



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea



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



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA

---

# TRABAJO FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

---

Propiedades catalíticas de la lipasa B de  
*Candida antarctica* inmovilizada en  
soportes magnéticos. Actividad  
hidrolítica en medios acuosos.

Alumno/a: *Díaz Ramírez, Julen*

Fecha: Junio 2014

**Director/a**  
*Dra. María Jesús Llama Fontal*

**Curso Académico**  
*2013/14*

## SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS EMPLEADOS

<b>APTS</b>	Aminopropiltriétoxissilano
<b>CALB</b>	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>
<b>CLEA</b>	Agregados de enzimas entrecruzados
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DRX</b>	Difracción de rayos X
<b>H</b>	Fuerza del campo magnético aplicado
<b>H<sub>c</sub></b>	Coercitividad
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>mCLEA</b>	CLEA magnéticas
<b>MNP</b>	Nanopartículas magnéticas
<b>MNP-NH<sub>2</sub></b>	MNP con grupos amino en la superficie
<b>MNP-OH</b>	MNP con grupos hidroxilo en la superficie
<b>M<sub>r</sub></b>	Remanencia magnética
<b>M<sub>s</sub></b>	Saturación magnética
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino 150 mM, pH 7,4
<b>pNPA</b>	<i>para</i> -nitrofenil acetato
<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>U</b>	Unidad de actividad enzimática (μmoles/min)
<b>v/v</b>	Volumen/volumen
<b>V<sub>Max</sub></b>	Velocidad máxima

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
1.1 Cinética enzimática.....	4
1.2 Inmovilización enzimática.....	8
1.3 Inmovilización en nanopartículas magnéticas.....	10
1.3.1 Ferromagnetismo.....	10
1.3.2 Paramagnetismo.....	10
1.3.3 Superparamagnetismo.....	12
1.3.4 Síntesis de MNP.....	13
1.4 Lipasas.....	14
1.5 Objetivos.....	16
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
2.1 Reactivos y productos.....	17
2.2 Síntesis de nanopartículas.....	17
2.3 Caracterización de nanopartículas.....	18
2.3.1 Caracterización morfológica.....	18
2.3.2 Caracterización magnética.....	19
2.3.3 Tamaño del núcleo magnético.....	19
2.4 Inmovilización de lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en MNPs.....	20
2.5 Determinación de la actividad enzimática.....	21
2.5.1 Agitación mecánica en brazo rotatorio.....	22
2.5.2 Agitación magnética.....	23
2.5.3 Agitación en sonorreactor.....	24
2.5.4 Actividad enzimática del enzima libre.....	24
2.6 Comparación entre enzima inmovilizada y enzima libre.....	24
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>25</b>
3.1 Caracterización de nanopartículas.....	25
3.1.1 Caracterización morfológica.....	25

3.1.2 Caracterización magnética.....	27
3.2 Actividad enzimática.....	29
3.2.1 Comparación agitaciones.....	29
3.2.2 Comparación temperaturas.....	32
3.2.3 Actividad enzima libre.....	33
3.2.4 Comparación entre enzima inmovilizada y enzima libre.....	34
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>35</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>36</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Los enzimas son piezas fundamentales en el correcto funcionamiento de cualquier sistema biológico. Gracias a su naturaleza proteica y a las estructuras tridimensionales complejas que son capaces de adoptar, estas moléculas actúan como catalizadores de reacciones químicas. La función de los enzimas es disminuir la energía de activación de la reacción, aumentando de este modo la velocidad de reacción. Los enzimas no alteran el balance energético de las reacciones en que intervienen, ni modifican, por lo tanto, el equilibrio de la reacción. Por este motivo, en las reacciones catalizadas por enzimas se observa una mayor rapidez a la hora de alcanzar el equilibrio.

La ciencia que estudia la velocidad de las reacciones químicas que son catalizadas por enzimas es la cinética enzimática, en la cual, las moléculas sobre las que actúan los enzimas se denominan sustratos y las moléculas resultantes de la conversión productos. El estudio de la cinética de un enzima permite explicar los detalles de su mecanismo catalítico, su papel en el metabolismo o incluso cómo se controla su actividad en la célula.

Las dos propiedades más importantes a la hora de trabajar con enzimas son: el tiempo que tarda en saturarse con un sustrato en particular y la velocidad máxima de reacción que puede alcanzar. Para el estudio de estas propiedades en el laboratorio se realizan los ensayos enzimáticos. El procedimiento a seguir en estos casos es medir la aparición de un producto o la desaparición de un sustrato frente al tiempo. Para ello se utilizan técnicas como la espectrofotometría que detecta los cambios en la absorbancia de las muestras a analizar. Los datos se representan gráficamente de manera que se obtiene una curva asintótica cuya pendiente es la velocidad inicial de la reacción (figura 1). La forma de la curva viene derivada de la disminución progresiva del sustrato o de las condiciones en las que se da la reacción.

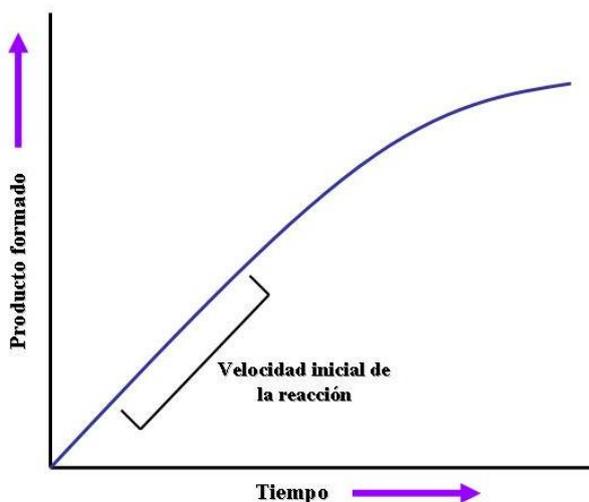


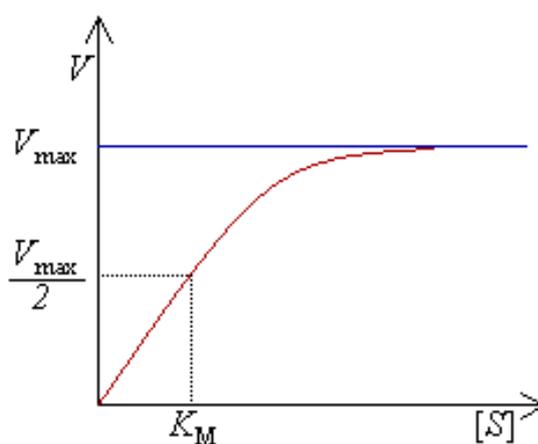
Figura 1. Curva de progreso de una reacción enzimática.

Otra de las consideraciones más remarcables en la cinética enzimática son los distintos factores físico-químicos que puedan modificar la actividad del enzima. Entre estos factores destacan la temperatura, el pH y la concentración salina. Al ser de naturaleza proteica, el enzima tendrá una temperatura crítica donde la molécula se desnaturizará e irá perdiendo progresivamente su actividad catalítica. Del mismo modo, a medida que aumenta la temperatura y hasta llegar a la temperatura crítica la actividad catalítica tenderá a subir.

Las variaciones en el pH influyen en la carga de los aminoácidos que componen los enzimas. Esto afecta a la estructura proteica y deriva en cambios en la actividad enzimática. Los enzimas suelen tener un rango óptimo de pH que puede ser distinto de un enzima a otro. Al igual que el pH la concentración salina también influye en la carga y estructura del enzima por lo que también resulta crucial en la cinética enzimática.

Como ya se ha mencionado con anterioridad, las reacciones catalizadas por enzimas son saturables, con lo que al aumentar la concentración de sustrato la velocidad de catálisis no muestra un comportamiento lineal en su representación gráfica. Al aumentar la concentración de sustrato, llega un momento en que el enzima se satura de sustrato y alcanza su velocidad máxima ( $V_{max}$ ), que no sobrepasará en ningún caso, independientemente de la concentración de sustrato.

Para el mecanismo de unión de un único sustrato para una reacción enzimática, como es el caso de este proyecto, generalmente se suele seguir el modelo de Michaelis-Menten. Según este modelo, a bajas concentraciones de sustrato, el enzima permanece en un equilibrio constante entre la forma libre y el complejo enzima-sustrato. Esto se debe a que la velocidad, en estas condiciones, es mucho más sensible a pequeños cambios en la  $[S]$ . Sin embargo, a altas concentraciones de sustrato, el enzima se satura y solamente queda la forma unida al sustrato (figura 2).



**Figura 2. Representación gráfica de la curva de saturación de un enzima,** donde se puede observar cómo evoluciona la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad de la reacción.

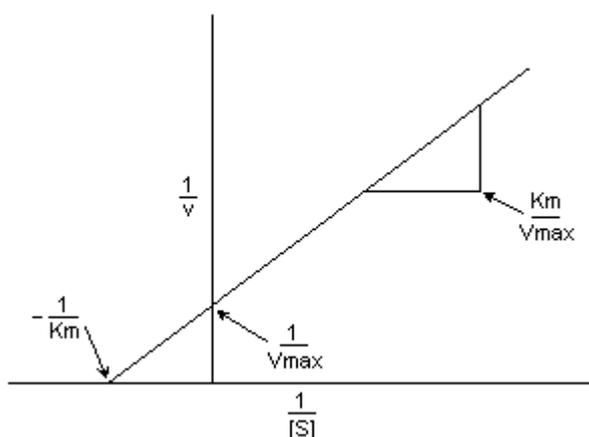
La relación entre la velocidad de la reacción y la concentración de sustrato representada en el gráfico se muestra mediante la ecuación de Michaelis-Menten. Esta ecuación es la base de la mayoría de las cinéticas enzimáticas monosustrato.

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

La constante de Michaelis  $K_m$  se define como la concentración a la que la velocidad de la reacción enzimática es la mitad de la  $V_{max}$ . Asimismo,  $V_{max}$  se define como la velocidad máxima de una reacción a una concentración de enzima determinada.

Aunque a bajas concentraciones de sustrato se mantenga lineal, se va curvando a medida que aumenta la concentración de sustrato. Al no ser lineal, no resulta fácil estimar los parámetros cinéticos directamente del gráfico. Esto dio lugar a que varios investigadores concentraran sus esfuerzos en desarrollar formas lineales de la ecuación de Michaelis-Menten, dando como resultado la gráfica de Lineweaver-Burk o doble recíproca. En este tipo de representación, se toman los valores inversos a ambos lados de la ecuación de Michaelis-Menten dando como resultado una línea recta (ecuación 2). De los puntos de corte y de la pendiente de la línea recta se pueden determinar los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  (figura 3).

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2)$$



**Figura 3. Representación de Lineweaver-Burk o doble recíproca** a partir de los valores inversos de la ecuación de Michaelis-Menten.

El hecho de conocer los parámetros cinéticos de  $K_m$  y  $V_{max}$  es de gran importancia porque permite explicar cómo funciona un enzima, además de predecir cómo se comportará ese enzima *in vivo*, ya que  $K_m$  y  $V_{max}$  son los pilares fundamentales a la hora de intentar comprender el funcionamiento de las enzimas en el control del metabolismo.

Con todo, dominando bien la cinética de los enzimas y jugando con su versatilidad metabólica el estudio de los enzimas puede resultar muy práctico para la industria. El

primer competidor de la catálisis enzimática en el sector industrial es la catálisis química, aún así el uso de enzimas ofrece multitud de ventajas. En primer lugar, mediante la catálisis enzimática se pueden dar reacciones que de otra forma no serían viables. En segundo lugar, los enzimas ofrecen especificidad tanto posicional como por el sustrato. Además, estas moléculas de naturaleza proteica permiten trabajar en condiciones menos agresivas para el reactor y disminuyen el número de etapas necesarias para llevar a cabo el proceso. Para finalizar con las ventajas de la utilización de los enzimas en procesos industriales hay que tener en cuenta la ingeniería genética, que permite obtener el enzima en grandes cantidades, y la inmovilización.

## 1.2 INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA

La inmovilización enzimática es una técnica que actualmente se encuentra en pleno auge, principalmente por la estabilidad y la alta tasa de reutilización que permite. El hecho de inmovilizar un enzima supone una restricción artificial de la movilidad del biocatalizador por medios físicos o químicos. En la tabla que se muestra a continuación se muestran las ventajas y limitaciones de la inmovilización de enzimas (tabla 1).

Tabla 1. Ventajas y limitaciones de la inmovilización enzimática.

Ventajas	Limitaciones
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Aumenta la estabilidad del enzima</li> <li>✓ Permite la reutilización</li> <li>✓ Mayor facilidad para separar el producto</li> <li>✓ Mayor control de la transformación</li> <li>✓ Permite reacciones en continuo y reacciones multietapas, donde se combinan varios enzimas</li> <li>✓ Disminuye la inmunogenicidad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✗ Disminuye la actividad como resultado de la inmovilización</li> <li>✗ Posibles problemas de difusión y transferencia de masa</li> <li>✗ Posible modificación de las propiedades catalíticas</li> <li>✗ Incremento del precio</li> </ul>

Existen varios métodos de inmovilización de enzimas y se clasifican en los siguientes cuatro grupos: adsorción, unión covalente, atrapamiento y microencapsulación o encapsulamiento en membranas. Los últimos dos métodos requieren de una retención física mientras que los primeros dos se dan mediante uniones químicas. La elección de la técnica de inmovilización más adecuada en cada caso, depende del tipo de catálisis requerida, de las características cinéticas y estructurales del enzima, de la toxicidad de los agentes, de los costes del método y de las propiedades que se desean dar al nuevo catalizador. Cabe destacar que no existe un método universal para la inmovilización y es que varía mucho en función de los objetivos.

En muchas ocasiones el microencapsulamiento y el atrapamiento se descartan por su coste relativamente alto y su manejabilidad. La adsorción, a pesar de ser un método que no provoca cambios en el enzima (Brady y Jordaan, 2009), suele ser descartado porque sus débiles interacciones son notablemente sensibles a la temperatura o pH. Debido a esto, la técnica que se ha usado en este proyecto es la unión covalente combinada con el entrecruzamiento entre enzimas.

La unión covalente es la técnica donde más se ha avanzado en los últimos años (Brady y Jordaan, 2009), debido a que sus fuertes uniones son más resistentes ante condiciones adversas. Consiste en la unión entre grupos funcionales de aminoácidos del enzima, con un soporte también funcionalizado. Estas uniones se dan mediante agentes entrecruzantes como el glutaraldehído, una molécula bifuncional que forma bases de Schiff entre sus aldehídos y los grupos amino de aminoácidos como lisina y el soporte (Hermanson, 2008). Para una mayor estabilidad, las bases de Schiff se reducen, generalmente, con  $\text{NaBH}_4$  a pH alcalino (Bayliss y Adams, 1979). El entrecruzamiento se puede dar también entre las mismas enzimas de manera que se formen agregados o CLEAs (Cross-Linked Enzyme Aggregates).

Existen varias consideraciones a la hora de aplicar el método de inmovilización por unión covalente. Para empezar, la unión debe darse de manera que no entorpezca la interacción entre sustrato y centro activo. No sólo eso, se debe evitar que la inmovilización produzca un cambio conformacional en el enzima volviéndolo inactivo. Por último, las condiciones experimentales del proceso en ningún caso

pueden causar la desnaturalización o desactivación del enzima. Por lo tanto, lo conveniente es encontrar un equilibrio entre sencillez, precio y estabilidad. Para ello, en esta investigación se han utilizado nanopartículas magnéticas (MNP).

### **1.3 INMOVILIZACIÓN EN NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS**

El magnetismo ofrece ciertas propiedades interesantes a la hora del trabajar en el laboratorio, debido a que actúa de forma selectiva sobre algunos materiales sin producir ningún efecto sobre el resto. A esto hay que sumarle que su alta manejabilidad permite la recuperación del material magnético de cualquier muestra con relativa facilidad.

#### **1.3.1 Ferromagnetismo**

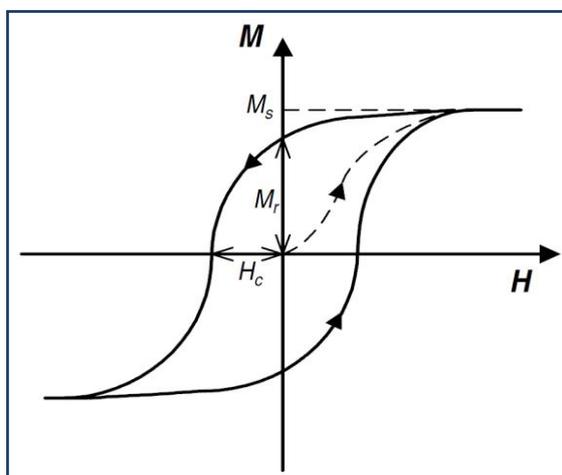
En función de la distribución de spines y de la respuesta ante la aplicación de un campo magnético, existen distintos tipos de materiales. Los materiales ferromagnéticos están divididos en dominios magnéticos y dentro de cada dominio los spines están orientados en una dirección. Al aumentar la intensidad del campo magnético (H) todos los spines se orientan a un mismo sentido formando un monodominio. Al retirar el H de estos materiales el monodominio se mantiene durante cierto tiempo, de manera que queda imantado. Por encima de una temperatura dada (que depende de la composición del material), este se comporta como un compuesto paramagnético. Esta temperatura es la temperatura de Curie ( $T_c$ ).

#### **1.3.2 Paramagnetismo**

El paramagnetismo es la tendencia de los spines a alinearse paralelamente a un campo magnético. Cuando no existe ningún campo magnético externo, estos spines están orientados al azar. En presencia de un campo magnético externo tienden a alinearse paralelamente al campo, pero esta alineación está contrarrestada por la tendencia que tienen los spines a orientarse aleatoriamente debido al movimiento térmico. En el paramagnetismo el campo magnético actúa de forma independiente sobre cada spin, y no hay interacción entre ellos. Los materiales paramagnéticos son

materiales atraídos por imanes, pero no se convierten en materiales permanentemente magnetizados a diferencia de los materiales ferromagnéticos.

Esta magnetización residual que presentan los materiales ferromagnéticos se debe al fenómeno de la histéresis, que es la tendencia de un material a conservar una de sus propiedades en ausencia del estímulo que lo ha generado. Mediante distintos ciclos de histéresis a temperaturas constantes y representando la magnetización ( $M$ ) en función del campo magnético ( $H$ ) aplicado, se pueden estimar propiedades como la remanencia ( $M_r$ ), saturación magnética ( $M_s$ ) o coercitividad ( $H_c$ ) (figura 4).



**Figura 4. Ciclo de histéresis donde se representa la magnetización de un material en función del campo magnético aplicado.**

La magnetización de un material hace referencia al momento magnético por unidad de volumen. La remanencia ( $M_r$ ), es el magnetismo residual tras retirar el campo magnético. De este modo, cuanto más ferromagnético sea el material mayor será la remanencia. Otra propiedad es la saturación magnética ( $M_s$ ), es decir, la magnetización a la cual todos los spins están orientados en un mismo sentido. Para terminar con las propiedades más destacables está la coercitividad ( $H_c$ ), que hace referencia al campo magnético en sentido contrario necesario para anular el magnetismo remanente.

### 1.3.3 Superparamagnetismo

A medida que va disminuyendo el tamaño de los materiales, el comportamiento de los átomos que los componen muestra diferentes propiedades a las que originalmente tenían en un tamaño macroscópico. Las propiedades que cambian con la reducción de tamaño son de tipo morfológico, térmico, óptico, mecánico y electromagnético (Schmid, 2004). Para este trabajo en el que se inmovilizan proteínas a MNP, las propiedades que más interesan son las electromagnéticas.

Esta aparición de nuevas propiedades se refleja en la aparición del fenómeno del superparamagnetismo en materiales ferromagnéticos inferiores a los 10nm. El superparamagnetismo fue acuñado por primera vez por Bean y Livingston (Bean y Livingston, 1959) y es un comportamiento magnético con algunas características del ferromagnetismo y otras del paramagnetismo. Los materiales superparamagnéticos se comportan como un elemento paramagnético por debajo de la temperatura de Curie. El material tiene la capacidad de no quedarse magnetizado, es decir, su curva de histéresis no sería una histéresis clásica, ya que son nulas la coercitividad y la remanencia (figura 5). Esto ocurre de manera teórica, pero siempre quedará un mínimo de dichas propiedades.

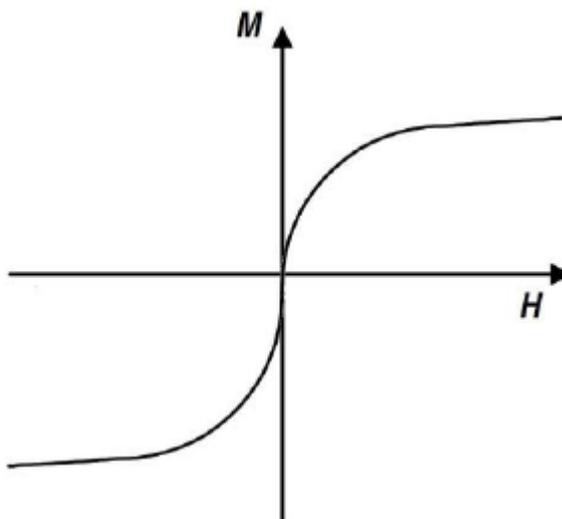


Figura 5. Curva típica de histéresis de un material superparamagnético.

El superparamagnetismo está muy asociado al tiempo de relajación de la magnetización, y es que cuanto más pequeño sea menos tiempo habrá para inducir el cambio de spin en los dominios magnéticos vecinos.

La temperatura también influye en el tiempo de relajación, a mayor temperatura menor tiempo de relajación. Pero, en este caso, por encima de  $T_c$  la energía térmica es tan grande que impide la orientación de todos los spines en un mismo sentido, por lo que desaparece la magnetización. A esto hay que sumarle la temperatura de bloqueo, por debajo de la cual aparece el ferromagnetismo. Para medir la magnetización existen distintos dispositivos o técnicas tales como SQUID (Dispositivo superconductor de interferencia cuántica) o VSM (Magnetometría de muestra vibrante).

#### 1.3.4 Síntesis de MNP

Teniendo en cuenta todos los factores mencionados el método seleccionado durante el desarrollo de este trabajo para sintetizar MNPs es el método químico por coprecipitación de sales de hierro, (Massart, 1981), que es el más habitualmente empleado en biotecnología (Cabrera *et al.*, 2008).

Al sintetizar MNP por coprecipitación de sales de hierro se forman nanopartículas de óxidos de hierro. Los óxidos más comunes que se originan son magnetita ( $Fe_3O_4$ ) y maghemita ( $\gamma-Fe_2O_3$ ), pero interesa obtener magnetita ya que al tener una  $M_s$  mayor, tendrá una mejor respuesta al campo magnético. Por este motivo, hay que evitar la oxidación de magnetita a maghemita eliminando el oxígeno del medio, mediante un burbujeo con  $N_2$ .

Si la coprecipitación de Fe(II) y Fe(III) se realiza en presencia de hidróxido amónico se consigue que las nanopartículas presenten grupos hidroxilo superficiales de gran importancia para su posterior funcionalización (Morales *et al.*, 1999, Li *et al.*, 2010). En este trabajo, esta funcionalización se ha realizado aportando grupos reactivos amino a la superficie.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en este proyecto se ha realizado una inmovilización covalente combinada con el entrecruzamiento entre enzimas. Es decir, nanopartículas entrecruzadas con enzima precipitado y éstas a su vez

entrecruzadas entre sí. Con esto y según trabajos realizados con anterioridad en este grupo, se consigue una herramienta muy estable y fácil de recuperar para una posible reutilización.

#### 1.4 LIPASAS

El enzima con el que se ha trabajado es una lipasa (EC 3.1.1.3), las lipasas son enzimas ubicuas presentes en todo tipo de seres vivos (Montero *et al.*, 1993). Su función biológica es la hidrólisis de ésteres, especialmente utilizan como sustrato triacilglicéridos de cadena larga, y producen glicerol, ácidos grasos libres, di- y mono-acilglicéridos. La mayoría de lipasas microbianas tienen un máximo de actividad en un intervalo de pH entre 6,6 y 8,5, con un máximo de estabilidad a pH neutro. Respecto a la temperatura, la mayoría son muy activas entre 30 °C y 40 °C (Malcata *et al.*, 1992).

Además, también son capaces de catalizar en el medio adecuado otro tipo de reacciones, como esterificaciones, transesterificaciones y aminólisis (Malcata *et al.*, 1992; Villeneuve *et al.*, 2000). Esta variedad de reacciones son muy interesantes desde un punto de vista biotecnológico (Sharma *et al.*, 2001; Hasan *et al.*, 2006). Además, las lipasas están presentes en la mayoría de los campos donde se aplican enzimas: investigación científica, cosméticos, diagnóstico químico, aplicaciones terapéuticas, y catálisis industrial (Sharma *et al.*, 2001). Las lipasas procedentes de bacterias y hongos son las que mayor potencial tienen en la biocatálisis industrial por ser más robustas, más fáciles de producir y más fáciles de recuperar del medio de cultivo (Vakhlu y Kour, 2006). Por este motivo, en este trabajo la lipasa empleada es la lipasa B de *Candida antarctica* (figura 6).

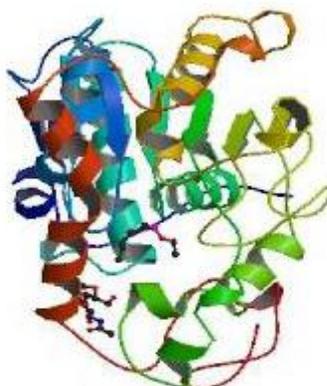


Figura 6. Modelo en tres dimensiones de la lipasa B de *Candida antarctica*

La lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) en disolución, tiene un pH óptimo de actividad de 7 y es estable en el intervalo de pH 3,5-9,5. La temperatura de desnaturalización varía entre 50 °C y 60 °C dependiendo del pH. Cuanto más elevada es la temperatura y más ácido el pH, mayor es el grado de desnaturalización (Anderson *et al.*, 1998). Sin embargo, la estabilidad de CALB aumenta cuando se inmoviliza, siendo capaz de funcionar con disolventes de todo tipo, incluso con los más apolares.

En 1985 Klibanov descubrió que en medios microacuosos había enzimas que mostraban un comportamiento diferente al natural (Zaks y Klibanov, 1985), llevando a catalizar reacciones totalmente distintas a las que acostumbran. Un claro ejemplo es la CALB que es muy conocida por la producción de biodiesel a partir de medios orgánicos. Aun así, el objetivo de este proyecto se centra en el análisis de la capacidad hidrolítica en medios acuosos de CALB. Esto es, la capacidad esterasa que tiene el enzima, con aplicabilidad en cualquier sector relacionado con la eliminación de grasas. Ya se han realizado experimentos previos relacionados en los que se estudia la hidrólisis de tributirina (Fang *et al.*, 2014) o aceite de oliva (Sun *et al.*, 2010). En el caso del hidrólisis del aceite de oliva se utilizó una inmovilización mediante adsorción física a una resina macroporosa. Además, se sabe que esta capacidad hidrolítica podría ser útil en la degradación de poliésteres.

Teniendo en cuenta todo lo mencionado, quizás es la lipasa más empleada en biotecnología, utilizándose sus productos en formulaciones de cosmética, sabores, fragancias, lubricantes y biodiesel (Anderson *et al.*, 1998).

## 1.5 OBJETIVOS

Con anterioridad este grupo de trabajo ya ha demostrado la efectividad en la producción de biodiesel mediante mCLEAs. Estas CLEAs magnéticas están constituidas por agregados de lipasa B de Candida antarctica (CALB) entrecruzadas con nanopartículas magnéticas funcionalizadas con grupos  $-NH_2$ . Con el fin de obtener más información acerca de la inmovilización de CALB y su posterior funcionamiento en medios acuosos se plantean los siguientes objetivos:

- **Obtención de CLEAs de CALB**, síntesis y funcionalización de MNP y posterior inmovilización de CALB.
- **Observación del efecto de la inmovilización de CALB en medios acuosos**, realización de ensayos enzimáticos donde se compara la actividad del enzima libre y del enzima inmovilizado.
- **Determinación de los parámetros cinéticos de la actividad esterasa de CALB** en medios acuosos realizando ensayos enzimáticos a diferentes condiciones.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 REACTIVOS Y PRODUCTOS

En este trabajo se utilizaron los reactivos y productos que aparecen en la Tabla 2.

**Tabla 2. Reactivos y productos empleados.** Se indica el proveedor, así como la ciudad y el país de origen.

<b>Casa comercial</b>	<b>Productos</b>
<b>Ciudad, País</b>	
<b>Merck</b>	Bicarbonato sódico
<b>Darmstadt, Alemania</b>	Carbonato sódico
	Cloruro sódico
	Glutaraldehído
	Sulfato amónico
<b>Quimivita</b>	Hidróxido amónico
<b>Barcelona, España</b>	
<b>Sigma-Aldrich</b>	Aminopropiltriethoxisilano (APTS)
<b>St. Louis, MO, EEUU</b>	Borohidruro de sodio
	Cloruro férrico
	Cloruro ferroso
	Dimetilsulfóxido (DMSO)
	Hidróxido amónico
	<i>p</i> -Nitrofenil acetato (pNPA)
	Tritón X-100

### 2.2 SÍNTESIS DE NANOPÁRTICULAS

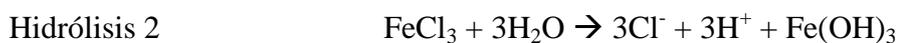
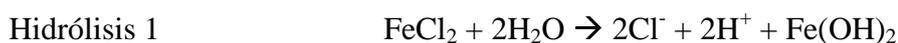
Se bombearon, a un caudal de 5 ml/min, 50 ml de la disolución compuesta por FeCl<sub>2</sub> 0,33 M, FeCl<sub>3</sub> 0,66 M sobre 450 ml de NH<sub>4</sub>OH 0,42 M bajo vigorosa agitación mecánica (400 rpm) con varilla de vidrio (Agitador RZR 2102, Heidolph,

Schwabach, Alemania), a temperatura ambiente. Una vez adicionadas las sales de hierro la agitación se mantuvo durante 30 minutos. Los cloruros de hierro se hidrolizan y se forman los hidróxidos que en presencia de amonio coprecipitan formando magnetita.

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 nanopartículas se realizaron con agua ultrapura (Milli Q) y se burbujearon continuamente con gas N<sub>2</sub> para desplazar el O<sub>2</sub>.

Para obtener nanopartículas con grupos amino, las MNP-OH (300 mg) se incubaron con 3-aminopropiltrióxido de silano (APTS, 2% v/v) a 70°C, a 200 rpm, durante 24 h.

Las reacciones que se dan para la formación de magnetita son las siguientes (Răuciu *et al.*, 2009):



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

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

## 2.3 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

### 2.3.1 Caracterización morfológica

La caracterización cristalográfica y la identificación de fases se realizaron con un difractómetro Philips PW 1710. El tamaño del cristalito se calculó a partir de la anchura a media altura de los máximos de difracción empleando la ecuación de Scherrer, dicha ecuación relaciona el ensanchamiento neto del pico de difracción  $B$  con el tamaño de cristalito ( $D$ ):

$$D = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos\theta} \quad (3)$$

donde la constante  $K$  toma el valor de 0,89 al considerar las partículas esféricas;  $\lambda$  es la longitud de onda de la radiación X utilizada (0,54 nm);  $\beta$  es el ensanchamiento neto del pico de difracción expresado en radianes  $2\theta$  pudiéndose determinar a partir de:

$$\beta^2 = \beta_{obs}^2 - \beta_{ins}^2 \text{ (según Warren)} \quad (4)$$

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

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

El tamaño y forma de las nanopartículas se comprobó por microscopía electrónica de transmisión (TEM, JEOL 1010).

### 2.3.2 Caracterización magnética

Se emplearon diferentes equipos para la caracterización magnética de las nanopartículas sintetizadas. Los ciclos de histéresis a 300 K se hicieron mediante magnetometría de muestra vibrante (VSM) en un electroimán hasta campos moderados (0,9 T).

Para el cálculo de la saturación magnética ( $M_s$ ) se utilizaron los datos a 300 K, aunque la saturación magnética se asume que ocurre cuando el alineamiento del dipolo magnético es perfecto, y eso solamente ocurre a 0 K. La coercitividad ( $H_c$ ) y remanencia ( $M_r$ ) también se calcularon a 300 K, ya que el electroimán tiene mejor resolución a 300 K.

### 2.3.3 Tamaño del núcleo magnético

A partir de las curvas de magnetización se puede hacer una aproximación al tamaño del núcleo magnético de las partículas. Empleando las ecuaciones de Langevin se realizó 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:

$$M(H) = M_s \left( \frac{emu}{g} \right) \int_0^\infty L \left( \frac{\mu_0 M_s (Am^{-1}) V H (Am^{-1})}{k_B T} \right) f(D) dD \quad (5)$$

donde  $f(D)$  es la distribución de diámetros de la población de partículas y es una función del tipo log-normal;  $M_s$  (emu/g) imanación de saturación macroscópica a 2 K;  $M_s$  ( $Am^{-1}$ ) la imanación de la partícula;  $\mu_0$  la permeabilidad magnética en el vacío; y  $k_B$  la constante de Boltzmann. El volumen crítico  $V$  se determina para cada temperatura, y está dado por:

$$V_c = \frac{25k_B T}{K} \quad (6)$$

donde  $K$  la constante de anisotropía efectiva.

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

#### 2.4 INMOVILIZACIÓN DE LIPASA DE *Candida antarctica* (CALB) EN MNPs

La inmovilización se realizó mediante la adición de sulfato amónico 3,6 M (2,8 ml) a 300  $\mu$ l de nanopartículas con grupos amino (2 mg) y CALB (2 mg). Tras 5 min se añadió glutaraldehído (248  $\mu$ l de 2,5 M) y se mantuvo la incubación durante 24 h. Después se lavó el material atraído por el imán con PBSx1 durante 10 min en tres ocasiones.

Después 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 con  $NaBH_4$  (1 mg/ml) en tampón carbonato-bicarbonato (100 mM, pH 10) durante 2 horas.

Al terminar el proceso de inmovilización, con el fin de eliminar las 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, las nanopartículas se lavaron con tampón PBSx1 tres veces durante 10 min. De este modo se elimina el enzima que haya quedado libre o posibles residuos.

Todo el proceso de inmovilización se realizó con agitación giratoria a 30 rpm (Intelli-Mixer RM-2) y a temperatura ambiente. El volumen final fue de 1 ml por cada 2 mg de MNP.

## 2.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se realizaron distintos ensayos enzimáticos a partir del sustrato cromogénico *p*-nitrofenil acetato (*p*NPA). El *p*NPA funciona como un éster que al ser hidrolizado por CALB libera *p*-nitrofenol visible mediante un espectrofotómetro a 405 nm (Beckman Coulter DU 800). Se realizaron numerosas medidas con distintas agitaciones a diferentes temperaturas. Los ensayos enzimáticos se llevaban a cabo a una concentración constante de enzima frente a concentraciones variables del sustrato. En concreto, todas las muestras a analizar parten de una solución de mCLEAs de 0,25 mg/ml.

Se prepararon disoluciones seriadas de *p*NPA en DMSO de un 1 ml. La reacción de hidrólisis de *p*NPA se puede dar espontáneamente a medida que aumenta la temperatura o con la exposición a la luz. Además, con la reacción de hidrólisis se libera acetato, lo que acidifica el medio. Esto provoca una pérdida de color en las muestras enmascarando la aparición de *p*-nitrofenol. Para contrarrestar este efecto y que el medio se pudiera mantener más básico se utilizó un tampón de PBSx10.

Es muy importante tener en cuenta las condiciones en las que se va a producir el ensayo y diseñar un blanco. Lo que interesa medir es únicamente el cambio generado por el enzima en el medio.

La aparición de *p*-nitrofenol se iba midiendo en función del tiempo siguiendo el ejemplo de la figura 1. La actividad se calculó a partir de la pendiente de absorbancia empleando el coeficiente de extinción molar determinado empíricamente ( $9,43 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). La duración de los periodos de tiempo entre cada recogida de muestra se establecía en función de la velocidad de reacción.

Con las velocidades iniciales para cada concentración de *p*NPA se realizaron las representaciones de saturación del enzima (figuras 2 y 3) siguiendo el modelo de Michaelis-Menten. De este modo, se estimaron los parámetros cinéticos  $K_m$  ( $\mu\text{mol/ml}$ ) y  $V_{\text{max}}$  (U). Una unidad de actividad (U) es la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1  $\mu\text{mol}$  de *p*NPA por minuto.

Con la aplicación de las regresiones tanto lineal como no lineal de Solver se pudo conocer la diferencia existente entre los valores experimentales obtenidos y los valores teóricos que se deberían obtener.

### **2.5.1 Agitación mecánica en brazo rotatorio**

Los ensayos enzimáticos para determinar los parámetros cinéticos en caso de aplicar una agitación mecánica giratoria en un brazo agitador (ELMI, Intelli-Mixer, RM-2L) se realizaron con muestras de 1 ml. Para cada muestra se utilizaron tres réplicas que contenían:

- ✓ 980  $\mu\text{l}$  de tampón PBSx10
- ✓ 10  $\mu\text{l}$  de disolución de *p*NPA
- ✓ 10  $\mu\text{l}$  de mCLEAs de 0,25mg/ml

Como blanco en el espectrofotómetro se utilizaron muestras con la siguiente composición:

- ✓ 990  $\mu\text{l}$  de tampón PBSx10
- ✓ 10  $\mu\text{l}$  de disolución de *p*NPA

Las muestras se incubaron con la temperatura fijada para cada experimento (30°C y 40°C) y se retiraban para su medición cada diez minutos. Una vez realizada cada medida, las muestras se volvían a incubar con la agitación y temperatura correspondiente.

### 2.5.2 Agitación magnética

Los ensayos enzimáticos para determinar los parámetros cinéticos en caso de aplicar una agitación de forma magnética (Carousel 12 Plus, Radleys, Essex, Reino Unido) se realizaron con soluciones de 5 ml. Manteniendo las proporciones de los ensayos en agitación mecánica, cada solución contenía:

- ✓ 4900  $\mu$ l de tampón PBSx10
- ✓ 50  $\mu$ l de disolución de *p*NPA
- ✓ 50  $\mu$ l de mCLEAs de 0,25 mg/ml

Como blanco se utilizaron soluciones con la siguiente composición:

- ✓ 4950  $\mu$ l de tampón PBSx10
- ✓ 50  $\mu$ l de disolución de *p*NPA

El aparato permitía regular la temperatura a la que se quería realizar la medición y las muestras se fueron recogiendo cada cinco minutos. El volumen final de cada muestra era de 800  $\mu$ l.



Figura 7. Dispositivo de agitación magnética (Carousel 12 Plus, Radleys, Essex, Reino Unido).

### 2.5.3 Agitación en sonorreactor

Los ensayos enzimáticos para determinar los parámetros cinéticos en caso de aplicar una agitación mediante ultrasonidos en un sonorreactor (Hielscher UTR200, Teltow, Alemania), se realizaron con muestras de 1 ml. La composición de las muestras y el blanco era la misma que la de la agitación mecánica. Para cada muestra se prepararon dos réplicas. La prueba se realizó a 30°C y se utilizaron muestras destructivas que se retiraban para su medición cada dos minutos.

### 2.5.4 Actividad enzimática del enzima libre

Tras aplicar una agitación magnética se midió la actividad enzimática para una concentración fija de *p*NPA (0,5 mM) a diferentes temperaturas. Previamente, se preparó una disolución de CALB con la concentración de enzima equivalente a 0,25 mg/ml de CLEAs. Este paso es importante porque por cada miligramo de CLEAs hay 100 µg de enzima. Finalmente, se fueron retirando muestras de 800 µl de una solución de 5 ml que permanecía en el aparato de agitación. La composición de la solución era la siguiente:

- ✓ 4900 µl de tampón PBSx10
- ✓ 50 µl de disolución de *p*NPA
- ✓ 50 µl de disolución CALB en PBSx10 de 0,025 mg/ml

La composición del blanco y el intervalo de tiempo entre mediciones eran los mismos que en los casos de medidas de la actividad bajo agitación magnética.

## 2.6 COMPARACIÓN ENTRE ENZIMA INMOVILIZADA Y LIBRE

Durante 30 minutos se mantuvieron dos disoluciones de 500 µl de enzima inmovilizada (CLEAs 0,25 mg/ml) y enzima libre (CALB 0,025 mg/ml) a 60°C. Después se midió la actividad enzimática de los enzimas de estas disoluciones, también a 60°C. Para ello se repitió el procedimiento llevado a cabo en los ensayos enzimáticos realizados en condiciones de agitación magnética.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

##### 3.1.1 Caracterización morfológica

La caracterización cristalográfica y la identificación de fases se realizaron con un difractómetro y los difractogramas obtenidos, con rendija fija, se muestran en la figura 8.

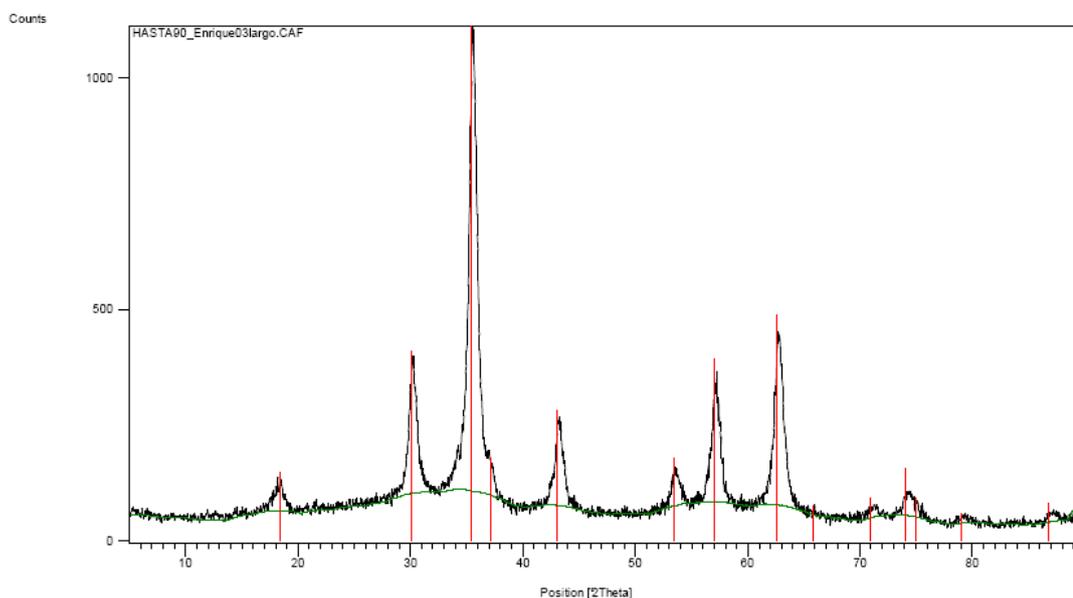


Figura 8A. Difractogramas de MNPs funcionalizadas con grupos hidroxilo.

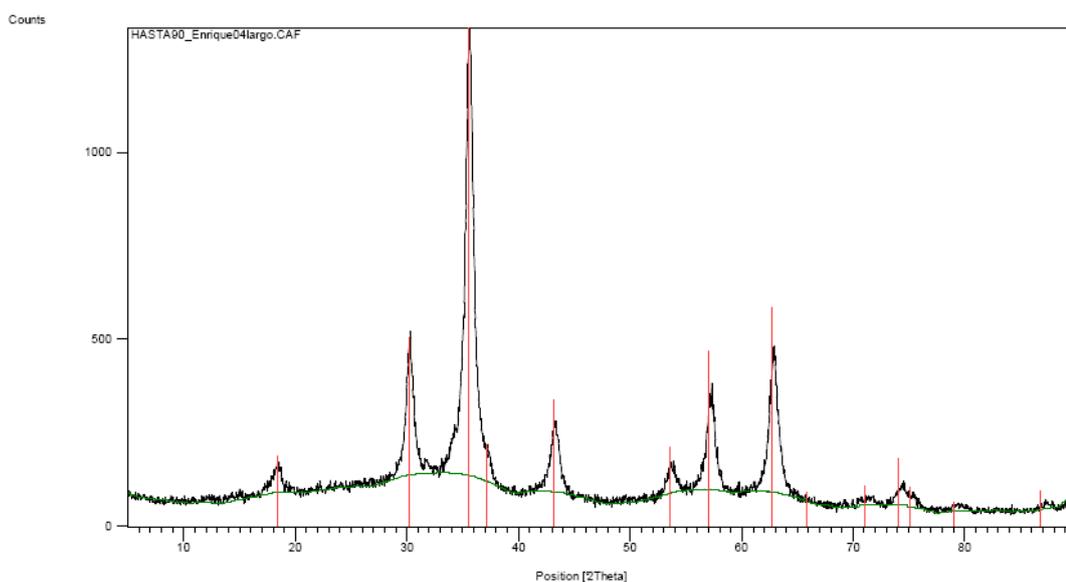


Figura 8B. Difractogramas de MNPs funcionalizadas con grupos amino.

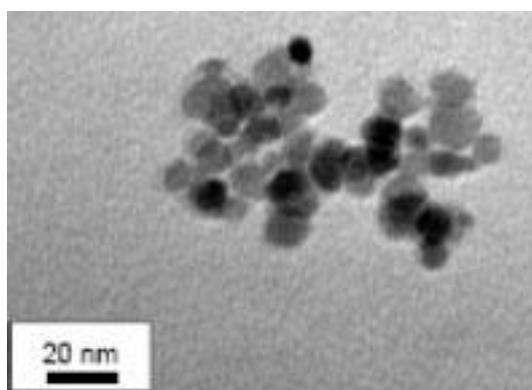
Según la forma de los difractogramas la fase identificada en ambos casos es magnetita  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (óxido doble ferroso-férrico ( $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}\text{O}_4$ )), que cristaliza en un sistema cúbico. Adicionalmente se ha comprobado mediante un imán el carácter fuertemente magnético de la muestra.

Los tamaños de los cristalitas se han obtenido según el ensanchamiento de banda a media altura de los máximos de difracción (figura 8), aplicando la ecuación de Scherrer determinando el ensanchamiento neto del pico según Warren o Scherrer (Tabla 3).

**Tabla 3.** Distribución de tamaños de MNPs obtenidas con grupos hidroxilo y amino.

MNPs	Diámetro (nm) según Scherrer	Diámetro (nm) según Warren	Diámetro medio (nm)	Error estándar (nm)
<b>MNP-OH</b>	9,6	8,7	9,15	$\pm 0,45$
<b>MNP-NH<sub>2</sub></b>	8,9	8,2	8,55	$\pm 0,35$

La forma de las nanopartículas sintetizadas se comprobó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (figura 9). La forma de las nanopartículas era esférica, y se corroboró que el tamaño medio obtenido por difracción era de unos 9 nm.



**Figura 9.** Imágenes obtenidas por TEM de MNPs con grupos hidroxilo.

### 3.1.2 Caracterización magnética

Se realizó la caracterización magnética para nanopartículas funcionalizadas con grupos hidroxilo y grupos amino. Se realizaron curvas de histéresis mostrando un claro comportamiento superparamagnético (figura 10), ya que en ausencia de campo magnético las partículas prácticamente no poseen magnetismo ( $H_c \approx 0$  y  $M_r \approx 0$ ).

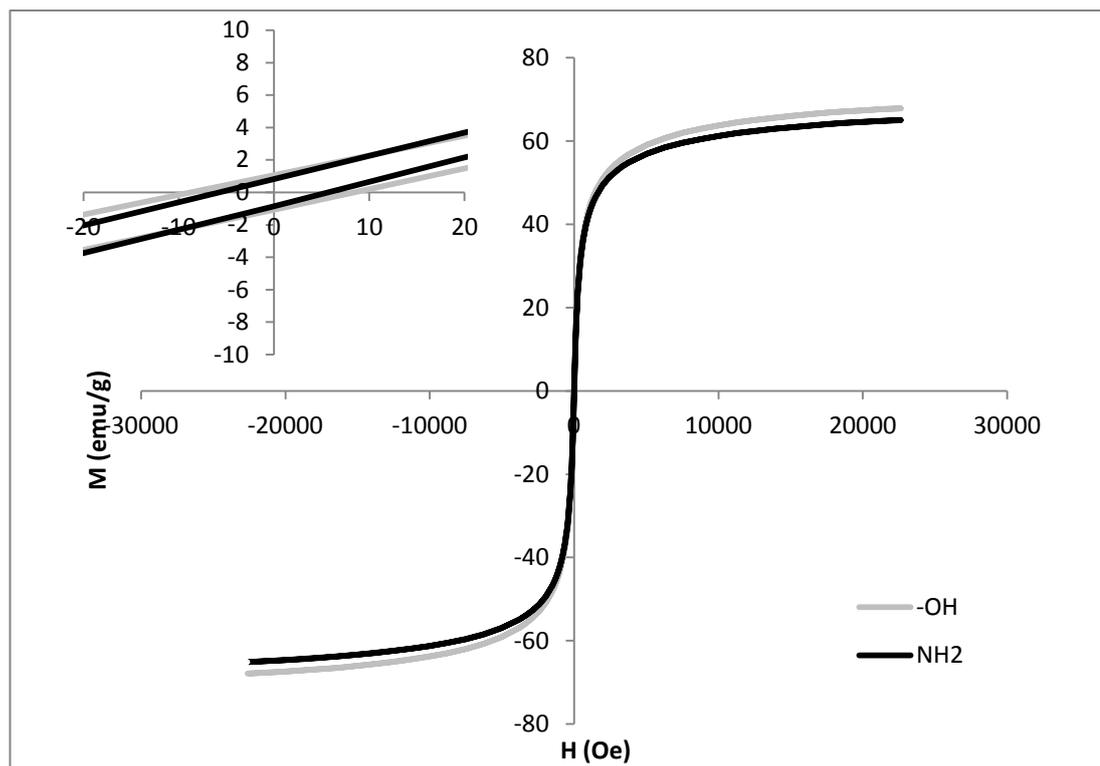


Figura 10. Curvas de histéresis de MNPs con OH y NH<sub>2</sub>. Las curvas de histéresis se realizaron a temperatura ambiente (20°C).

A partir de las curvas de histéresis se obtuvieron diferentes parámetros magnéticos para cada tipo de nanopartícula sintetizado. La magnetita presenta una saturación magnética de 92 emu/g. Sin embargo, las nanopartículas con OH y NH<sub>2</sub> presentan una  $M_s$  de 67,87 emu/g y 65,09 emu/g respectivamente (tabla 4). Esta disminución de la saturación magnética puede deberse a diversos factores, y es que al estar a temperatura ambiente la energía térmica puede influir ligeramente en la orientación de los spines. Otro factor importante es que las MNP-NH<sub>2</sub> tienen APTS en su superficie por lo que la relación magnetita/MNP es menor (Liu *et al.*, 2002) y tienen una mayor cantidad de material orgánico alrededor del núcleo magnético.

Tabla 4. Parámetros magnéticos de las nanopartículas sintetizadas

MNP	$M_s$ (emu/g)	$H_c$ (Oe)	$M_r$ (emu/g)
MNP-OH	67,87	0,28	1,11
MNP-NH <sub>2</sub>	65,09	0,31	0,87

A partir de un ajuste a la función de Langevin, se calculó el diámetro promedio entre los 8,5 y 10,25 nm con una dispersión de 2-3 nm. Una vez más, el tamaño promedio de las MNP sintetizadas se corresponde con los resultados previos obtenidos por DRX.

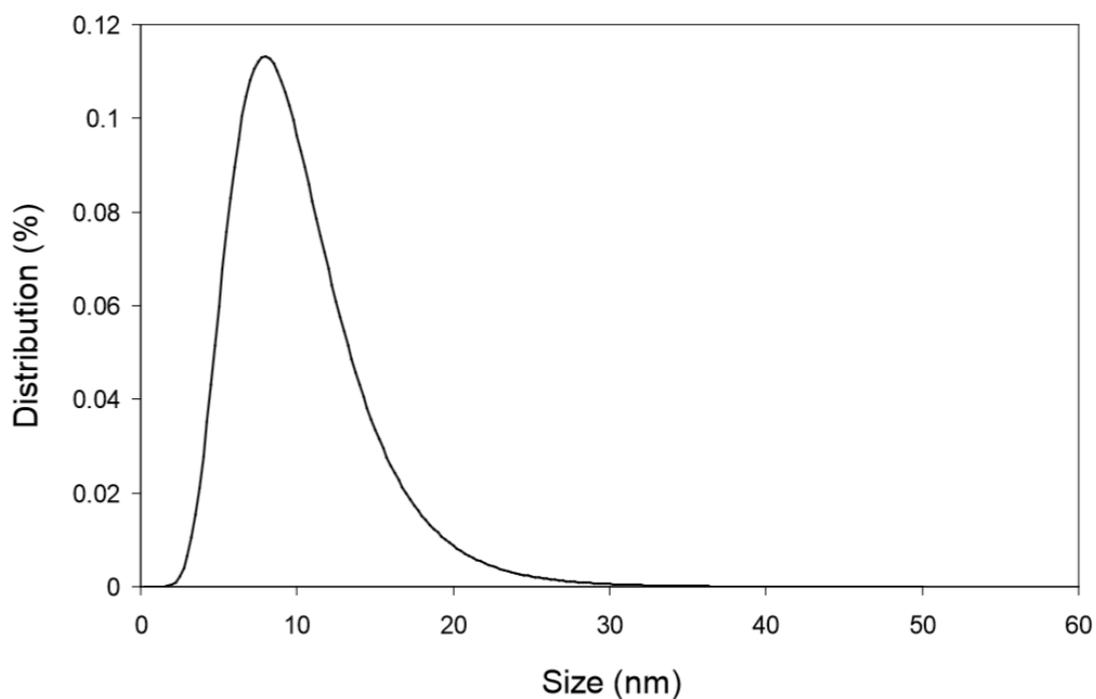


Figura 11. Dispersión de los tamaños de las nanopartículas con grupos amino.

### 3.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

A continuación se muestra un ejemplo de cómo se calculó la actividad enzimática en un ensayo a 30°C, 0,5 mM de *p*NPA y bajo agitación mecánica en brazo rotatorio (figura 12).

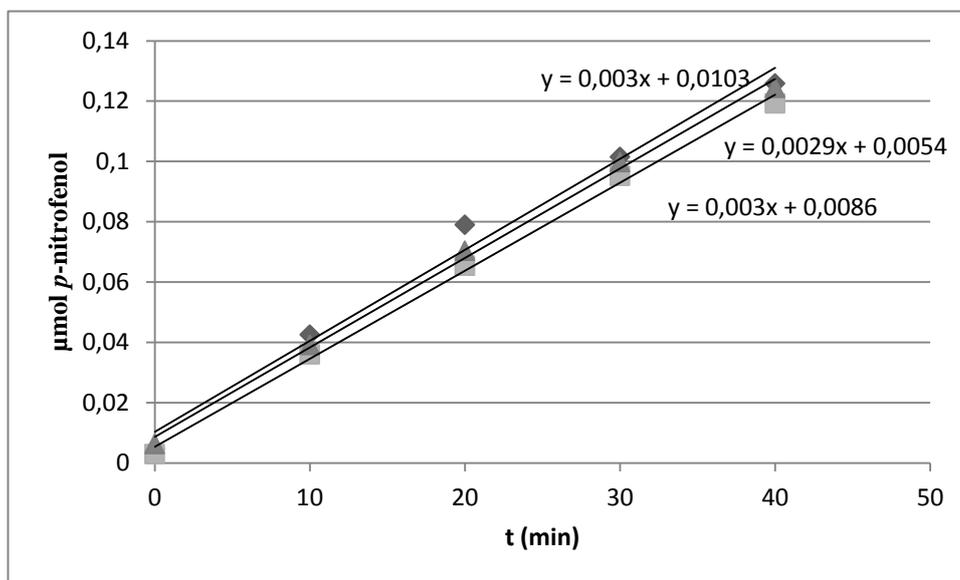
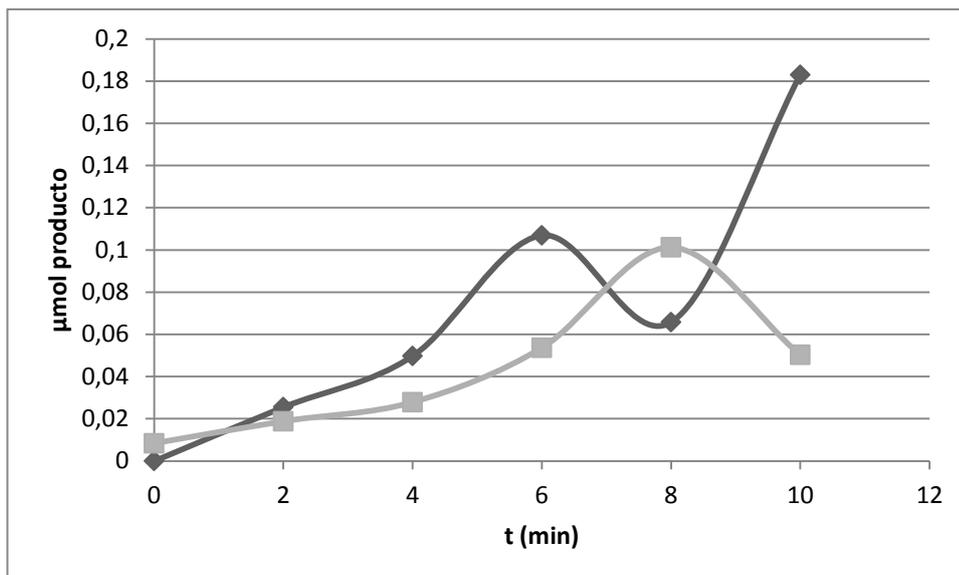


Figura 12. Progreso de reacción enzimática. Aparición de *p*-nitrofenol en función del tiempo.

Haciendo la media entre las tres pendientes se determinó que la actividad enzimática en estas condiciones era de 0,002966 U.

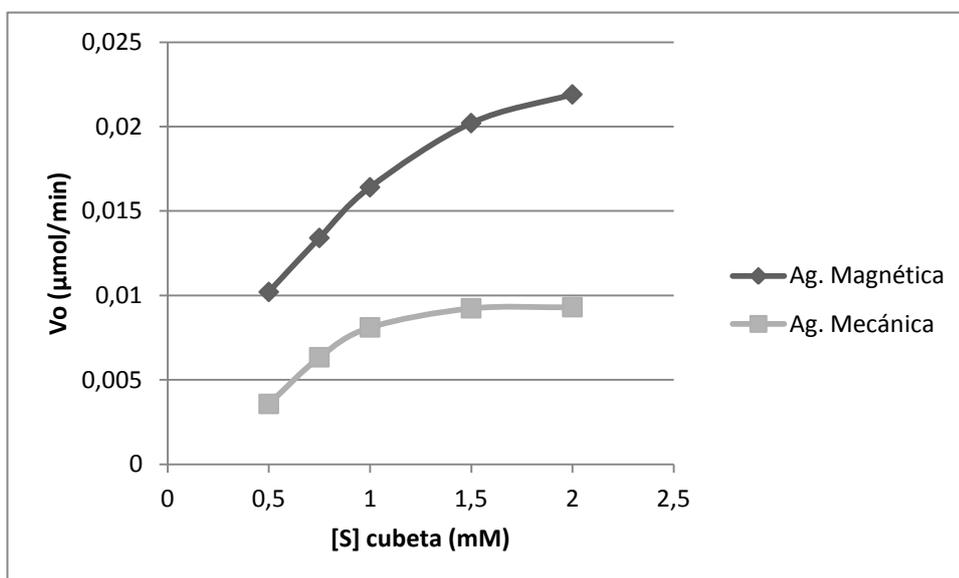
#### 3.2.1 Comparación agitaciones

La agitación mediante ultrasonidos en un sonorreactor se descartó debido a que en las condiciones en las que se realizaban los ensayos no era viable. La rapidez de la reacción imposibilitaba la medición, además, al trabajar con volúmenes tan pequeños el margen de error era muy grande. Como refleja la figura 13 los valores de absorbancia no se ajustan a la curva de saturación de un enzima.



**Figura 13. Representación del progreso de reacción enzimática.** Refleja la aparición de *p*-nitrofenol en función del tiempo en caso de aplicar una agitación con el sonorreactor.

Por lo tanto, la comparación de agitaciones se limitó a la agitación mecánica y a la agitación magnética (figura 14). Todos los ensayos enzimáticos para la comparación de agitaciones se realizaron a 40°C, la temperatura óptima de actividad de CALB.



**Figura 14. Representación gráfica de la curva de saturación del enzima,** donde se pueden observar las distintas evoluciones de la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad de la reacción en función del tipo de agitación.

Para la estimación de los parámetros cinéticos se realizaron las representaciones de Lineweaver-Burk. Al mismo tiempo, los valores experimentales obtenidos se comparaban con los teóricos mediante la regresión lineal de Solver.

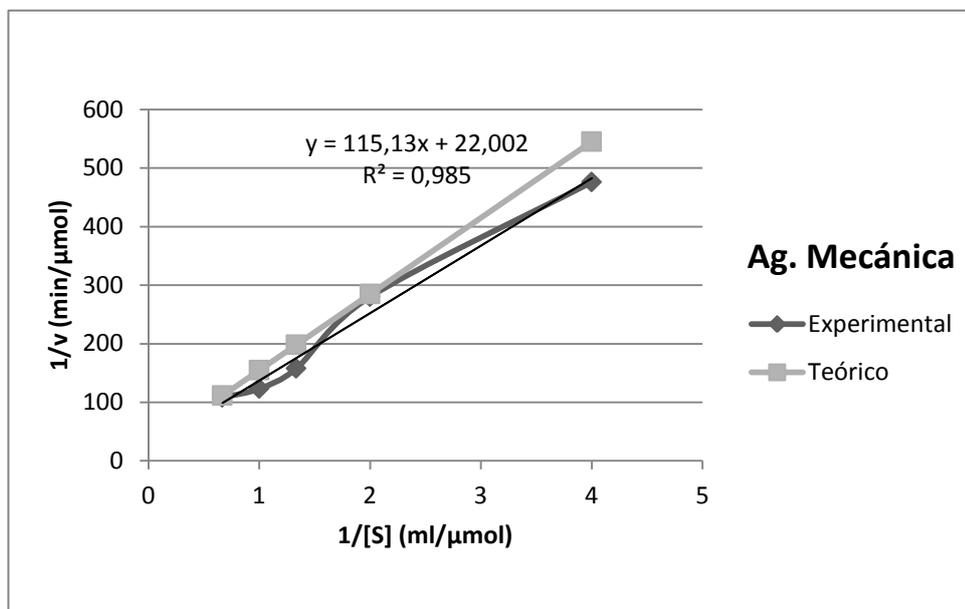


Figura 15. Representación de Lineweaver-Burk. Ensayo realizado con agitación mecánica.

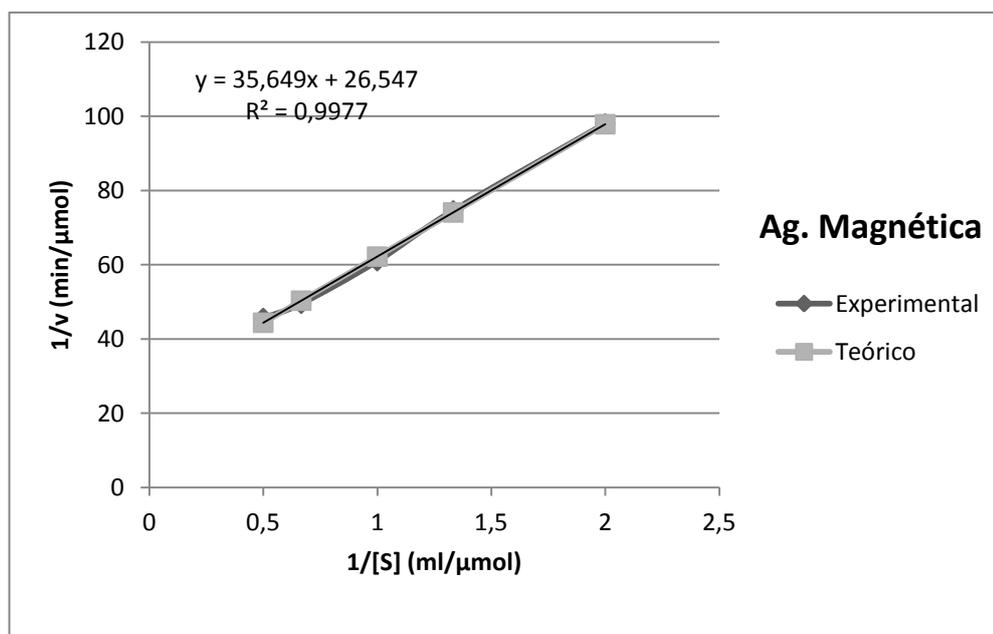


Figura 16. Representación de Lineweaver-Burk. Ensayo realizado con agitación magnética.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de los dos ensayos enzimáticos realizados con diferentes tipos de agitación.

Tipo de agitación	$K_m$ ( $\mu\text{mol/ml}$ )	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol/min}$ )
Mecánica	5,2327	0,04545
Magnética	1,3428	0,03766

Mientras que la velocidad máxima es similar en los dos tipos de agitaciones, la  $K_m$  de la agitación mecánica es significativamente superior. Esto se traduce a que la reacción en caso agitación magnética es notablemente más rápida.

### 3.2.2 Comparación temperaturas

En vista de que la agitación magnética es más efectiva, la comparativa entre las actividades enzimáticas a distintas temperaturas se realizó en este tipo de agitación (figura 17).

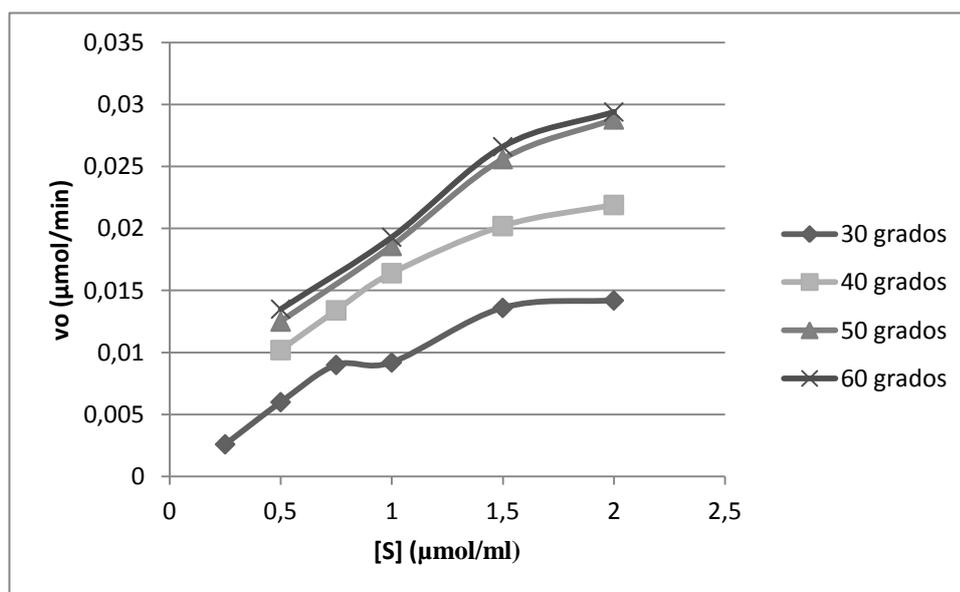


Figura 17. Representación gráfica de la curva de saturación del enzima.

En la Tabla 6 están indicados los parámetros cinéticos estimados a partir de las representaciones de Lineweaver-Burk.

**Tabla 6. Parámetros cinéticos de los ensayos enzimáticos** realizados a diferentes temperaturas con agitación magnética.

Párametros cinéticos	30°C	40°C	50°C	60°C
<i>K<sub>m</sub></i> ( $\mu\text{mol/ml}$ )	1,8509	1,3428	1,4851	1,5528
<i>V<sub>max</sub></i> ( $\mu\text{mol/min}$ )	0,02836	0,03766	0,04908	0,04662

En base a los resultados a 40°C es cuando se produce la reacción con mayor rapidez, a pesar de que la *V<sub>max</sub>* sea superior a 50 y 60°C. La actividad aumenta casi de manera lineal hasta los 50°C, a partir de esta temperatura la velocidad inicial comienza a disminuir.

### 3.2.3 Actividad enzima libre

Se realizaron ensayos enzimáticos a diferentes temperaturas para una concentración fija de sustrato (0,5mM) con el enzima libre. La actividad enzimática se representó en función de la temperatura. De este modo se pudo observar cómo se desenvolvía el enzima libre en condiciones adversas (figura 18).

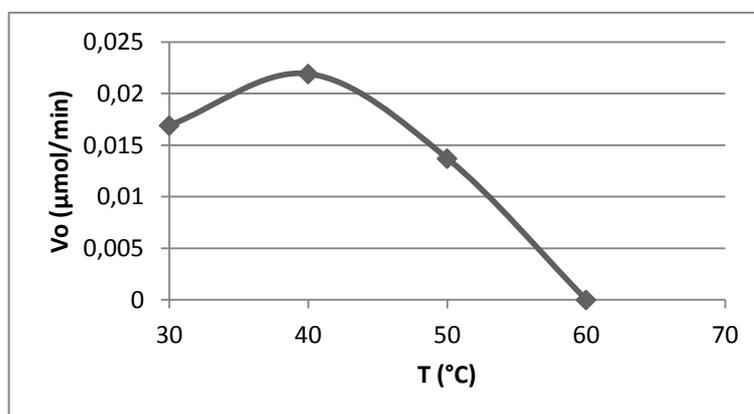
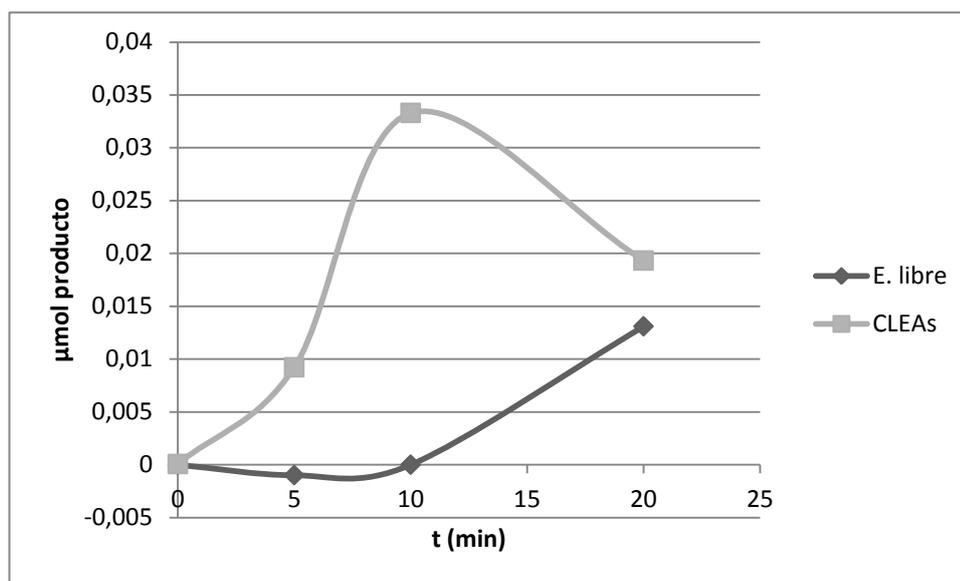


Figura 18. Representación de la actividad del enzima libre en función de la temperatura

Los resultados indican una disminución progresiva de la actividad al aumentar la temperatura por encima de los 40°C.

### 3.2.4 Comparación entre enzima inmovilizada y enzima libre

Tras una incubación a 60°C durante 30 minutos se analizó la actividad tanto del enzima libre como del inmovilizado para una concentración fija de sustrato (0,5mM) (figura 19).



**Figura 19. Comparación del progreso de reacción enzimática a 60°C entre enzima libre e inmovilizada tras un tratamiento térmico. La representación refleja la aparición de *p*-nitrofenol en función del tiempo.**

Los resultados muestran que el enzima inmovilizado presenta actividad durante 15 minutos. Sin embargo, el enzima inmovilizado pierde actividad en las mismas condiciones.

## **4. CONCLUSIONES**

Partiendo de los objetivos fijados al inicio del trabajo y en función de los resultados obtenidos en los experimentos realizados, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- 1.** En los diferentes ensayos enzimáticos realizados la agitación magnética es la más efectiva de todas las utilizadas.
- 2.** La actividad enzimática de las mCLEAs aumenta de manera prácticamente lineal con la temperatura hasta los 50°C. La temperatura óptima para trabajar con CALB inmovilizado es de 40°C.
- 3.** La inmovilización posibilita la reutilización de los enzimas tras su empleo para procesos en los que se tiene que trabajar con condiciones adversas como son las altas temperaturas.
- 4.** La inmovilización de CALB con MNP parece un método práctico para la hidrólisis en medios acuosos.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

**Anderson, E. M., K. M. Larsson, and O. Kirk. 1998.** One biocatalyst-many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformations* 16: 181-204.

**Bayliss, O. B., and W. M. Adams. 1979.** The pH dependence of borohydride as aldehyde reductant. *Histochemical Journal* 11: 111-116.

**Bean, C. P., and J. D. Livingston. 1959.** Superparamagnetism. *Journal of Applied Physics* 30: 120S-129S.

**Brady, D., and J. Jordaan. 2009.** Advances in enzyme immobilization. *Biotechnology Letters* 31: 1639-1650.

**Cabrera, L., S. Gutierrez, N. Menendez, M. P. Morales, and P. Herrasti. 2008.** Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization. *Electrochimica Acta* 53: 3436-3441.

**Fang, X., Zhan, Y., Yang, J., Yu, D. 2014.** A concentration-dependent effect of methanol on *Candida antarctica* in aqueous phase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 104:1-7.

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

**Hermanson, G. T. 2008.** *Bioconjugate Techniques*. Second edition. Elsevier Ltd, Amsterdam (The Netherlands). ISBN: 978-0-12-370501-3.

**Li, D., W. Y. Teoh, J. J. Gooding, C. Selomulya, and R. Amal. 2010.** Functionalization strategies for protease immobilization on magnetic nanoparticles. *Advanced Functional Materials* 20: 1767-1777.

**Liu, Z. L., Y. J. Liu, K. L. Yao, Z. H. Ding, J. Tao, and X. Wang. 2002.** Synthesis and magnetic properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Journal of Materials Synthesis and Processing* 10: 83-87.

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

**Massart, R. 1981.** Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions on Magnetics* 17: 1247-1246.

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

**Montero, S., A. Blanco, M. D. Virto, L. C. Landeta, I. Agud, R. Solozabal, J. M. Lascaray, M. d. Renobales, M. J. Llama, and J. L. Serra. 1993.** Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* 15: 239-247.

**Morales, M. d. P., S. Veintemillas-Verdaguer, M. I. Montero, C. J. Serna, A. Roig, Ll. Casas, B. Martínez, and F. Sandiumenge. 1999.** Surface and internal spin canting in  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. *Chemistry of Materials* 11: 3058-3064.

**Răuciu, M. 2009.** Synthesis protocol influence on aqueous magnetic fluid properties. *Current Applied Physics* 9: 1062–1066.

**Schmid, G. 2004.** Nanoparticles: from theory to application. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (Germany). ISBN: 3-527-30507-6.

**Sharma, R., Y. Chisti, and U. C. Banerjee. 2001.** Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 19: 627-662.

**Sun, J., Jiang, Y., Zhou, L., Gao, J. 2010.** Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption in organic medium. *New biotechnology*. 27 1: 53-58.

**Vakhlu, J., and A. Kour. 2006.** Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology* 9: 69-85.

**Villeneuve, P., J. M. Muderhwa, J. Graille, and M. J. Haas. 2000.** Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 9: 113-148.

**Zaks, A., and A. M. Klibanov. 1984.** Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C. *Science* 224: 1249-1251.