75 to 100% phase B in 15 min. The injection volume was 10 µl and peaks were detected at 205 nm.

#### HPLC-MS analysis of biosurfactants

Analysis of SMP was carried out by HPLC (Alliance e2695, Waters™ Corporation, Milford, MA, USA) coupled with a triple quadrupole masses spectrometer (QqQ) (Quattro micro Api, Waters™ Corporation, Milford, MA, USA). The column (2.6 µm, 2.10 × 50 mm, Kinetex C18, Phenomenex) was eluted at 30°C and 0.2 ml/min flow-rate. 0.1% (v/v) formic acid in H<sub>2</sub>O (phase A) and 0.1% (v/v) formic acid in methanol (phase B) were employed as mobile phase, with a gradient from 50 to 100% phase B in 9 min. The injection volume was 10 µl. For the ionization of the SMP, a positive electrospray was used with 3200 V capillary voltage at 120°C. Nitrogen was used as desolvation gas at 300°C and 450 l/h flow-rate. SMP was monitored using MRM (multiple reaction monitoring) with a lineal calibration (10–500 ng/ml) following the next transition: 603.2 to 441.3 nm (for quantification) and 603.2 to 203.1 nm.

#### Thin layer chromatography (TLC) analysis

A semi-quantitative analysis of biodiesel and biosurfactant was also assessed using TLC. Silica gel 60 coated plates (Merck, Darmstadt, Germany) were activated for 30 min at 100°C and 0.5 µl samples were applied. For biodiesel analysis, the ternary mixture *n*-hexane:ethyl acetate:acetic acid (90:10:1, v/v/v)

was used as eluting phase (Samakawa et al., 2000). After chromatography development (about 40 min), plates were air dried at room temperature, and then immersed for 1 min with gentle orbital shaking in a 0.02% (w/v) solution of Coomassie Blue R-350 (Nakamura and Handa, 1984), prepared in acetic acid:methanol:H<sub>2</sub>O (1:3:6, v/v/v) as indicated by the manufacturer. Finally, the plates were air-dried at room temperature. Spots corresponding to substrates and products of the transesterification reaction were identified by using appropriate reference external standards run in parallel. For biosurfactant analysis, the eluting phase was composed of a mixture of toluene:ethyl acetate:ethanol (2:1:1, v/v/v). Spots corresponding to sucrose and SMP were detected by spraying the plates with a solution of urea (1 g urea, 4.05 ml phosphoric acid and 48 ml water-saturated 1-butanol) and heating them at 100°C for 15 min.

## RESULTS AND DISCUSSION

### CHARACTERIZATION OF MNPs AND IMMOBILIZED ENZYMES

MNPs were synthesized in our laboratory and analyzed by X-ray diffractography, which confirmed the presence of magnetite (data not shown). The increase of N content in MNPs with –NH<sub>2</sub> groups was confirmed by comparing the content of N, C, and H in naked MNPs and MNP-NH<sub>2</sub> using elemental analysis (see Figure 1). Percentage of N was negligible in non-functionalized nanoparticles, and increased up to 1% in particles whose surfaces were coated with groups. The increase was consistent with the presence of amine groups in the MNP-NH<sub>2</sub>. The increment of C content in functionalized nanoparticles was also noticeable, and could correspond to the C content of the functionalizing agent (APTS) used.

The functionalized MNP-NH<sub>2</sub> were then employed for the immobilization of CALB by two different procedures: (i) covalent immobilization by cross-linking of the protein on the surface of MNP-NH<sub>2</sub> (MNP-CALB, see Figure 2A); (ii) covalent immobilization of cross-linked enzyme aggregates (mCLEA-CALB, see Figure 2B). In both cases glutaraldehyde was used as a bifunctional cross-linking reagent. Both types of immobilized enzymes of CALB were selected as model biocatalysts for characterization purposes.

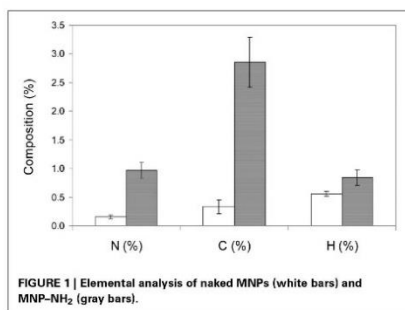
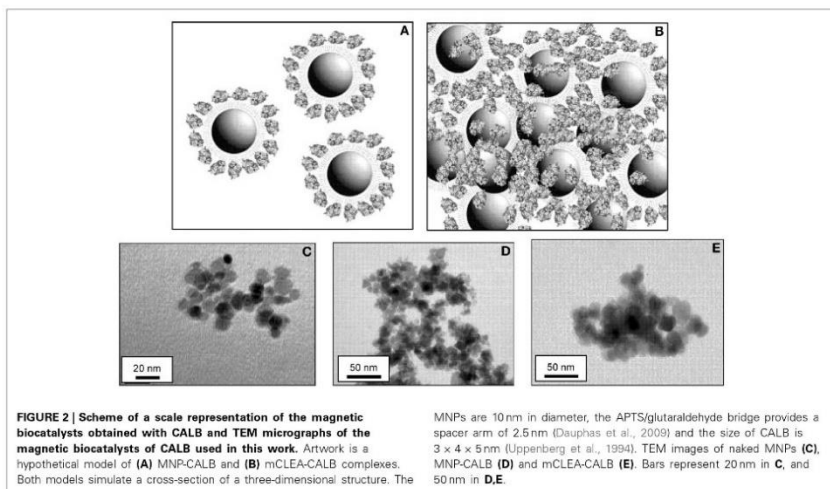
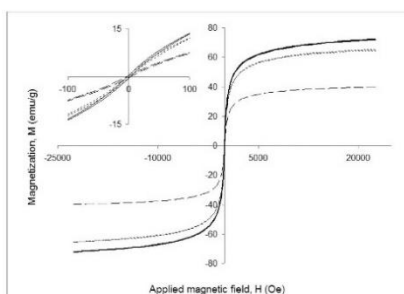


FIGURE 1 | Elemental analysis of naked MNPs (white bars) and MNP-NH<sub>2</sub> (gray bars).



The shape and size of MNPs and resulting immobilized enzymes were analyzed by TEM. Naked MNPs appeared as spherical particles with a uniform and defined size (see Figure 2C). Because the protein is not as opaque to electrons as MNPs, the presence of CALB bound directly to the surface of MNPs (Figure 2D) or forming mCLEA-CALB (Figure 2E) resulted in MNPs showing more fuzzy and diffuse edges than the naked counterparts.

Trying to determine if the binding of the protein could modify the magnetic properties of the particles, magnetic behavior of both protein-free MNP-NH<sub>2</sub> and immobilized enzymes (MNP-CALB and mCLEA-CALB) was analyzed at different magnetic fields and at 300 K (see Figure 3). At this temperature, the shape of the magnetization curve vs. magnetic field was similar for the three biocatalysts. In the three cases, when the external magnetic field was removed the particles lost the magnetization. Also, once saturation reached, magnetization only disappeared when magnetic field was reduced to zero. These two properties are represented by the concepts of magnetic remanence ( $M_r$ ) and coercivity ( $H_c$ ), which were very close to zero, being a characteristic of superparamagnetic nanoparticles. The saturation magnetization ( $M_s$ ) of MNP-NH<sub>2</sub> was 82.5 emu/g (Table 1), similar to the value corresponding to bulk magnetite (89 emu/g, Ramirez and Landfester, 2003). The presence of cross-linked enzyme lowered the value of  $M_s$ , and that reduction increased at higher protein concentration, because the saturation magnetization value was referred to the total mass of biocatalyst instead of the mass of the magnetic support. Fitting magnetic results to the Langevin's function, particle size distribution of naked MNPs was obtained.



**FIGURE 3 |** Magnetization analysis at 300 K of the magnetic biocatalysts obtained with CALB. MNP-CALB (solid lines), mCLEA-CALB with 25 µg protein/mg MNPs (dotted lines with short strokes) and mCLEA-CALB with 100 µg protein/mg MNPs (dotted lines with long strokes). Inset shows a detail of magnetization for values of magnetic field near to 0 Oe.

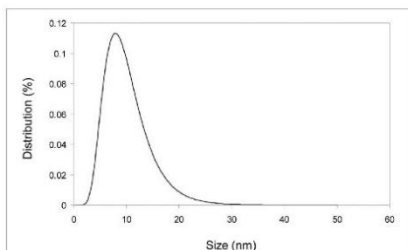
Figure 4 shows a mean nanoparticle diameter of 9.5 nm with a dispersion of  $\pm 6$  nm.

#### CATALYTIC PROPERTIES OF FREE AND IMMobilized CALB

The use of magnetic supports for immobilization of enzymes provides well-known facilities for the recovery and reuse of

**Table 1 | Magnetic parameters of MNP-NH<sub>2</sub> and biocatalysts obtained of CALB.**

Support or biocatalyst	Immobilized CALB (μg/mg MNPs)	M <sub>s</sub> (emu/g)	M <sub>r</sub> (emu/g)
MNP-NH <sub>2</sub>	–	82.5	1.0
MNP-CALB	25	65.3	0.5
mCLEA-CALB	25	72.1	0.5
	100	40.0	0.3

**FIGURE 4 | Particle size distribution of MNPs.** The distribution was fitted to the Langevin's function yielding a mean particle size of 9.5 nm and dispersion of ±6 nm.

the catalysts. The benefits in terms of catalytic properties were checked using CALB as model enzyme and three types of immobilization: MNP-CALB (50 μg protein/mg MNPs), mCLEA-CALB with low load of protein (25 μg protein/mg MNPs), and mCLEA-CALB with high load of protein (100 μg protein/mg MNPs) (Table 2). Using non-aggregated enzyme, 50% of the protein was measured in the liquid phase, indicating that only 25 μg protein/mg MNPs was firmly attached to the support. However, using covalent CLEAs the immobilization efficiency reached 100%.

The effect of immobilization was assessed by the measurement of three enzymatic activities using preparations of the free and immobilized biocatalysts: (i) esterase activity using pNPA which is converted to pNP, (ii) hydrolysis of tributyrin to butyric acid, and (iii) the transesterification of olive oil with propanol to obtain EAPES.

Having in mind the concentration of immobilized CALB (μg protein/mg MNPs), esterase activities of free and immobilized biocatalysts can be compared in terms of specific activities (U/mg protein): 20, 15.2, 10.8, and 10 U/mg protein for free enzyme, MNP-CALB and mCLEA-CALB of low and high load, respectively. The decrease in specific activity of immobilized enzymes compared to free enzymes could be associated to diffusional limitations which usually occur in immobilized biocatalysts due to steric hindrance. In that case, the rate of diffusion of substrates and/or products to and from the active site of the enzyme is lower than the enzymatic reaction rate (Pésić et al., 2012). These

**Table 2 | Main properties of magnetic biocatalysts obtained of CALB.**

Property	Free lipase	MNP-CALB	mCLEA-CALB
Immobilized CALB (μg/mg MNPs)	–	25	25
Activity <sup>a</sup>			
Esterase (U/mg catalyst)	20	0.38	0.27
Hydrolytic (U/mg catalyst)	1416.2	0.2	7.2
Transesterification (U/mg catalyst)	–	2.0	2.6
Biodiesel conversion (%)	–	20.5	30.3
Stability <sup>b</sup>			
Biodiesel conversion after 10 cycles (%)	–	9.4	13.7
		59.3	

<sup>a</sup>Activities were assayed as detailed in Materials and Methods.

<sup>b</sup>Stability was assessed as a measure of the biodiesel (FAPEs) conversion after 10 consecutive catalytic cycles of 24 h at 40°C.

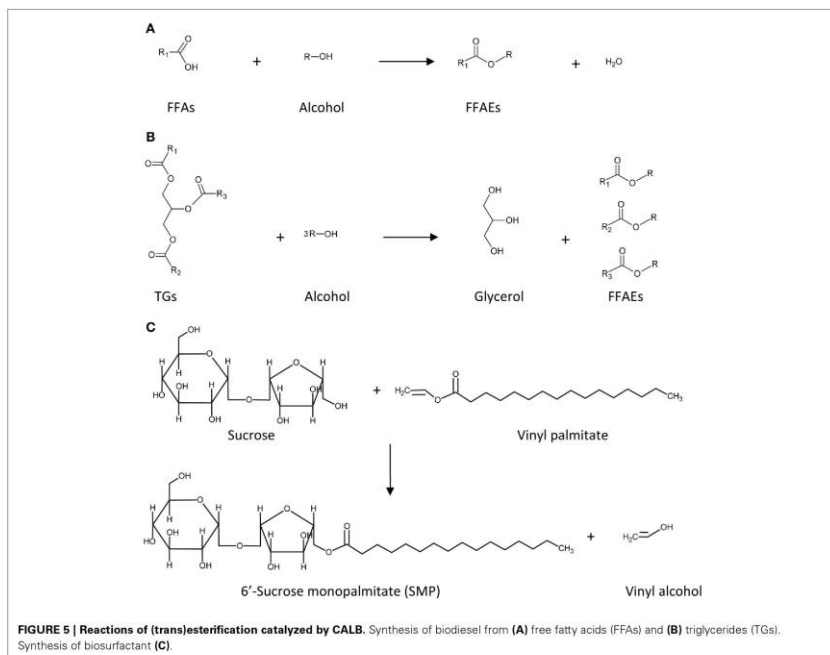
diffusional problems were higher when using CLEAs than for non-aggregated enzyme, which indicates that enzyme aggregation could hinder the diffusion of compounds. The difference between free and immobilized enzyme activities was even more evident when analyzing the hydrolysis of tributyrin, due to the very fast enzymatic reaction.

mCLEA-CALB containing 100 μg protein/mg MNPs resulted to be the most appropriate biocatalyst in terms of enzymatic activities (U/mg MNPs), including the transesterification of olive oil to biodiesel, where a very high conversion was obtained after 24 h (Table 2). Moreover, the biocatalyst was much more stable than the other immobilized enzymes tested, maintaining practically the same conversion to biodiesel after 10 reaction cycles. Thermal stability was also considerably higher, as the biocatalyst only lost 10% of the initial activity when heated at 60°C for 30 min, while MNP-CALB and mCLEA-CALB (25 μg protein/mg MNPs) lost 70 and 50%, respectively. In any case, the immobilized biocatalysts were much more stable than the free enzyme, which lost 95% of the initial activity when heated at 60°C for 30 min. MNPs attached to previously aggregated and cross-linked enzymes (mCLEAs) represent the best option for the synthesis of magnetic biocatalysts, as high concentrations of protein can be attached to the enzyme, and this is more protected against destabilizing agents.

#### SYNTHESIS OF BIODIESEL

The ability of the prepared magnetic biocatalysts to synthesize biodiesel was tested using preparations of both FFAs and vegetable oils in a solvent-free system (see Figure 5).

The esterification of FFAs was performed using a mixture of them which mimics the composition of reserve lipids present in the microalga *Scenedesmus* sp., which mainly consisted of C14 and C16 saturated and unsaturated fatty acids. Ethanol was selected as alkyl donor in a molar ratio of 10:1 (alcohol:FFA), acting also as solvent of FFAs. The reaction (Figure 5A) was followed by both TLC and HPLC, and results are shown in Figures 6, 7, respectively. TLC plates stained with Coomassie Blue is a useful tool to identify and semi-quantify not only EAEEs but also FFAs. Figure 6 reveals that the esterification of FFAs was noticeable at 30 min,



and was practically completed after 5 h of reaction. These values were confirmed by HPLC-quantification of FFAEs (data not shown) and unsaturated FFAs (Figure 7), which indicated conversions of 60% for C16:2 and C16:3 at 30 min and 90% after 5 h of reaction.

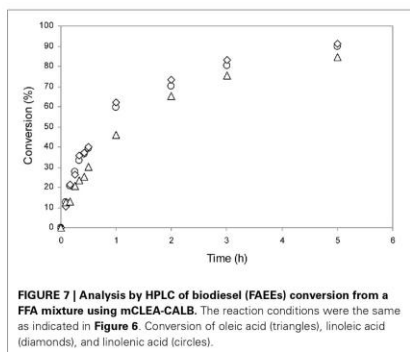
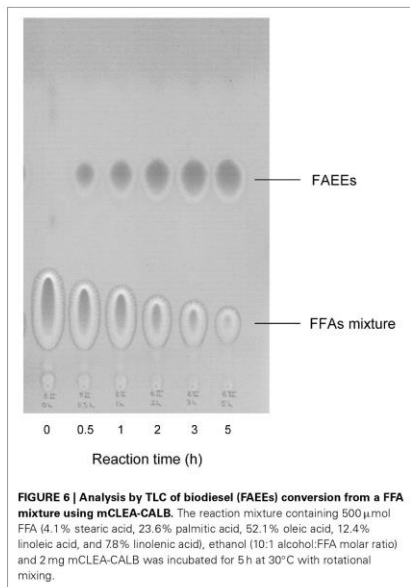
Trying to improve the simulation of microalgae oil, a mixture of vegetable oils (80% palm oil, 10% soybean oil and 10% olive oil) was prepared and used as substrate for the transesterification reaction. Taking into account the stoichiometry of the reaction (3:1, Figure 5B) and the molar excess of ethanol considered for FFAs, a molar ratio of 30:1 (alcohol:oil) was selected for the transesterification of this oil mixture. TLC analysis of the initial sample (Figure 8, lane 1) indicates the presence of triglycerides, but also the perceptible presence of FFAs, monoglycerides and diglycerides. After 1 h, the spot corresponding to triglycerides decreased, and after 24 h a high amount of triglycerides was converted to FFAEs. The presence of FFAs not only did not interfere in the transesterification of the oil but also they were converted to FFAEs in the reaction catalyzed by CALB. This point is remarkable because, as it is well-known, the presence of FFAs drastically reduces the yield and quality of the product obtained by some

of the usual chemical processes applied for the synthesis of biodiesel (Leung et al., 2010). On the other hand, the diversity and complexity of the oil mixture made the transesterification rate significantly lower than the rate of FFAs esterification (Figure 6).

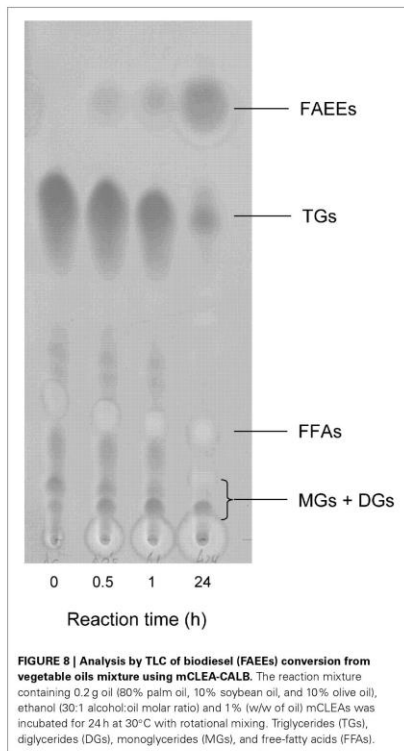
Finally, the benefits of mCLEA-CALB as biocatalyst for the transesterification of vegetable oils were pointed out by comparing the three synthesized magnetic CALB catalysts for the synthesis of biodiesel from olive (used as a control), unrefined soybean, jatropha and cameline oils (Figure 9). The behavior of the biocatalysts seemed to be independent of the non-edible oil selected. The comparison of MNP-CALB with mCLEA-CALB of the same protein concentration revealed that the formation of CLEAs before immobilization contributes to the stabilization of the enzyme, and consequently, its maximal exploitation during the enzymatic reaction. Even so, the best conversion results were obtained when the highest concentration of protein was immobilized, reaching biodiesel conversion over 90% in 24 h at 30°C.

#### SYNTHESIS OF BIOSURFACTANTS

The enzymatic synthesis of SFAEs is usually limited by its low productivity, as the reaction only occurs in a medium where polar

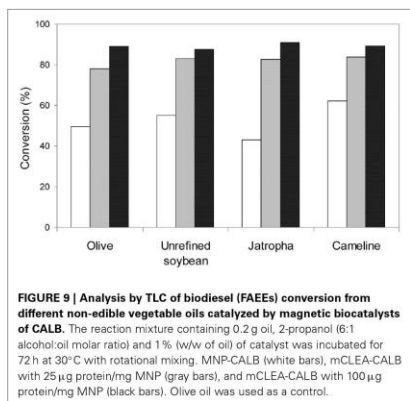


sugar and non-polar fatty acid donor could be soluble. Some attempts were performed to find an adequate medium, which must fulfill solubilization requirements and preserve biocatalyst activity. Commercial immobilized CALB (Novozyme 435) was



applied for this purpose with low productivities (Ferrer et al., 1999).

Taking advantage of the high stability showed by mCLEA-CALB for the synthesis of biodiesel, the utility of this magnetic separable biocatalyst was tested for the transesterification of sucrose with different alkyl palmitate esters (vinyl, methyl and ethyl palmitate) as shown in Figure 5C. DMSO was selected as solvent due to its polar aprotic characteristic, dissolving both polar and non-polar compounds. The palmitate ester was added to 292 mM sucrose dissolved in DMSO in molar ratios sucrose:palmitate of 1:1, 1:2, and 1:3, and the enzymatic reaction using mCLEA-CALB was performed at 60°C for 24 h. Figure 10 shows the results obtained by TLC analysis of the samples. After staining the plates with urea solution, the spots corresponding to sucrose and SMP became visible. Spots corresponding to SMP appeared only when vinyl palmitate was used as fatty acid

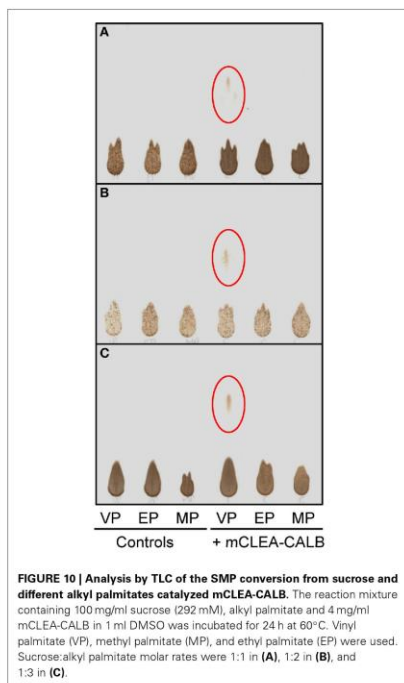


donor, and the highest concentration corresponded to a molar ratio of 1:3. This result is consistent with previous studies, which point out that the vinyl alcohol formed during the process could tautomerize to the low-boiling-point acetaldehyde, shifting the equilibrium toward the ester formation. However, by employing alkyl fatty acid esters the transesterification reactions became reversible, resulting in low yields (Cruces et al., 2001).

Studies of soluble CALB and mCLEA-CALB stabilities in different polar and non-polar solvents revealed that the magnetic biocatalyst is much more stable than the free enzyme, although the stability in DMSO is still low (the half life of the magnetic enzyme is below 3 h, data not shown). Other solvents were tried in order to enhance enzyme stability, and the solubility losses were overcome with intense magnetic agitation. Results of reaction performed in 2M2P were compared to those obtained using DMSO in Table 3. The presence of DMSO inactivated the enzyme, resulting in a low conversion, which occurred in the first 5 h of reaction. However, taking advantage of stability improvement, mCLEA-CALB catalyzed the production of 40 mM SMP (23 g/l) using 2M2P as solvent.

## CONCLUSIONS

In this paper we report that robust magnetically-separable biocatalysts of lipase show higher stability and better performance than the soluble enzymes. Moreover, they can be reused after easily recovery by a magnetic field avoiding the use of filtration or centrifugation which inevitably led to enzyme clumping. We have demonstrated the utility of these biocatalysts to catalyze reactions in both aqueous and non-aqueous media to obtain bioproducts of interest such as biodiesel or biosurfactants from sustainable and renewable sources. These results indicate that synergism of using properly functionalized magnetic nanosupports combined with suitable selection of the adequate enzyme can lead to the development of novel robust magnetic nanobiocatalysts of interest for



**Table 3 | Effect of the solvent used on the production of sucrose 6'-monopalmitate (SMP)<sup>a</sup>.**

Time (h)	SMP (mM)	
	Dimethylsulfoxide	2-Methyl-2-propanol
0	0	0
5	0.39	1.59
72	0.40	24.1
168	0.40	39.6

<sup>a</sup>The reaction mixture (5 ml) contained sucrose (292 mM) and vinyl palmitate (876 mM) in the presence of the solvents DMSO or 2M2P mCLEA-CALB (20 mg) was used to catalyze the reaction at 60°C with magnetic stirring. At the indicated times samples were withdrawn and analyzed by HPLC-MS.

industry. Enzyme inactivation by solvents or byproducts during bioproducts obtainment can be minimized or avoided by searching for a robust enzyme. The combination of nanotechnology and biocatalysis represents a promising opportunity to develop novel

stable and efficient magnetic biocatalysts which can be easily recovered from the reaction mixture and reused in new catalytic cycles thus greatly improving the economic viability for its use to obtain bioproducts at industrial scale.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the University of the Basque Country (UPV/EHU, GIU11/25), the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CTQ2011-25052), the Basque Government (SAIOTEK S-PE12UN041), and European Union (Energreen, POCTEFA EFA217/11). We are grateful to Mr. Ramiro Martínez (Novozymes A/S, Spain) for providing us with CALB samples. Álvaro Cruz-Izquierdo and Noelia Villarroel were the recipients of scholarships from the UPV/EHU.

#### REFERENCES

- Bisen, P. S., Sanodiya, B. S., Thakur, G. S., Baghel, R. K., and Prasad, G. B. (2010). Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. *Biotechnol. Lett.* 32, 1019–1030. doi: 10.1007/s10529-010-0275-z
- Gao, L., van Rantwijk, F., and Sheldon, R. A. (2000). Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Org. Lett.* 2, 1361–1364. doi: 10.1021/ol005593x
- Cruces, M. A., Plou, F. J., Ferrer, M., Bernabé, M., and Ballesteros, A. (2001). Improved synthesis of sucrose fatty acid monoesters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78, 541–546. doi: 10.1007/s11746-001-0300-5
- Cruz-Izquierdo, A., Picó, E. A., Anton-Helas, Z., Boeriu, C. G., Llama, M. J., and Serra, J. L. (2012). Lipase immobilization to magnetic nanoparticles: methods, properties and applications for bio-based products. *New Biotechnol.* 29S, S100–S101. doi: 10.1016/j.nbt.2012.08.283
- Daughas, S., Ababou-Girard, S., Girard, A., Bihan, F. L., Mohammed-Brahim, T., Vié, V., et al. (2009). Stepwise functionalization of SiN<sub>2</sub> surfaces for covalent immobilization of antibodies. *Thin Solid Films* 517, 6016–6022. doi: 10.1016/j.tsf.2009.05.014
- Dyal, A., Loos, K., Noto, M., Chang, S. W., Spagnoli, C., Shafi, K. V. P. M., et al. (2003). Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> magnetic nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 1684–1685. doi: 10.1021/ja021223n
- Ferrer, M., Cruces, M. A., Bernabé, M., Ballesteros, A., and Plou, F. J. (1999). Lipase-catalyzed regioselective acylation of sucrose in two-solvent mixtures. *Biotechnol. Bioeng.* 65, 10–16.
- Ferrer, M., Plou, F. J., Fuentes, G., Cruces, M. A., Andersen, L., Kirk, O., et al. (2002). Effect of the immobilization method of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on sucrose acylation. *Biocatal. Biotransform.* 20, 63–71. doi: 10.1080/10242420210153
- Gao, L., Xu, J.-H., Li, X.-J., and Liu, Z.-Z. (2004). Optimization of *Serratia marcescens* lipase production for enantioselective hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 525–530. doi: 10.1007/s10295-004-0182-1
- Gumel, A. M., Annuar, M. S. M., Heidelberg, T., and Chisti, T. (2011). Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. *Proc. Biochem.* 46, 2079–2090. doi: 10.1016/j.procbio.2011.07.021
- Holcapek, M., Jandra, P., Fischer, J., and Prokeš, B. (1999). Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. *J. Chrom. A* 858, 13–31. doi: 10.1016/S0021-9673(99)00790-6
- Huang, D., Jiang, X., Zhu, H., Fu, X., Zhong, K., and Gao, W. (2010). Improved synthesis of sucrose fatty acid monoesters under ultrasonic irradiation. *Ultrason. Sonochem.* 17, 352–355. doi: 10.1016/j.ultrsonch.2009.08.009
- Johnson, P. A., Park, H. J., and Driscoll, A. J. (2011). Enzyme nanoparticle fabrication: magnetic nanoparticle synthesis and enzyme immobilization. *Methods Mol. Biol.* 679, 183–191. doi: 10.1007/978-1-60761-895-9\_15
- Kopp, W., da Costa, T. P., Pereira, S. C., Jafelicci, M. Jr., Giordano, R. C., Marques, R. F. C., et al. (2014). Easily handling penicillin G acylase magnetic cross-linked enzymes aggregates: catalytic and morphological studies. *Proc. Biochem.* 49, 38–46. doi: 10.1016/j.procbio.2013.09.024
- Leung, D. Y. C., Wu, X., and Leung, M. K. H. (2010). A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Appl. Energy* 87, 1083–1095. doi: 10.1016/j.apenergy.2009.10.006
- Liese, A., and Hilterhaus, L. (2013). Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6236–6249. doi: 10.1039/c3cs35511j
- Matsunaga, T., and Kamiya, S. (1987). Use of magnetic particles isolated from magnetotactic bacteria for enzyme immobilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26, 328–332. doi: 10.1007/BF00256663
- Montoro-García, S., Gil-Ortiz, F., Navarro-Fernández, J., Rubio, V., García-Carmona, E., and Sánchez-Ferrer, A. (2010). Improved cross-linked enzyme aggregates for the production of desacyl  $\beta$ -lactam antibiotics intermediates. *Biores. Technol.* 101, 331–336. doi: 10.1016/j.biortech.2009.08.016
- Nakamura, K., and Handa, S. (1984). Coomassie brilliant blue staining of lipids on thin-layer plates. *Anal. Biochem.* 142, 406–410. doi: 10.1016/0003-2697(84)90484-6
- Pešić, M., López, C., Álvaro, G., and López-Santín, J. (2012). A novel immobilized chloroperoxidase biocatalyst with improved stability for the oxidation of amino alcohols to amino aldehydes. *J. Mol. Catal. B Enz.* 84, 144–151. doi: 10.1016/j.molcatb.2012.04.010
- Ramirez, L. P., and Landfester, K. (2003). Magnetic polystyrene nanoparticles with a high magnetite content obtained by miniemulsion processes. *Macromol. Chem. Phys.* 204, 22–31. doi: 10.1002/macp.200290052
- Ren, Y., Rivera, J. G., He, L., Kulkarni, H., Lee, D. K., and Messersmith, P. B. (2011). Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. *BMC Biotechnol.* 11:83. doi: 10.1186/1472-6750-11-63
- Safarik, I., and Safarikova, M. (2009). Magnetic nano- and microparticles in biotechnology. *Chem. Papers* 63, 497–505. doi: 10.2478/s11696-009-0054-2
- Samakawa, T., Kaieda, M., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., et al. (2000). Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. *J. Biosci. Bioeng.* 90, 180–183. doi: 10.1016/S1389-1723(00)80107-3
- Sheldon, R. A. (2007). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1583–1587. doi: 10.1042/BST0351583
- Sheldon, R. A. (2011). Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 467–477. doi: 10.1007/s00253-011-3554-2
- Sheldon, R. A., and van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6223–6235. doi: 10.1039/c3cs60075k
- Talekar, S., Ghodake, V., Ghotage, T., Rathod, P., Deshmukh, P., Nadar, S., et al. (2012). Novel magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of  $\alpha$ -amylase. *Biores. Technol.* 123, 542–547. doi: 10.1016/j.biortech.2012.07.044
- Tudorache, M., Nae, A., Coman, S., and Parvulescu, V. (2013). Strategy of cross-linked enzyme aggregates onto magnetic particles adapted to the green design of biocatalytic synthesis of glycerol carbonate. *RSC Adv.* 3, 4052–4058. doi: 10.1039/c3ra23222k
- Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S., and Jones, T. A. (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2, 293–308. doi: 10.1016/S0969-2126(00)00031-9
- van den Broeck, L. A. M., and Boeriu, C. G. (2013). Enzymatic synthesis of oligo- and polycarbohydrate fatty acid esters. *Carbohydr. Polym.* 93, 65–72. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.05.051
- van Kempen, S. E. H. J., Boeriu, C. G., Schols, H. A., de Waard, P., van der Linden, E., and Sagis, L. M. C. (2013). Novel surface-active oligofructose fatty acid mono-esters by enzymatic esterification. *Food Chem.* 138, 1884–1891. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.09.133
- Verma, M. L., Barrow, C. J., and Puri, M. (2013). Nanobiotechnology as a novel paradigm for enzyme immobilisation and stabilisation with potential applications in biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 23–39. doi: 10.1007/s00253-012-4535-9
- Wang, M., Jia, C., Qi, W., Yu, Q., Peng, X., Su, R., et al. (2011). Porous-CLEAs of pepsin: application to enzymatic hydrolysis of macromolecules. *Biores. Technol.* 102, 3541–3545. doi: 10.1016/j.biortech.2010.08.120



Xin, B. J., Si, S. F., and Xing, G. W. (2010). Protease immobilization on  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$  magnetic nanoparticles for the synthesis of oligopeptides in organic solvents. *Chem. Asian J.* 5, 1389–1394. doi: 10.1002/asia.200900696

Yiu, H. H. P., and Keane, M. A. (2012). Enzyme-magnetic nanoparticle hybrids: new effective catalysts for the production of high value chemicals. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 87, 583–594. doi: 10.1002/jctb.3735

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 30 April 2014; accepted: 08 August 2014; published online: 26 August 2014.

*Citation:* López C, Cruz-Izquierdo Á, Picó EA, García-Bárcena T, Villarreal N, Llama MJ and Serra JL (2014) Magnetic biocatalysts and their uses to obtain biodiesel and biosurfactants. *Front. Chem.* 2:72. doi: 10.3389/fchem.2014.00072

This article was submitted to *Chemical Biology*, a section of the journal *Frontiers in Chemistry*.

Copyright © 2014 López, Cruz-Izquierdo, Picó, García-Bárcena, Villarreal, Llama and Serra. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.





**OPEN ACCESS**

**Citation:** Cruz-Izquierdo Á, Picó EA, López C, Serra JL, Llana MJ (2014) Magnetic Cross-Linked Enzyme Aggregates (mCLEAs) of *Candida antarctica* Lipase: An Efficient and Stable Biocatalyst for Biodiesel Synthesis. PLoS ONE 9(12): e115202. doi:10.1371/journal.pone.0115202

**Editor:** Pratul K. Agarwal, Oak Ridge National Laboratory, United States of America

**Received:** July 1, 2014

**Accepted:** November 19, 2014

**Published:** December 31, 2014

**Copyright:** © 2014 Cruz-Izquierdo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability:** The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by grants from the University of the Basque Country (UPV/EHU), project GIU11/25 and scholarship for AIC1, <http://www.ehu.es>, the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (project CTQ2011-25052, <http://www.mineco.es>), the Basque Government (project SAJOTEK S-PE12UN041, <http://www.euskadi.net>), Ikerbasque, the Basque Foundation for Science (fellowship for CL, [www.ikerbasque.net](http://www.ikerbasque.net)) and European Union (project Energreen, POCTEFA EFA217/11, <http://www.poctefa.eu>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

RESEARCH ARTICLE

# Magnetic Cross-Linked Enzyme Aggregates (mCLEAs) of *Candida antarctica* Lipase: An Efficient and Stable Biocatalyst for Biodiesel Synthesis

Álvaro Cruz-Izquierdo<sup>1</sup>\*, Enrique A. Picó<sup>1</sup>, Carmen López<sup>1,2</sup>\*, Juan L. Serra<sup>1</sup>, María J. Llana<sup>1</sup>

1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Bilbao, Spain, 2. IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain

\*[carmen.lopez@ehu.es](mailto:carmen.lopez@ehu.es)

<sup>na</sup> Current address: Department of Chemistry, University of Bath, Bath, United Kingdom

<sup>nb</sup> Current address: Department of Chemistry and Food Technology, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain

## Abstract

Enzyme-catalyzed production of biodiesel is the object of extensive research due to the global shortage of fossil fuels and increased environmental concerns. Herein we report the preparation and main characteristics of a novel biocatalyst consisting of Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) of *Candida antarctica* lipase B (CALB) which are covalently bound to magnetic nanoparticles, and tackle its use for the synthesis of biodiesel from non-edible vegetable and waste frying oils. For this purpose, insolubilized CALB was covalently cross-linked to magnetic nanoparticles of magnetite which the surface was functionalized with  $-NH_2$  groups. The resulting biocatalyst combines the relevant catalytic properties of CLEAs (as great stability and feasibility for their reutilization) and the magnetic character, and thus the final product (mCLEAs) are superparamagnetic particles of a robust catalyst which is more stable than the free enzyme, easily recoverable from the reaction medium and reusable for new catalytic cycles. We have studied the main properties of this biocatalyst and we have assessed its utility to catalyze transesterification reactions to obtain biodiesel from non-edible vegetable oils including unrefined soybean, jatropha and camelina, as well as waste frying oil. Using 1% mCLEAs (w/w of oil) conversions near 80% were routinely obtained at 30°C after 24 h of reaction, this value rising to 92% after 72 h. Moreover, the magnetic biocatalyst can be easily recovered from the reaction mixture and reused for at least ten consecutive cycles of 24 h without apparent loss of activity. The obtained results suggest that mCLEAs

prepared from CALB can become a powerful biocatalyst for application at industrial scale with better performance than those currently available.

## Introduction

Due to the global shortage of fossil fuels, a consequent excessive rise in the price of crude oil and increased environmental concerns, a rapid growth in biodiesel production has been observed [1]. Biodiesel is a clean-burning diesel fuel composed of a mixture of alkyl esters of long-chain fatty acids which is typically produced from nontoxic, renewable biological resources such as vegetable oils, animal fats, or even used cooking oils [2]. Nowadays, the alkali-catalyzed transesterification of triglycerides present in oils or fats is the most common way to produce biodiesel at industrial scale due to its high conversion and kinetics. However, when these raw materials contain an elevated percentage of water or free fatty acids, undesirable reactions drastically reduce the yield and quality of the resulting biodiesel [2]. Thus, enzyme-catalyzed production of biodiesel by lipases is more advantageous over the chemical counterpart since it is chemically selective, reaction is carried out at lower temperature and under milder conditions and downstream processes are more environmentally friendly [3].

Lipases constitute a group of versatile enzymes that catalyze the hydrolysis of lipids in aqueous media, but in organic media they can catalyze synthetic reactions, including interesterifications between triglycerides and alcohols to produce glycerin and alkyl-esters of long chain fatty acids, *i.e.*, biodiesel. However, free lipases are easily inactivated in organic solvents and difficult to recover for reuse [4]. *Candida antarctica* lipase B (CALB) is an extracellular monomeric globular (33.5 kDa) enzyme which is not as efficient as other lipases in hydrolyzing triglycerides, but it is highly stereospecific towards both ester hydrolysis and synthesis. Due to its efficiency and high selectivity this lipase has been immobilized by several methods (especially by covalent attachment to silica gel, celite or activated nanoparticles) and it is being used in a wide range of applications replacing industrial synthetic processes [5].

Many strategies have been recently applied to immobilize CALB. One of the most successful consists of covalent linking of the enzyme to the surface of iron oxide magnetic nanoparticles (MNPs) [6,7]. The high specific surface of MNPs favors the binding efficiency of the enzyme, and the superparamagnetic behavior of the support permits the easy and selective recovery of the biocatalyst using a magnet and its subsequent reuse in more catalytic cycles [8,9]. On the other hand, the support-free methodology consisting of the formation of cross-linking enzyme aggregates (CLEAs) of lipase with glutaraldehyde [10,11] is a simple technique which does not require the use of highly pure enzymes. It has a broad scope and affords robust, recyclable catalysts that exhibit high activity retention, enhanced thermal stability, better tolerance to organic solvents, and enhanced resistance to

autoproteolysis due to the rigidification of the tertiary structure of the enzyme [12–15]. Due to the large size of the aggregates, CLEAs can be recovered from the reaction medium by centrifugation or filtration, although this process leads to the increase of CLEAs size and formation of clusters (clumping) resulting in internal mass-transfer limitations [16, 17].

In recent years, lipases immobilized on MNPs or in CLEAs have been successfully used to obtain biodiesel. Xie and Ma [18, 19] reported 90% conversion to biodiesel using covalently immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase on amino-functionalized MNPs. Also *Burkholderia cepacia* lipase immobilized to MNPs of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> yielded complete conversion to biodiesel [20]. In addition biodiesel was obtained from olive oil using CLEAs of crude preparations from *Photobacterium lipolyticum* lipase M37 [21]. Lai et al. [22] also reported 85.7% conversion to biodiesel from microalgal oil using an ionic liquid (1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate) as a solvent and CLEAs obtained from crude preparations of *Penicillium expansum*.

Recently, our group has developed a method for the preparation of magnetic cross-linked enzyme aggregates (mCLEAs) of CALB. This method consists of the cross-linking of insolubilized lipase to aminated MNPs by glutaraldehyde [23]. The resulting mCLEAs fulfill the main benefits of magnetic biocatalysts and CLEAs, as they show improved thermal and storage stabilities, and can be reused after their recovery from the reaction mixture with a magnet. Also mCLEAs of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. [16] and lipase from *Aspergillus niger* [24] were successfully prepared and used to hydrolyze starch and to obtain glycerol carbonate, respectively.

In this paper, the main magnetic properties of mCLEAs were assessed as well as the utility of this robust biocatalyst to obtain biodiesel from several non-edible vegetable oils. Finally, the enhanced stability of our mCLEAs of CALB was ascertained by reusing the magnetic enzyme to catalyze the production of biodiesel in consecutive 24 h batch reactions. A similar procedure to that detailed here to prepare mCLEAs of CALB can be easily expanded to prepare mCLEAs of other enzymes of interest.

## Materials and Methods

### Materials

CALB L, the lipase B of *Candida antarctica* (CALB, EC 3.1.1.3, 19.1 U/mg protein; 7.50 mg protein/ml) was kindly provided by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). HyperLadder I markers were purchased from Bioline (Randolph, MA, USA). Tween 20 and Tween 80 were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTS), NaBH<sub>4</sub>, FeCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, dimethylsulfoxide (DMSO), sodium dodecyl sulphate (SDS), *p*-nitrophenyl acetate (*p*NPA), bovine serum albumin, and Triton X-100 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Coomassie Blue was obtained from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). All other chemicals were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Non-edible

oils (unrefined soybean, jatropha and camelina) were obtained from Bunge Ibérica, S.A. (Zierbena, Spain), Jatropha Hispania, S.L. (Toledo, Spain) and Camelina Company (Madrid, Spain), respectively. Olive oil used as a control was purchased from Carbonell (Madrid, Spain) and waste frying oil was obtained from local restaurants.

### Synthesis and functionalization of magnetic nanoparticles (MNPs)

Magnetic nanoparticles of magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) were synthesized by coprecipitation of iron salts in alkaline medium [25]. An aqueous solution, 50 ml, containing 0.36 M  $\text{FeCl}_2$  and 0.72 M  $\text{FeCl}_3$  was pumped at 5.0 ml/min (LKB Pump P-1, Pharmacia, Uppsala, Sweden) into 450 ml of 1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  solution under continuous mechanic stirring at room temperature (S1 Video). The obtained black precipitate was separated from the liquid phase using a magnetic field, and then magnetically washed thrice with ultrapure water (MilliQ, Millipore Co., Bedford, MA, USA) and twice with phosphate buffered saline (PBS, 100 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4). All solutions used for the synthesis of MNPs were prepared using MilliQ water. Moreover, a  $\text{N}_2$  gas stream was continuously bubbled through all solutions during the process. The resulting magnetic nanoparticles contained  $-\text{OH}$  groups on their surface [26, 27]. In order to functionalize them with  $-\text{NH}_2$  groups, MNPs (300 mg, dry weight) were incubated with 30 ml of 2% (v/v) APTS at 70°C with orbital shaking (200 rpm). After 24 h, they were washed thrice with PBS and maintained in the same buffer at 4°C until use.

### Characterization of MNPs

Phase identification was done by X-ray diffraction studies (XRD, Philips diffractometer PW1710, Almelo, The Netherlands). The crystallite size was calculated from the X-ray line broadening using Scherrer's and Warren's equation:

$$D = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta}$$

where  $K$  takes the value of 0.89 considering spherical particles;  $\lambda$  is the wavelength of X radiation used (0.54 nm);  $\theta$  is the Bragg angle;  $\beta$  is the net diffraction peak broadening in radians being determined from:

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

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

where  $\beta_{obs}$  is the observed broadening (experimental) and  $\beta_{ins}$  the instrumental broadening.

The particle size and morphology were determined by transmission electron microscopy (TEM, JEOL 1010, Peabody, MA, USA). The density of  $-\text{NH}_2$  groups

on the nanoparticles surface was determined by a colorimetric assay using *p*-nitrobenzaldehyde [28]. The magnetic characteristics were measured using different devices: for the calculation of magnetic saturation ( $M_s$ ) 2 K hysteresis loops were performed using a vibrating sample magnetometer (VSM) in a superconducting magnet (14 T) cooled by a closed circuit of He (CFMS, Cryogenic Ltd., London, UK). To calculate coercivity ( $H_c$ ) and remanence ( $M_r$ ) an electromagnet was used at room temperature and moderate fields (0.9 T). The average size of magnetic particles was calculated from the magnetization data according to Langevin's equations adjusted for non-interacting superparamagnetic model. MNPs dry weight and concentration were analyzed using a vacuum concentrator (Savant SpeedVac concentrator, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

#### Preparation of magnetic CLEAs from CALB

In order to obtain magnetic CLEAs, 10 mg (dry weight) of MNP-NH<sub>2</sub> were incubated with different concentrations of CALB (from 0.025 to 1.2 mg protein/mg MNP-NH<sub>2</sub>) in the presence of precipitant agents and detergents in a final volume of 15 ml. The precipitant agents used were 80% (v/v) ethanol, 80% (v/v) 2-propanol, 80% (v/v) acetone in water at 4°C, or ammonium sulphate at concentration in the range of 12.5 to 125 mmol/mg protein at 25°C. The detergent concentrations used were 0–5 mM Triton X-100, 0–0.1 mM Tween 20, 0–0.1 mM Tween 80 or 0–25 mM SDS. In all cases, the samples were mixed continuously at 30 rpm using an Intelli-Mixer RM-2, Elmi Ltd. (Riga, Latvia). After 5 min, a 2.5 M glutaraldehyde solution was added (final concentration from 0 to 500 mM) and the suspension was maintained in agitation for 1 to 24 h. After this time, the mCLEAs were removed from the liquid phase using magnetic field, and mCLEAs were washed thrice with PBS. Both the Schiff's bases and the unreacted aldehyde groups were reduced for 2 h at room temperature with rotational mixing with NaBH<sub>4</sub> (0.75 mg/mg MNP-NH<sub>2</sub>) dissolved in 100 mM carbonate/bicarbonate buffer, pH 10.0. In order to minimize non-specific interactions mCLEAs were then magnetically washed for 10 min firstly with 2 M NaCl in PBS and then with 1% (v/v) Triton X-100 in PBS as reported by Mateo et al. (2000) [29]. After each step, the excess of reagents and possible unretained enzyme were removed by washing thrice with PBS for 10 min. At the end of the immobilization process, the final concentration was 2 mg mCLEAs/ml. The magnetic catalyst was stored at 4°C in PBS for future use.

Magnetic biocatalysts at different formation steps were incubated at 100°C for 5 min, and then, the liquid phase was collected and analyzed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [30] using homogeneous 8% acrylamide gels revealed with silver (Bio-Rad, Hercules, PA, USA). The amount of immobilized lipase was calculated by measuring the protein remaining in solution at 595 nm (Bio-Rad protein Assay kit, Hercules, PA, USA).

## Enzyme assays

### Esterase activity with pNPA

The activity of soluble and immobilized CALB was assayed with *p*-nitrophenyl acetate (pNPA) as a substrate according to the protocol reported by Gao et al. [31] with minor modifications. Specifically, soluble or immobilized lipase (1–2 µg protein) was added to a reaction mixture which contained 10 µl of pNPA (100 mM in DMSO) in 980 µl of PBS. The reaction mixture was maintained for 15 min at room temperature with rotational mixing at 30 rpm (Intelli-Mixer RM-2, Elmi Ltd., Riga, Latvia). Samples were withdrawn every 5 min (in the case of immobilized lipase the magnetic biocatalysts were separated from the liquid phase using a magnet) and the appearance of *p*-nitrophenol (pNP) was measured spectrophotometrically (Beckman Coulter DU 800, Brea, CA, USA) at 405 nm ( $\epsilon_{pNP}=9.43 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). One unit (U) of esterase activity was defined as the amount of enzyme that catalyzes the appearance of 1 µmol pNP per min under the assay conditions.

### Transesterification of olive oil

Olive oil (0.2 g) and 2-propanol (1:6 molar ratio oil:alcohol) were incubated with 1% (w/w of oil) of magnetic catalyst. The reaction was maintained at 40°C and 30 rpm with rotational mixing. The initial reaction rate for biodiesel production was assessed by withdrawing aliquots (5 µl) of the liquid phase at defined intervals which were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) as indicated below. Transesterification activity was defined as mg of oil transformed to biodiesel (fatty acid propyl esters, FAPes) per mg of MNP-NH<sub>2</sub> and time (h) considering the initial reaction rate of transesterification.

### Synthesis of biodiesel

FAPes were produced from vegetable oil (0.2 g) using 2-propanol as alkyl donor (1:6 molar ratio oil:alcohol) and 1% (w/w of oil) of magnetic catalyst in a solvent-free reaction. The reaction was followed by withdrawing aliquots (10 µl) of the liquid phase. Semi-quantitative analysis of samples was performed by thin layer chromatography (TLC) and the quantitative analysis using control olive oil was performed by HPLC as described below.

## Analytical methods

### HPLC analysis

Five µl of samples withdrawn from the reaction mixture were diluted in 250 µl of *n*-hexane and analyzed by HPLC (Waters Corporation, Milford, MA, USA) using a diode array detector according to Holčapek et al. [32]. The C<sub>18</sub> column (5 µm, 4.6 × 250 mm, Tracer Lichrosorb RP18) was eluted with 100% pure methanol (phase A) and a mixture of propanol:*n*-hexane (5:4 v/v) (phase B) at a flow rate of 0.5 ml/min using a gradient from 0 to 50% phase B in 25 min. Peaks were detected at 205 nm.



### Thin layer chromatography (TLC) analysis

A semi-quantitative analysis of non-edible or waste frying olive oil was also assessed using TLC. Silica gel 60 coated plates (Merck, Darmstadt, Germany) were activated for 30 min at 100°C and 0.5  $\mu$ l samples were applied. The ternary mixture *n*-hexane:ethyl acetate:acetic acid (90:10:1 v/v/v) was used as the eluting phase [33]. After chromatography development (about 40 min), plates were air dried at room temperature, and then immersed for 1 min with gentle orbital shaking in a solution of 0.02% (w/v) Coomassie Blue R-350 [34], prepared in acetic acid:methanol:H<sub>2</sub>O (1:3:6 v/v/v) as indicated by the manufacturer. Finally, the plates were air dried at room temperature. Spots corresponding to substrates and products of the transesterification reaction were identified by using appropriate reference external standards (triolein, 1,3-diolenin, 1-oleyl-rac-glycerol, oleic acid and propyl oleate) run in parallel.

## Results and Discussion

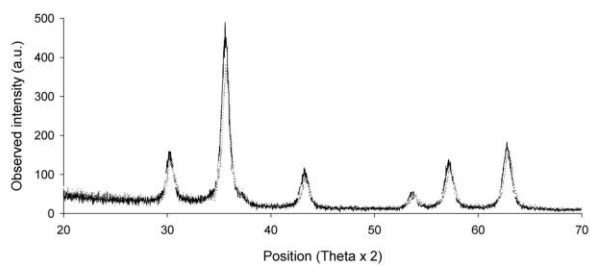
### Magnetic nanoparticles characterization

MNPs size was analyzed by XRD and TEM. X-ray diffraction patterns showed that magnetite constitutes the only crystalline phase present both in MNP-OH and MNP-NH<sub>2</sub> (Fig. 1), with a crystallite size of 11.2 nm and 11.1 nm, respectively, according to Scherrer's equation, and 9.5 nm and 9.4 nm, respectively, according to Warren's equation. These results indicated that functionalization of MNPs with -NH<sub>2</sub> groups did not change the phase, nor the crystallite size of the magnetic support. The shape and size of the MNPs was confirmed by TEM (Fig. 2), which showed that both types of MNPs are spherical particles with a mean diameter around 10 nm, indicating that coating their surfaces with -NH<sub>2</sub> groups did not result in observable differences in their size, shape or aggregation state.

The surface areas were theoretically calculated from the particle size distribution provided by TEM data (Table 1). The results were similar to those reported by other authors, as Harris et al. [35] who determined a surface area of 110 m<sup>2</sup>/g for 8.7 nm nanoparticles, or Sahoo et al. [36] who calculated 93 m<sup>2</sup>/g for particles with mean diameter of 10–12 nm.

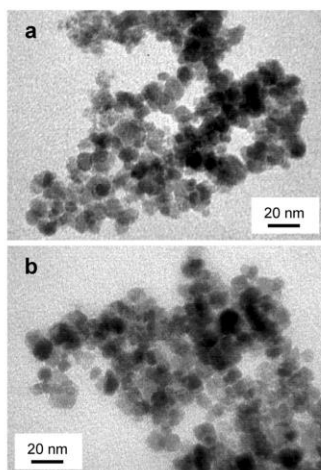
The density of -NH<sub>2</sub> groups on the surface of particles was determined using naked MNPs as a control (Table 1). The calculated density of -NH<sub>2</sub> groups on functionalized nanoparticles (43  $\mu$ mol/g) was very similar to that reported by del Campo et al. [28] who found approximately 45  $\mu$ mol/g of MNPs. These authors also calculated the density of -NH<sub>2</sub> groups by elemental analysis obtaining higher values. This result may suggest that some -NH<sub>2</sub> groups do not react with 4-nitrobenzaldehyde, and therefore all the amine groups are not available for the interaction with the enzyme. In this case, the calculated density would represent the functionally available groups for the enzyme immobilization.

Magnetic behavior of MNPs was analyzed at different magnetic fields and two temperatures: one below the blocking temperature of magnetite nanoparticles (i.e., the temperature below which magnetite nanoparticles show ferromagnetic



**Fig. 1. XRD spectrum of magnetic nanoparticles.** MNPs were coated with  $-OH$  (solid line), and  $-NH_2$  (dotted line) groups.

doi:10.1371/journal.pone.0115202.g001



**Fig. 2. TEM images of magnetic nanoparticles.** MNPs were coated with (a)  $-OH$ , and (b)  $-NH_2$  groups. Samples were dispersed in ethanol using an ultrasound bath and then placed onto a Formvar-covered copper grid and evaporated in air at room temperature. Bars represent 20 nm in both pictures.

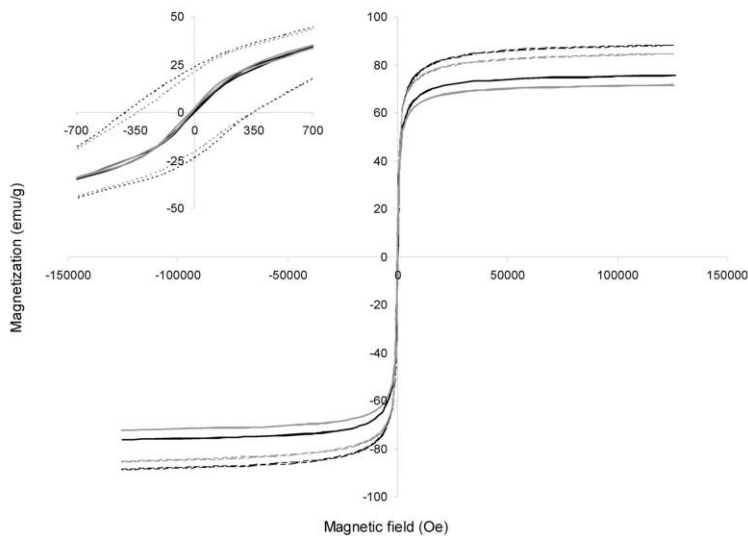
doi:10.1371/journal.pone.0115202.g002

**Table 1.** Main characteristics of MNPs coated with –OH and –NH<sub>2</sub> groups.

	MNP–OH	MNP–NH <sub>2</sub>
Diameter (nm)	10.4 ± 0.9	10.3 ± 0.9
Surface area (m <sup>2</sup> /g)	112.7 ± 9.3	113.8 ± 9.4
–NH <sub>2</sub> group density (μmol/g)	0.24 ± 0.01	42.96 ± 0.02
<i>M<sub>s</sub></i> (emu/g)	86.0	82.5
<i>H<sub>c</sub></i> (Oe)	0.3	0.1
<i>M<sub>r</sub></i> (emu/g)	3.4	1.0

doi:10.1371/journal.pone.0115202.t001

characteristics, and corresponds to 75 K, [37] and the other one at close to room temperature (Fig. 3). Both types of nanoparticles (MNP–OH and MNP–NH<sub>2</sub>) showed hysteresis behavior below the blocking temperature, although this characteristic disappeared at 300 K. At this temperature, magnetic remanence (*M<sub>r</sub>*) and coercivity (*H<sub>c</sub>*) values fell to near zero, which is typical of superparamagnetic nanoparticles. The saturation magnetization (*M<sub>s</sub>*) was



**Fig. 3. Magnetization analysis of magnetic nanoparticles at different temperatures.** Magnetization analysis of MNP–OH (black lines) and MNP–NH<sub>2</sub> (grey lines) were performed at 300 K (solid lines) and 2 K (dotted lines). Inlet shows a detail of magnetization for values of magnetic field near to 0 Oe.

doi:10.1371/journal.pone.0115202.g003

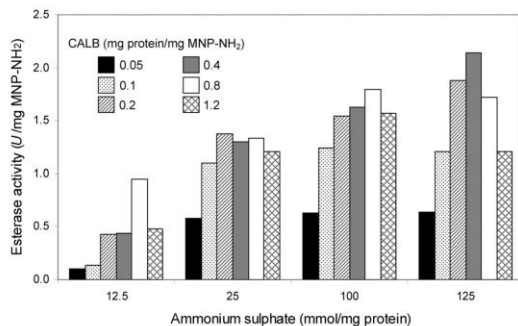
determined to be 86.0 and 82.5 emu/g for naked and NH<sub>2</sub>-functionalized nanoparticles, respectively, which is lower than that reported for bulk magnetite (89 emu/g, [38]). This decrease in  $M_s$  was also observed by other authors [26, 39] and could be related to the difference between macroscopic and nanoscopic magnetite [25, 27, 35, 39]. On the other hand, the binding of APTS to the nanoparticles caused a slight decrease of 4% in the  $M_s$  of the magnetic support, which has been previously observed when organic molecules were immobilized on MNPs [40, 41]. This fact could be explained because the binding of APTS on the nanoparticle surface might quench the magnetic moment [42, 43]. Fitting magnetic result to the Langevin's function, a magnetic core average diameter of 7.8 nm, with 3–4 nm dispersion, was calculated. This value is consistent with the size determined from XRD data as aforementioned.

### Preparation of mCLEAs

Synthesis of mCLEAs involves a sequence of steps starting with enzyme insolubilization followed by cross-linking the resulting protein aggregates with themselves and the surfaces of NH<sub>2</sub>-functionalized magnetic nanoparticles. Optimization aspects concerning the selection of precipitation conditions, cross-linking agent, time or enzyme concentration were considered.

### Effect of precipitating agent

Commonly used lipase precipitating agents were selected to insolubilize CALB, i.e., ethanol, 2-propanol, acetone and ammonium sulphate (125 mmol/mg protein). After enzyme precipitation, mCLEAs were prepared at room temperature by cross-linking (for 24 h) 0.2 mg CALB/mg MNP-NH<sub>2</sub> in the presence of 200 mM glutaraldehyde. A control using soluble enzyme was carried out in parallel, with initial protein concentration of 0.133 mg/ml and esterase activity of 2.532 U/ml. The end of the immobilization process was verified by analyzing the protein concentration in the liquid phase of the immobilization medium, and the esterase activity in both the liquid and formed mCLEAs. The selected precipitating agents allowed the formation of mCLEAs with 100% protein and esterase activity retention, with the exception of ethanol, which caused a drop in both the retained protein and esterase activity to 46.3% and 46.8%, respectively. In addition to ethanol, also 2-propanol and acetone strongly affected the esterase activity of the biocatalyst, resulting in values of 0.826, 0.655 and 0.383 U/mg MNP-NH<sub>2</sub>. However, the mCLEAs obtained with ammonium sulphate showed an activity of 1.823 U/mg MNP-NH<sub>2</sub>. When comparing these values with the theoretical immobilized activity (3.8 U/mg MNP-NH<sub>2</sub>), immobilization efficiencies of 21.7, 17.2, 10.1 and 48.0% were obtained when using ethanol, 2-propanol, acetone and ammonium sulphate, respectively. These results are in agreement with those reported by other authors [10, 11, 44], who proposed that ammonium sulphate was the best option because it usually preserves the enzymatic activity of the biocatalyst. Therefore, ammonium sulphate was selected in this work as the precipitating agent to prepare mCLEAs of CALB.



**Fig. 4. Combined effect of CALB and insolubilizing agent concentrations on the esterase activity of mCLEAs.** Different concentrations of lipase were cross-linked for 5 h with 200 mM glutaraldehyde in the presence of the indicated concentrations of ammonium sulphate.

doi:10.1371/journal.pone.0115202.g004

The insolubilizing effect of ammonium sulphate concentration (12.5–125 mmol/mg protein) was studied at room temperature by measuring the esterase activity retained by the resulting mCLEAs prepared using 50  $\mu$ g to 1.2 mg lipase/mg MNP-NH<sub>2</sub> and cross-linked for 5 h with 200 mM glutaraldehyde. At low concentration of lipase a good relationship between the immobilized esterase activity and ammonium sulphate was observed (Fig. 4). However at the highest concentration of salt (125 mmol/mg protein), lower activity recovery was measured at lipase concentrations higher than 0.4 mg protein/mg MNP-NH<sub>2</sub>. This effect is probably due to excessive cross-linking and/or size of aggregates which would lead to irreversible enzyme denaturation and/or the appearance of diffusional problems.

It should be noted that the theoretical immobilized activity increases with the increase of enzyme concentration in the preparation. Maximum esterase activities of 0.95, 1.91, 3.82, 7.67, 15.27 and 22.91 U/mg MNP-NH<sub>2</sub> correspond to protein concentrations of 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.2 mg protein/mg MNP-NH<sub>2</sub>, respectively. Maximum immobilization efficiencies of around 60% were obtained when 0.1 mg protein/mg MNP-NH<sub>2</sub> were used. Further increase in enzyme concentrations was not reflected in an increase of recovery activity. This is a usual behavior of immobilized enzymes which is related to diffusional limitations occurring when diffusional rate of substrates and products is lower than reaction rate, thus decreasing the observed rate of the reaction.

Conclusively, 0.1 mg protein/mg MNP-NH<sub>2</sub> and 100 mmol of ammonium sulphate/mg protein were selected in order to prepare mCLEAs of CALB.

### Effect of detergents

It is well known that the presence of a detergent at an appropriate concentration can often hyperactivate the enzyme, especially when using lipases [45–47]. Furthermore, detergents may prevent the enzyme immobilization through its active center and promote the enzyme orientation in the support so enhancing its activity and/or stability.

The esterase activity of soluble CALB was measured in the presence of Triton X-100, Tween 20, Tween 80 and SDS, at different concentrations below and above their critical micelle concentration (cmc) which were 0.6, 0.06, 0.012 and 8 mM (0.388, 0.074, 0.016 and 2.307 kg/m<sup>3</sup>), respectively. The activity of soluble CALB increased in the presence of Triton X-100 at concentrations above its cmc (S1A Fig.). However, the presence of Triton X-100 at such concentrations during the preparation of mCLEAs had a negative effect in oil transesterification (S1b Fig.). Fernández-Lorente et al. [45] also immobilized CALB in the presence of Triton X-100 on an aminated support, with a final detergent concentration of 1% (v/v) (i.e., 17 mM, 11 kg/m<sup>3</sup>), observing an increase in hydrolytic activity, but this was not tested in organic media [45,46]. The detergent could enhance enzymatic activity in aqueous medium reactions, but it could lose the hyperactivation capability in hydrophobic media, due to the formation of inverse micelles.

Both Tween 20 and Tween 80 had no effect on CALB esterase activity nor on mCLEAs transesterification activity. The presence of SDS decreased the activity of poorly concentrated mCLEAs, whereas apparently caused a strong hyperactivation of highly concentrated samples. Such hyperactivation is similar to that described by López-Serrano et al. [48] and Gupta et al. [44], who prepared CLEAs in the presence of SDS and observed that the activity increased 2–3 fold. Actually, the transesterification activity of the biocatalyst prepared with high concentration of protein in absence of SDS should be 4-fold higher than the one with lower concentration. The presence of SDS when preparing mCLEAs with highly concentrated aggregates could protect the hydrophobic areas close to active centers, resulting in biocatalysts with lower steric hindrance and thus, higher values of specific activity.

The use of detergents during the formation of mCLEAs would only be recommended for the immobilization of high protein concentrations. However, detergents were not used for further experiments in this work as concentrations of protein above 0.1 mg/mg MNP–NH<sub>2</sub> seem to result in low immobilized enzyme retentions.

### Effect of cross-linker concentration

The cross-linking effect of glutaraldehyde was investigated by assessing the esterase activity of mCLEAs prepared by incubating for 5 h the insolubilized lipase (0.1 mg CALB/mg MNP–NH<sub>2</sub> with 100 mmol ammonium sulphate/mg protein) in the presence of glutaraldehyde at concentrations from 0 to 500 mM (Table 2). The immobilized esterase activity increased linearly when glutaraldehyde concentration was varied from 0 to 200 mM, the maximum value (1.24 U/mg MNP–NH<sub>2</sub>) representing 65% of offered activity (1.91 U/mg MNP–NH<sub>2</sub>). Above

**Table 2.** Effect of cross-linker concentration on the preparation of mCLEAs of CALB.

Glutaraldehyde (mM)	Recovered activity (U/mg MNP-NH <sub>2</sub> )	Apparent retained activity (%)
0	0.021	1.1
5	0.019	1.0
10	0.031	1.6
25	0.079	4.1
75	0.391	20.5
125	0.893	46.8
200	1.238	64.8
250	1.188	62.2
300	1.180	61.8
350	1.285	67.3
400	1.315	68.8
500	1.142	59.8

doi:10.1371/journal.pone.0115202.t002

that concentration, the immobilized activity remained unchanged. At higher glutaraldehyde concentration, the cross-linking of MNP-NH<sub>2</sub> could be favored, reducing the available surface area for the immobilization of aggregates. On the other hand, the immobilization time of 5 h could be insufficient for the formation of covalent bonds, and a more prolonged incubation at these conditions should be used in order to increase the activity retention.

#### Effect of protein concentration and immobilization time

At first approach, mCLEAs of CALB (0.1 mg protein/mg MNP-NH<sub>2</sub>, 100 mmol sulphate/mg protein, 200 mM glutaraldehyde, no detergent) were prepared by varying the time (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 24 h) used to cross-link the enzyme aggregates onto the surface of MNP-NH<sub>2</sub>. Addition of the cross-linker agent resulted in an immediate activity retention of 42%. This value rose from 65% to almost 100% when the contact time was enlarged from 5 h to 24 h (Table 3). This increase indicates that the immobilization process requires large periods of time to completely establish covalent linkages between enzyme and support. With this in mind, the observed apparent low value of retained activity when high loads of protein were immobilized for 5 h (Table 3) could be due to low retention of protein during this insufficient period of time. When an immobilization time of 24 h was used, the complete protein immobilization was confirmed by analysis of unbound protein at the different steps of the process (S2 Fig.). Even so, high protein loads resulted in low apparent retained activities. Data suggest that 0.1 mg protein/mg MNP-NH<sub>2</sub> is the maximum concentration that ensures the absence of steric hindrance observed in esterase activity measurement.

Lipases have been immobilized in a great variety of supports in several works [10, 49], obtaining immobilization efficiencies below 80%. Xie and Ma [18, 19] immobilized lipase on amino-functionalized magnetic nanoparticles and studied the optimization of the protein concentration to obtain maximum immobilization efficiencies. As a result, they obtained 70% efficiency at concentrations in the

**Table 3.** Effect of protein concentration and immobilization time on the preparation of mCLEAs of CALB.

Immobilization time (h)	Offered protein (mg/mg MNP-NH <sub>2</sub> )	Offered activity (U/mg MNP-NH <sub>2</sub> )	Recovered activity (U/mg MNP-NH <sub>2</sub> )	Apparent retained activity (%)
5	0.05	0.95	0.63	66.0
	0.1	1.91	1.24	65.0
	0.2	3.82	1.55	40.5
	0.4	7.67	1.63	21.3
	0.8	15.27	1.79	11.7
	1.2	22.91	1.57	6.9
	24	0.05	0.95	0.93
24	0.1	1.91	1.90	99.5
	0.2	3.82	1.82	47.8
	0.4	7.67	2.08	27.2

doi:10.1371/journal.pone.0115202.t003

range of 0.025 to 0.05 mg protein/mg MNP-NH<sub>2</sub>. Our improved immobilization method allowed the load of a higher concentration of protein per mg of support with total activity retention, which leads to enzyme and support savings, and consequently economical benefits in production processes.

#### Morphology of mCLEAs

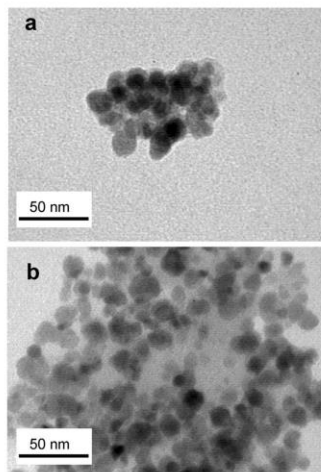
The size and shape of mCLEAs of CALB were examined by TEM after staining the samples with 1% (w/v) phosphotungstic acid. Discrete arrangements of about 100 nm × 75 nm (Fig. 5a) were routinely detected although larger aggregates could be also observed (Fig. 5b).

#### Biodiesel production by mCLEAs

The ability of the magnetic CLEAs to catalyze the production of biodiesel from vegetable oils in a solvent-free system was tested. The transesterification reaction was performed using 200 mg olive oil and 2-propanol in a molar ratio of 6:1 (alcohol:oil) in the presence of different concentrations of mCLEAs (prepared using 0.1 mg protein/mg MNP-NH<sub>2</sub>, 100 mmol sulphate/mg protein, 200 mM glutaraldehyde, no detergent). After incubating the reaction mixtures containing mCLEAs (at 0.5, 1, 2 and 5% w/w of oil) for 24 h at 30°C, conversions of 64.0, 76.1, 81.5 and 82.2%, respectively, were obtained. These data indicate that a very low concentration of the biocatalyst (1% w/w of oil) is suitable to catalyze the transesterification of olive oil.

The time-course of the reaction was assessed during 72 h for both control olive oil and waste frying oil. Samples were withdrawn at time intervals and analyzed by either HPLC (olive oil) or TLC (waste frying oil). HPLC data revealed the appearance of diglycerides, monoglycerides and free fatty acids (Fig. 6) as intermediates in the synthesis of biodiesel (fatty acid propyl esters, FAPes). These intermediates could be also observed in samples analyzed by TLC and stained with





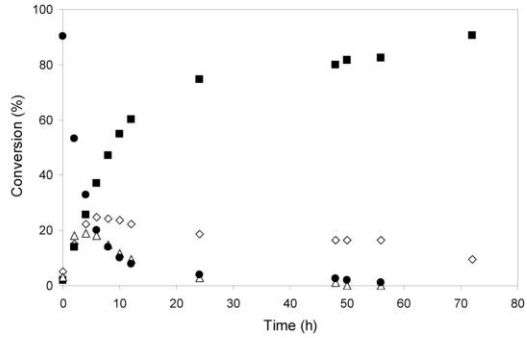
**Fig. 5. TEM images of mCLEAs.** Samples were negatively stained with phosphotungstic acid and dispersed in ethanol as in Fig. 2. (a) and (b) represent different images of the same sample. Bars represent 50 nm in both pictures.

doi:10.1371/journal.pone.0115202.g005

Coomassie Blue (Fig. 7a), indicating that this versatile semi-quantitative method can be useful to determine the reaction progress with time by following changes in substrate and products concentrations. It is worth mentioning that TLC analysis followed by plate revealing with Coomassie Blue permits to analyze in parallel at least 10 samples in less than 1 h. In addition it allows the use of crude and/or recycled vegetable oils which could originate troubles when analyzed by HPLC.

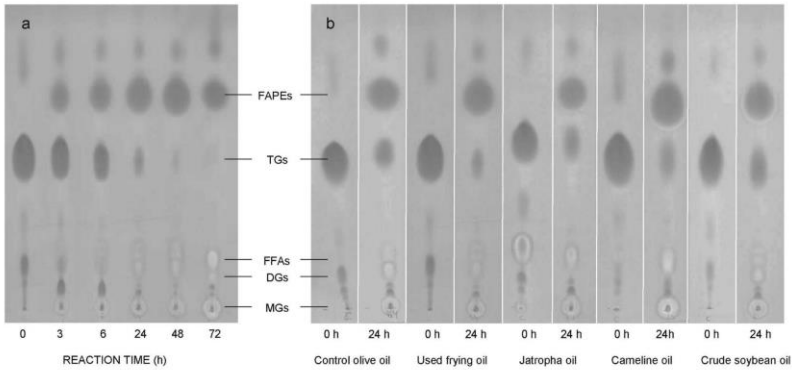
The efficiency of low concentrations of mCLEAs to catalyze the conversion into biodiesel of other non-edible vegetable triglycerides was tested using jatropha, cameline and crude (unrefined) soybean oils. Samples of these crude oils were used without any pretreatment. The transesterification reaction with 2-propanol was carried out using 1% of biocatalyst (w/w oil) at 30°C for 72 h, as described previously for olive oils, and the resulting FAPEs were analyzed by TLC. As shown in Fig. 7b, similar bioconversions were observed in all cases after 24 h of transesterification reaction.

The immobilization of lipase to different carriers for biodiesel production has been studied previously with high conversion results (64–100%), although elevated concentrations of biocatalyst (5–15% w/w of oil) were used in most of the cases [49–52]. Even when lipase was immobilized on  $\text{NH}_2$ -functionalized



**Fig. 6. Time-course of biodiesel (FAPEs) conversion catalyzed by mCLEAs of CALB.** The reaction mixture containing 200 mg olive oil, 2-propanol (6:1 alcohol:oil molar ratio) and 1% (w/w of oil) mCLEAs was incubated for 72 h at 30 °C with rotational mixing. Samples (10 µl) were withdrawn at the indicated times and analyzed by HPLC. Triglycerides (●), FAPEs (■), diglycerides (△) and monoglycerides with free fatty acids (◇).

doi:10.1371/journal.pone.0115202.g006



**Fig. 7. Analysis by TLC of biodiesel (FAPEs) conversion using mCLEAs of CALB.** The reaction mixture and conditions were the same as in Fig. 6, except that (a) waste frying olive oil and (b) different vegetable oils were used as substrate. Olive oil was included as a control substrate. Triglycerides (TGs), diglycerides (DGs), monoglycerides (MGs) and free-fatty acids (FFAs).

doi:10.1371/journal.pone.0115202.g007

magnetic nanoparticles, requirements from 17.3 to 40% (w/w of oil) of biocatalyst were reported [18–20]. Only a few number of researchers described the use of lower concentrations of enzyme to catalyze the transesterification reaction, as Mendes et al. [53] who used 0.2% (w/w of oil) of enzyme, although they worked at 45°C with high alcohol:oil molar ratios. It is well known that temperature not only increases kinetics but also can affect stability of the enzyme.

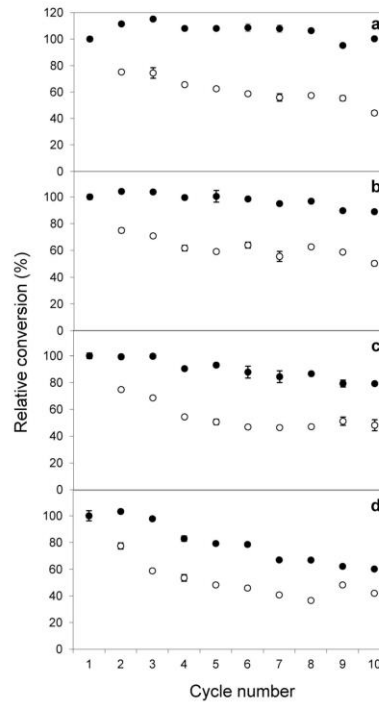
The stability and reusability of mCLEAs of CALB was investigated by reusing the biocatalyst for several consecutive reaction cycles at temperatures from 30 to 60°C. After each cycle (24 h) the biocatalyst was recovered from the reaction mixture using a magnetic field. Two different catalysts, prepared using 0.05 and 0.1 mg CALB/mg MNP-NH<sub>2</sub>, were tested. The biocatalyst with lower concentration of lipase not only showed a 4-fold lower transesterification activity but it was also considerably less stable than its counterpart containing 0.1 mg protein/mg MNP-NH<sub>2</sub> (Fig. 8). Using the latter, the 24 h-conversion was preserved for at least 10 consecutive reaction cycles without observing any significant loss of catalytic capacity. Although stability decreased with the increase in temperature, the highly-loaded biocatalyst maintained more than 60% of the activity after 10 cycles at 60°C.

Wang et al. [20] observed that the retained activity of their lipase catalyst decreased by more than 70% after 10 consecutive cycles of reaction at 40°C; Xie and Ma [18,19] observed a decrease of 50% activity after the fifth cycle of catalysis using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized on MNPs for the production of biodiesel at high temperatures (45–50°C). Our data reveal that the combination of cross-linked enzyme aggregates with MNPs results in a robust biocatalyst which is able to catalyze the synthesis of biodiesel at low enzyme concentration, and is more stable than other lipase preparations reported so far. The effectiveness of this biocatalyst for the synthesis of biosurfactants was also proved recently in a previous work from our group [54].

Novel enzyme engineering techniques are being applied for the improvement of catalytic efficiencies of CALB. Thus, Agarwal and coworkers [55] introduced a photoactivatable molecule on the surface of the enzyme, which allowed the modulation of the enzyme conformation by light stimulation, obtaining an increase in 24% of CALB catalytic activity. A combination of protein engineering with mCLEAs formation could result in an easily recoverable and reusable enzyme with improved enzymatic activity and high stability, which could considerably increase the robustness and applicability of the biocatalyst.

## Conclusions

In this work we report an efficient, facile and economical method to prepare mCLEAs of *Candida rugosa* lipase B by cross-linking with glutaraldehyde CALB aggregates onto the surface of MNPs functionalized with -NH<sub>2</sub> groups. The resulting magnetic biocatalyst shows an enhanced stability and maintains the superparamagnetic behavior typical of MNPs, which allows for easy separation



**Fig. 8. Reusability of mCLEAs of CALB at different temperatures.** Biocatalyst was used in consecutive reaction cycles of 24 h for biodiesel (FAPEs) conversion from olive oil at: (a) 30°C, (b) 40°C, (c) 50°C and (d) 60°C. The reaction mixture and conditions were the same as in Fig. 6. Relative conversion is referred to the final conversion after the first cycle and was calculated using samples analyzed by HPLC. Two types of mCLEAs were tested which were prepared using 0.05 (○) and 0.1 mg protein/mg MNP-NH<sub>2</sub> (●).

doi:10.1371/journal.pone.0115202.g008

and reusability in consecutive catalytic cycles without apparent loss of activity. The utility of this robust biocatalyst for the efficient production of biodiesel has been demonstrated although it could be also used to obtain other highly valuable compounds, such as biosurfactants, flavoring and aromatic compounds or bioactive compounds.

### Supporting Information

**S1 Fig.** Effect of detergents on enzymatic activity. (a) Relative esterase activity of soluble CALB; (b) Oil transesterification activity of mCLEAs: (●) 0.1 mg CALB/mg MNP-NH<sub>2</sub>; (○) 0.4 mg CALB/mg MNP-NH<sub>2</sub>.

[doi:10.1371/journal.pone.0115202.s001](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115202.s001) (TIF)

**S2 Fig.** Analysis of unbound protein after the different immobilization steps: (a) MNP-CALB (50 µg CALB/mg MNP-NH<sub>2</sub> in absence of precipitant agent); (b) mCLEAs (100 µg CALB/mg MNP-NH<sub>2</sub>). Cont: control of offered protein (CALB, molecular mass = 33.5 kDa); UR: unretained protein after 2 h of cross-linking; 1: first wash with PBS; 2: second wash with PBS; 3: third wash with PBS; BH<sub>4</sub>: unretained protein after NaBH<sub>4</sub> reduction; NaCl: unretained protein after washing with 2 M NaCl; TX: unretained protein after washing with 1% (v/v) Triton X-100; B: liquid phase after incubating the MNP-CALB complex for 5 min at 100°C.

[doi:10.1371/journal.pone.0115202.s002](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115202.s002) (TIF)

**S1 Video.** Synthesis of magnetic nanoparticles.

[doi:10.1371/journal.pone.0115202.s003](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115202.s003) (MPG)

### Acknowledgments

We are grateful to Mr Ramiro Martínez (Novozymes A/S, Spain) for providing us with CALB samples.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ACI CL JLS MJL. Performed the experiments: ACI EAP CL. Analyzed the data: ACI EAP CL JLS MJL. Contributed reagents/materials/analysis tools: ACI EAP CL JLS MJL. Wrote the paper: ACI CL JLS MJL.

### References

1. Bajaj A, Lohan P, Jha PN, Mehrotra R (2010) Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *J Mol Catal B Enzym* 62: 9–14.
2. Leung DYC, Wu X, Leung MKH (2010) A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Appl Energy* 87: 1083–1095.
3. Bisen PS, Sanodiya BS, Thakur GS, Baghel RK, Prasad GB (2010) Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. *Biotechnol Lett* 32: 1019–1030.
4. Ren Y, Rivera JG, He L, Kulkarni H, Lee DK, et al. (2011) Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. *BMC Biotechnol* 11: 63.
5. Idris A, Bukhari A (2012) Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnol Adv* 30: 550–563.
6. Netto CGCM, Andrade LH, Toma HE (2009) Enantioselective transesterification catalysis by *Candida antarctica* lipase immobilized on superparamagnetic nanoparticles. *Tetrahedron: Asymmetry* 20: 2299–2304.

7. Ngo TPN, Li A, Tiew KW, Li Z (2013) Efficient transformation of grease to biodiesel using highly active and easily recyclable magnetic nanobiocatalyst aggregates. *Bioresour Technol* 145: 233–239.
8. Netto CGCM, Toma HE, Andrade LH (2013) Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *J Mol Catal B: Enzym* 85–86: 71–92.
9. Verma ML, Barrow CJ, Puri M (2013) Nanobiotechnology as a novel paradigm for enzyme immobilisation and stabilisation with potential applications in biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 23–39.
10. Prabhavathi Devi BLA, Guo Z, Xu X (2009) Characterization of cross-linked lipase aggregates. *J Am Oil Chem Soc* 86: 637–642.
11. Schoevaert R, Wolbers MW, Golubovic M, Ottens M, Kieboom APG, et al. (2004) Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnol Bioeng* 87: 754–762.
12. Contesini FJ, Figueira JdA, Kawaguti HY, Fernandes PCdB, Carvalho PdO, et al. (2013) Potential applications of carbohydrases immobilization in the food industry. *Int J Mol Sci* 14: 1335–1369.
13. Sheldon RA (2007) Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts. *Biochem Soc Trans* 35: 1583–1587.
14. Sheldon RA (2011) Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Appl Microbiol Biotechnol* 92: 467–477.
15. Sheldon RA, van Pelt S (2013) Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. *Chem Soc Rev* 42: 6223–6235.
16. Talekar S, Ghodake V, Ghotage T, Rathod P, Deshmukh P, et al. (2012) Novel magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of alpha amylase. *Bioresour Technol* 123: 542–547.
17. Talekar S, Joshi A, Joshi G, Kamat P, Haripurkar R, et al. (2013) Parameters in preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *RSC Adv* 3: 12485–12511.
18. Xie W, Ma N (2009) Immobilized lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production. *Energy Fuels* 23: 1347–1353.
19. Xie W, Ma N (2010) Enzymatic transesterification of soybean oil by using immobilized lipase on magnetic nano-particles. *Biomass Bioenergy* 34: 890–896.
20. Wang X, Dou P, Zhao P, Zhao C (2009) Immobilization of lipases onto magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for application in biodiesel production. *ChemSusChem* 2: 947–950.
21. Han JY, Kim HK (2011) Transesterification using the cross-linked enzyme aggregate of *Photobacterium lipolyticum* lipase M37. *J Microbiol Biotechnol* 21: 1159–1165.
22. Lai J-Q, Hu ZL, Sheldon RA, Yang Z (2012) Catalytic performance of cross-linked enzyme aggregates of *Penicillium expansum* lipase and their use as catalyst for biodiesel production. *Process Biochem* 47: 2058–2063.
23. Cruz-Izquierdo Á, Picó EA, Anton-Helas Z, Boeriu CG, Llana MJ, et al. (2012) Lipase immobilization to magnetic nanoparticles: methods, properties and applications for biobased products. *New Biotechnol* 29S: S100–S101.
24. Tudorache M, Nae A, Coman S, Parvulescu V (2013) Strategy of cross-linked enzyme aggregates onto magnetic particles adapted to the green design of biocatalytic synthesis of glycerol carbonate. *RSC Adv* 3: 4052–4058.
25. Morales MdP, Veintemillas-Verdaguer S, Montero MI, Serna CJ, Roig A, et al. (1999) Surface and internal spin canting in  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. *Chem Mater* 11: 3058–3064.
26. Shen X-C, Fang X-Z, Zhou Y-H, Liang H (2004) Synthesis and characterization of 3-aminopropyltriethoxysilane-modified superparamagnetic magnetite nanoparticles. *Chem Lett* 33: 1468–1469.
27. Liu ZL, Liu YJ, Yao KL, Ding ZH, Tao J, et al. (2002) Synthesis and magnetic properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *J Mater Synth Process* 10: 83–87.
28. del Campo A, Sena T, Lellouche J-P, Bruce IJ (2005) Multifunctional magnetite and silica-magnetite nanoparticles: synthesis, surface activation and applications in life sciences. *J Magn Magn Mater* 293: 33–40.

29. Mateo C, Fernández-Lorente G, Abian O, Fernández-Lafuente R, Guisán JM (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.
30. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
31. Gao L, Xu J-H, Li X-J, Liu Z-Z (2004) Optimization of *Serratia marcescens* lipase production for enantioselective hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31: 525–530.
32. Holčapek M, Jandera P, Fischer J, Prokeš B (1999) Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. *J Chromatogr A* 858: 13–31.
33. Samakawa T, Kaieda M, Matsumoto T, Ban K, Kondo A, et al. (2000) Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. *J Biosci Bioeng* 90: 180–183.
34. Nakamura K, Handa S (1984) Coomassie brilliant blue staining of lipids on thin-layer plates. *Anal Biochem* 142: 406–410.
35. Harris LA, Goff JD, Carmichael AY, Riffle JS, Harburn JJ, et al. (2003) Magnetite nanoparticle dispersions stabilized with triblock copolymers. *Chem Mater* 15: 1367–1377.
36. Sahoo Y, Goodarzi A, Swihart MT, Ohulchanskyy TY, Kaur N, et al. (2005) Aqueous ferrofluid of magnetite nanoparticles: Fluorescence labeling and magnetophoretic control. *J Phys Chem* 109: 3879–3885.
37. Lee J, Na HB, Kim BC, Lee JH, Lee B, et al. (2009) Magnetically-separable and highly-stable enzyme system based on crosslinked enzyme aggregates shipped in magnetite-coated mesoporous silica. *J Mater Chem* 19: 7864–7870.
38. Ramirez LP, Landfester K (2003) Magnetic polystyrene nanoparticles with a high magnetite content obtained by miniemulsion processes. *Macromol Chem Phys* 204: 22–31.
39. Maity D, Agrawal DC (2007) Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. *J Magn Magn Mater* 308: 46–55.
40. Bayramoğlu G, Kiralp S, Yilmaz M, Toppare L, Arica MY (2008) Covalent immobilization of chloroperoxidase onto magnetic beads: Catalytic properties and stability. *Biochem Eng J* 38: 180–188.
41. Yong Y, Bai YX, Li YF, Lin L, Cui YJ, et al. (2008) Preparation and application of polymer-grafted magnetic nanoparticles for lipase immobilization. *J Magn Magn Mater* 320: 2350–2355.
42. Huang SH, Liao MH, Chen DH (2003) Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles. *Biotechnol Progr* 19: 1095–1100.
43. Sohn OJ, Kim CK, Rhee JI (2008) Immobilization of glucose oxidase and lactate dehydrogenase onto magnetic nanoparticles for bioprocess monitoring system. *Biotechnol Bioprocess Eng* 13: 716–723.
44. Gupta P, Dutt K, Misra S, Raghuvanshi S, Saxena RK (2009) Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosus* using glutaraldehyde. *Bioresour Technol* 100: 4074–4076.
45. Fernández-Lorente G, Palomo JM, Mateo C, Munilla R, Ortiz C, et al. (2006) Glutaraldehyde cross-linking of lipases adsorbed on aminated supports in the presence of detergents leads to improved performance. *Biomacromolecules* 7: 2610–2615.
46. Fernández-Lorente G, Palomo JM, Cabrera Z, Fernández-Lafuente R, Guisán JM (2007) Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. *Biotechnol Bioeng* 97: 242–250.
47. Liu Y-Y, Xu J-H, Hu Y (2000) Enhancing effect of Tween-80 on lipase performance in enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester. *J Mol Catal B Enzym* 10: 523–529.
48. López-Serrano P, Cao L, van Rantwijk F, Sheldon RA (2002) Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotechnol Lett* 24: 1379–1383.
49. Dizge N, Keskinler B (2008) Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. *Biomass Bioenergy* 32: 1274–1278.

50. **Azúcar L, Ciudad G, Heipieper HJ, Muñoz R, Navia R** (2010) Improving fatty acid methyl ester production yield in a lipase-catalyzed process using waste frying oils as feedstock. *J Biosci Bioeng* 109: 609–614.
51. **Charpe TW, Rathod VK** (2011) Biodiesel production using waste frying oil. *Waste Manage* 31: 85–90.
52. **Iso M, Chen B, Eguchi M, Kudo T, Shrestha S** (2001) Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J Mol Catal B Enzym* 16: 53–58.
53. **Mendes AA, Giordano RC, Giordano RdLC, Castro HFd** (2011) Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. *J Mol Catal B: Enzym* 68: 109–115.
54. **López C, Cruz-Izquierdo A, Picó EA, García-Bárcena T, Villarroel N, et al.** (2014) Magnetic biocatalysts and their uses to obtain biodiesel and biosurfactants. *Front Chem* 2: 72.
55. **Agarwal PK, Schultz C, Kalivretenos A, Ghosh B, Broedel SE** (2012) Engineering a hyper-catalytic enzyme by photoactivated conformation modulation. *J Phys Chem Lett* 3: 1142–1146.