



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MANIZALES

**INMOVILIZACIÓN DE DOS LIPASAS PARA SU APLICACIÓN EN EL
PRE-TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA
LÁCTEA**

**IMMOBILIZATION OF TWO LIPASES FOR USE IN PRE-TREATMENT
OF WASTEWATER FROM DAIRY INDUSTRY**

MARGARITA DÍAZ RAMOS
INGENIERA QUÍMICA

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería y Arquitectura
Manizales, Colombia
2012

INMOVILIZACIÓN DE DOS LIPASAS PARA SU APLICACIÓN EN EL PRE-TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA LÁCTEA

MARGARITA DÍAZ RAMOS
INGENIERA QUÍMICA

Tesis presentada como requisito para optar al título de:
Magister en Ingeniería Química

Directora:
GLORIA INES GIRALDO GÓMEZ. PhD
GRUPO DE INVESTIGACIÓN ALIMENTOS FRUTALES

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería y Arquitectura
Manizales, Colombia

2012

“El triunfo del verdadero hombre surge de las cenizas del error”

Paulo Neruda

AGRADECIMIENTOS

Entidades financiadoras

- Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales (DIMA) - Apoyo a tesis de posgrados 2011.
- Coordinación de la Maestría en Ingeniería-Ingeniería Química.
- Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales.

Laboratorios

- Laboratorio de Materiales Nanoestructurados y Funcionales de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales por los análisis de difracción de rayos X y área superficial y porosidad.
- Laboratorio de Química de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales por los análisis de grasas y DQO.
- Laboratorio de Física del Plasma por los análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y microscopía electrónica de barrido en ambiente.

Profesores

- A la profesora Gloria Inés Giraldo Gómez por su colaboración personal y profesional en el desarrollo de esta tesis.
- Al profesor Carlos Eduardo Orrego por aportar conocimientos pertinentes al desarrollo del mismo.
- Al profesor Dr. Paulo Waldir Tardioli por su amable recibimiento y colaboración durante la pasantía internacional en la Universidad Federal de Sao Carlos, Brasil.

Familiares y Amigos

- A mis padres por apoyarme incondicionalmente y creer siempre en mí.
- A todos los compañeros de maestría en especial a Carolina Romero Gutiérrez, Laura Vanessa Zuluaga Cardona y Harold Norbey Ibarra Taquez por su compañía y apoyo.

RESUMEN

En este trabajo se preparó un sistema biocatalítico con un buen desempeño en la hidrólisis de aguas residuales con alto contenido de grasas como pre-tratamiento del tratamiento biológico anaerobio o aerobio de esta clase de aguas residuales. Se inmovilizaron dos clases de lipasas provenientes de los hongos, *Candida rugosa* (Tipo VII de Sigma Chemical Co.) y *Rhizopus oryzae* (Fluka) en quitina y bentonita modificada.

La quitina se produjo a partir de los caparazones de jaibas mediante un tratamiento alcalino a alta temperatura, obteniéndose quitina con un grado de desacetilación de 37.2 % y la bentonita procedente del Valle del Cauca – Colombia se modificó mediante la adsorción de la sal de amonio, cloruro de benciltrietilamonio (BTEA). Ambos soportes son económicos y con excelentes propiedades para la inmovilización de enzimas como biocompatibilidad, biodegradabilidad y gran afinidad por las proteínas.

La caracterización de los soportes se realizó por medio de espectroscopía de infrarrojo (FT - IR), difracción de rayos X (DRX), adsorción y desorción de nitrógeno y el grado de desacetilación para la quitina se obtuvo por una técnica potenciométrica.

La inmovilización se efectuó por inmersión del soporte en una solución de la proteína durante 22 h; se evaluó el efecto de la temperatura y el pH sobre el proceso de inmovilización, determinando el porcentaje de inmovilización y la actividad retenida a las diferentes condiciones de temperatura (30, 35 y 40 °C) y pH (6.5, 7.0 y 7.5) valoradas. La lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en bentonita modificada a 35 °C y pH 7, fue el mejor sistema biocatalítico, alcanzando un porcentaje de inmovilización y de retención de actividad del 48.05 y 14.68 %, respectivamente.

La constante de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad de reacción máxima (V_{max}) se estimaron experimentalmente y los valores de K_m para la enzima libre e inmovilizada fueron 309.4 y 1647.3 ppm, respectivamente; mientras los valores de V_{max} fueron 9.52 y 0.345 $\mu\text{mol ml}^{-1} \text{min}^{-1}$ para la enzima libre e inmovilizada, respectivamente.

Se evaluó el efecto de la temperatura y el pH sobre la estabilidad del sistema biocatalítico. La enzima inmovilizada fue estable a 45 °C y pH 6.5, reteniendo el 82.37% de la actividad.

Se determinó la eficiencia de la enzima inmovilizada en la reducción del contenido de grasas y la demanda química de oxígeno (DQO) de una muestra de agua residual producida a partir del proceso de elaboración de quesos, alcanzando una reducción de 66,9% en la concentración de grasas y el 19,2% de la DQO.

Este estudio muestra el potencial de la lipasa inmovilizada como pre-tratamiento del tratamiento biológico de aguas residuales con altos contenidos de grasas.

Palabras clave: Biocatálisis, Lipasas, Inmovilización.

ABSTRACT

In this work was prepared a biocatalytic system with good performance on the hydrolysis of wastewater with high fat content as pre-treatment of anaerobic or aerobic biological treatment of such wastewater.

Lipases from the fungus *Candida rugosa* (Type VII by *Sigma Chemical Co.*) and *Rhizopus oryzae* (*Fluka*) were immobilized on chitin and modified bentonite. Chitin was insolated by crab shell, with an alkaline treatment at high temperature, a degree deacetylation of 37.2% was found for the chitin and the bentonite came from Valle del Cauca - Colombia was modified by intercalation with benzyltriethyl ammonium chloride (BTEA).

Both of them display biocompatibility, biodegradability, high affinity with proteins and inexpensive. Thus, they are potentially useful for immobilization of enzymes.

The characterization of the supports was carried out by infrared spectroscopy (FT - IR), X-ray diffraction (XRD), nitrogen sorption measurements, and the degree of deacetylation for chitin was determined by a potentiometric method.

The immobilization were developed by dispersed the support in the proteins solution during 22 h, the effect of temperature and pH on the immobilization process were investigated measuring the protein immobilization yield and the retained activity at different temperatures (30, 35 and 40 °C) y pH (6.5, 7.0 and 7.5) conditions.

Lipases by *Candida rugosa* immobilized on modified bentonite at 35 °C and pH 7 was the best biocatalytic system, reaching a percentage of immobilization and retention of activity of 48.05 and 14.68% respectively.

The Michaelis - Menten constant (K_m) and maximum reaction rate (V_{max}) were estimated experimentally and the K_m values of free and immobilized lipase were 309.4 and 1647.3 ppm, respectively whereas V_{max} values were 9.52 and 0.345 $\mu\text{mol ml}^{-1} \text{min}^{-1}$ of free and immobilized lipase.

The effects of pH and temperature on stability of enzyme were also evaluated. The immobilized enzyme showed optimum stability at 45 °C and pH 6.5, retaining 82.37% activity.

The efficiency of the immobilized enzyme on greases content reduction and chemical oxygen demand (COD) was determined; the results showed that COD and grease concentration reductions were about 66.9 and 19.2 %, respectively.

This study shows the potential of immobilized lipase as a pre-treatment step in biological treatment of wastewater with high grease concentration.

Keywords: Biocatalysis, lipases, immobilization.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	VII
RESUMEN	IX
ABSTRACT.....	XI
TABLA DE CONTENIDO.....	XIII
LISTADO DE SIGLAS Y ABREVIACIONES	XVII
LISTADO DE FIGURAS	XIX
LISTADO DE TABLAS	XXI
INTRODUCCIÓN.....	XXIII
CAPÍTULO 1: ESTADO DEL ARTE.....	1
1.1. Lipasas.....	1
1.2. Mecanismo de acción de las lipasas.....	2
1.3. Aplicaciones de las lipasas	3
1.4. Inmovilización de enzimas.....	4
1.4.1. Métodos de inmovilización por unión química	5
1.4.2. Métodos de inmovilización por retención física.....	6
1.5. Soportes para la inmovilización.....	7
1.5.1. Quitina y quitosano como soportes para inmovilización	8
1.5.2. Bentonita como soporte para inmovilización.....	10
1.6. Lipasas en el pre-tratamiento de aguas residuales con alto contenido de grasas.....	11
CAPÍTULO 2: PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS SOPORTES	13
2.1. Ensayos para la selección del soporte.....	13
2.2. Materiales	15
2.3. Equipos	15
2.4. Preparación de la quitina.....	17
2.5. Preparación de la bentonita modificada con BTEA.....	17
2.6. Resultados y análisis	18
2.6.1. Caracterización fisicoquímica de la quitina	18

2.6.1.1.	Análisis FT - IR	18
2.6.1.2.	Análisis de difracción de rayos X (DRX) de la quitina.....	19
2.6.1.3.	Grado de desacetilación	20
2.6.2.	Caracterización fisicoquímica de la bentonita-Na y BTEA-Bent.....	21
2.6.2.1.	Análisis FT - IR	21
2.6.2.2.	Análisis de difracción de rayos X (DRX) de la bentonita-Na y BTEA-Bent 22	
2.6.2.3.	Análisis textural de la bentonita-Na y BTEA-Bent.....	23
CAPÍTULO 3: INMOVILIZACIÓN DE LIPASAS		25
3.1.	Materiales.....	25
3.2.	Equipos.....	25
3.3.	Métodos analíticos empleados	26
3.3.1.	Determinación de la proteína.	26
3.3.1.1.	Método Biuret.....	26
3.3.1.2.	Método Bradford	27
3.3.2.	Actividad de hidrólisis de aceite de oliva.....	27
3.4.	Procedimiento de inmovilización.....	28
3.5.	Resultados y análisis.....	29
CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE ESTABILIDAD Y CINÉTICO DE LA LIPASA INMOVILIZADA		35
4.1.	Materiales.....	35
4.2.	Equipos.....	35
4.3.	Selección del mejor sistema enzima-soporte	36
4.4.	Efecto de la temperatura y pH en la estabilidad enzimática. Diseño experimental.	36
4.5.	Determinación de parámetros cinéticos.....	37
4.6.	Ensayo de hidrólisis de grasas en muestra de agua residual.	37
4.7.	Resultados y análisis.....	38
4.7.1.	Estabilidad térmica y frente al pH	38
4.7.1.1.	Ajuste de los modelos y análisis de varianza (ANOVA)	39
4.7.2.	Cinética de hidrólisis.....	41
4.7.3.	Evaluación del sistema biocatalítico en el pre-tratamiento de aguas residuales con altos contenidos de grasas	44
4.7.4.	Estabilidad operacional de sistema biocatalítico CR/BTEA-Bent.....	46
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES GENERALES.....		47
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....		49

ANEXO 1: CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS.....	51
REFERENCIAS.....	53

LISTADO DE SIGLAS Y ABREVIACIONES

Tabla 1: Listado de siglas y abreviaciones

Símbolo	Término	Unidad	Ecuación
CR	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>	-	-
RO	Lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i>	-	-
TPA	Catión cuaternario tetrapropilamonio	-	-
HDTMA	Catión cuaternario hexadeciltrimetilamonio	-	-
BTEA	Catión cuaternario benciltrietilamonio	-	-
TPA-Bent	Bentonita modificada con el catión cuaternario tetrapropilamonio	-	-
HDTMA-Bent	Bentonita modificada con el catión cuaternario hexadeciltrimetilamonio	-	-
BTEA-Bent	Bentonita modificada con el catión cuaternario benciltrietilamonio	-	-
Bentonita-Na	Bentonita sódica	-	-
CR/Quitina	Sistema biocatalítico de la lipasa de <i>Candida rugosa</i> en quitina	-	-
CR/BTEA-Bent	Sistema biocatalítico de la lipasa de <i>Candida rugosa</i> en bentonita modificada con el catión cuaternario benciltrietilamonio	-	-
CIC	Capacidad de intercambio catiónico de la bentonita (47 meq/100 g)	-	-
DQO	Demanda química de oxígeno	mg l ⁻¹	
R.A	Retención de Actividad	%	
Y	Punto de inflexión mayor	ml	(1)
X	Punto de inflexión menor	ml	(1)
F	Normalidad de la solución de NaOH	N	(1)
W	Masa de la muestra de quitina	g	(1)
A	Volumen de KOH gastado por la muestra	ml	(4-5-8)
B	Volumen de KOH gastado por el blanco	ml	(4-5-8)
N	Normalidad del KOH	N	(4-5-8)
V _{rxn}	Volumen del medio de reacción	ml	(4-8)
T	Tiempo de reacción	min	(4-5-6)
C _E	Concentración de la solución de enzima	mg ml ⁻¹	(5)
V _E	Volumen de solución de enzima	ml	(5)
[S]	Concentración de sustrato	mg l ⁻¹	(7-9)
V	Velocidad inicial de reacción	μmol ml ⁻¹ min ⁻¹	(7-9)
V _{max}	Velocidad de reacción máxima	μmol ml ⁻¹ min ⁻¹	(7-9)
K _m	Constante de Michaelis Menten	ppm	(7-9)

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Acción catalítica natural de las lipasas. Un triacilglicerol puede ser hidrolizado hasta glicerol y ácidos grasos (A), o la reacción inversa que combina glicerol y ácidos grasos para formar el triacilglicerol (B).	1
Figura 2: Tipos de transesterificaciones con lipasas	2
Figura 3: Tipos de intersesterificaciones con lipasas	2
Figura 4: Clasificación de los métodos de inmovilización.....	5
Figura 5: Estructura de la quitina y el quitosano	9
Figura 6: Proceso de preparación de quitina	17
Figura 7: Espectro FT - IR de la quitina	19
Figura 8: Patrón DRX para la quitina.....	20
Figura 9: Curva de titulación de la quitina	21
Figura 10: FT - IR de la bentonita-Na y BTEA-Bent.....	22
Figura 11: DRX de la bentonita sódica y bentonita modificada con BTEA	23
Figura 12: Isotermas de adsorción y desorción para la bentonita-Na y BTEA-Bent	24
Figura 13: Diagrama general del proceso de inmovilización	29
Figura 14: Datos de porcentaje de retención de actividad experimentales vs datos predichos por el modelo.....	40
Figura 15: Resultados gráficos del análisis de los datos experimentales de retención de actividad del sistema CR/BTEA-Bent (a) Gráfica de contorno (b) Superficie de respuesta.....	41
Figura 16: Velocidad inicial de reacción (v) de Michaelis-Menten frente a la concentración del sustrato ($[S]$) para la lipasa libre e inmovilizada.....	42
Figura 17: Gráfico de Lineweaver-Burk para la lipasa libre e inmovilizada.....	43
Figura 18: Esquema de degradación de los principales grupos de compuestos de acuerdo a un modelo difusional por etapas	45
Figura 19: Curva patrón para el cálculo de la carga de proteína por el método Biuret.....	51
Figura 20: Curva patrón para el cálculo de la carga de proteína por el método Bradford	52

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1: Listado de siglas y abreviaciones.....	XVII
Tabla 2: Comparación entre las distintas técnicas de inmovilización	6
Tabla 3: Soportes utilizados para la inmovilización de lipasas por diferentes métodos.	8
Tabla 4: Lipasas utilizadas en el tratamiento de aguas residuales de diferentes fuentes.....	12
Tabla 5: Soportes utilizados en los ensayos previos.	14
Tabla 6: Propiedades fisicoquímicas de las sales de amonio utilizadas.....	14
Tabla 7: Resultados de la inmovilización de la lipasa de <i>Candida rugosa</i> en diferentes soportes por adsorción.....	15
Tabla 8: Resultados de textura de la bentonita-Na y bentonita modificada con BTEA	24
Tabla 9: Características de las lipasas de <i>Candida rugosa</i> y <i>Rhizopus oryzae</i>	29
Tabla 10: Resultados de inmovilización para la lipasa de <i>Candida rugosa</i> en quitina	30
Tabla 11: Resultados de inmovilización de la lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> en quitina ..	30
Tabla 12: Resultados de inmovilización de la lipasa de <i>Candida rugosa</i> en BTEA-Bent.	32
Tabla 13: Resultados de inmovilización de la lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> en BTEA-Bent.	32
Tabla 14: Características del medio preparado.....	35
Tabla 15: Resultados obtenidos en el diseño experimental para la evaluación de la estabilidad enzimática frente al pH y la temperatura.....	38
Tabla 16: Resultados del análisis de varianza para el modelo de estabilidad enzimática empleando Design-Expert 8.0	39
Tabla 17: Modelo empírico para la variable de respuesta en función del pH y la temperatura.....	39
Tabla 18: Parámetros cinéticos de la lipasa de <i>Candida rugosa</i> libre e inmovilizada basados en la ecuación de Michaelis-Menten.....	43
Tabla 19: Eficiencia del tratamiento enzimático de la muestra preparada con el biocatalizador	44

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, gracias a los grandes avances en la biotecnología y a sus propiedades intrínsecas, las enzimas se han convertido en importantes herramientas para la catálisis de una amplia variedad de procesos industriales.

Entre las aplicaciones más comunes de las enzimas están la síntesis de productos químicos, en la industria de alimentos y farmacéutica, presentando entonces claras ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos, como son su mayor especificidad y selectividad, trabajan a condiciones de presión, temperatura y pH moderadas y alcanzan velocidades de reacción similares a los catalizadores químicos a condiciones más costosas.

Entre las enzimas de gran importancia a nivel industrial están las lipasas (acil-éster-hidrolasas EC 3.1.1.3), las cuales catalizan la hidrólisis y la formación de lípidos, con aplicaciones en la industria oleoquímica y de grasas (1), industria de detergentes, resolución de mezclas racémicas (2), producción de aditivos para mejorar el sabor y la calidad de los alimentos (3), la industria de cosméticos, producción de biodiesel (4), tratamiento de aguas residuales (5), entre otras (6).

A pesar de las ventajas que tiene el uso de lipasas como biocatalizador, el proceso de aislamiento y purificación es costoso y una vez son aisladas de su entorno natural su estructura es inestable, además, al ser solubles en agua y operar en sistemas de reacción homogéneos, contaminan el producto y no pueden ser recuperadas para ser reutilizadas, lo cual se convierte en un problema económico debido a que parte de la actividad enzimática se pierde (7-8). La inmovilización de enzimas es una herramienta poderosa para mejorar las propiedades de las enzimas, por ejemplo, la estabilidad operacional, estabilidad térmica, la actividad, especificidad y selectividad, además, se reducen la posible inhibición por el medio o los productos de la reacción. Lo anterior depende ampliamente de la naturaleza del soporte y el protocolo de inmovilización que se emplee (9-11).

La inmovilización supone el anclaje de las enzimas a un soporte sólido insoluble, en donde el movimiento de la enzima en el espacio se ve restringido total o parcialmente, resultando un sistema de reacción heterogéneo con las enzimas inmovilizadas, lo que permite llevar a cabo reacciones enzimáticas continuas, controlar la formación de productos y facilita la remoción de las enzimas de la mezcla de reacción. Comparando las enzimas libres con las inmovilizadas, estas últimas son más robustas y más resistentes a los cambios en el entorno (8).

Generalmente no hay un método aceptado como “el mejor” para la inmovilización de todas las enzimas, esto se debe a su composición y diferentes características

químicas, las diferentes propiedades de los sustratos y productos, y las aplicaciones del producto, además de las ventajas y desventajas que tienen cada uno de los métodos de inmovilización.

Por tanto, las condiciones óptimas para la inmovilización de una enzima y su aplicación se establecen basados en las propiedades físicas y estructurales del soporte y las propiedades físicas y químicas de la enzima y las especificaciones de proceso para el catalizador, de tal forma que se asegure la retención más alta posible de la actividad enzimática y que se tenga en cuenta su funcionamiento, durabilidad, costo de inmovilización y la toxicidad de los reactivos de inmovilización (8, 12).

El grupo de investigación: Alimentos-Frutales, tiene experiencia suficiente en este ámbito como se puede validar en su producción académica reciente, donde se han caracterizado novedosas membranas de quitosano como soporte para inmovilización de lipasas (13); se ha inmovilizado la lipasa de *Candida rugosa* sobre quitosano para la obtención de 1-Butil Oleato (14); y además, se ha estudiado la estabilidad térmica de la proteína lactoglobulina en diferentes solventes (15).

En este trabajo se analizaron varios factores determinantes en el proceso de inmovilización de dos clases de lipasas provenientes de los hongos: *Candida rugosa* y *Rhizopus oryzae*, para encontrar las condiciones óptimas de inmovilización que permitan el uso de la lipasa inmovilizada en la hidrólisis de grasas presentes en aguas residuales con altos contenidos de grasas. La inmovilización se realizó en dos clases de soportes con excelentes características para este proceso, como son su alta afinidad por las proteínas, no toxicidad y bajo costo, quitina y bentonita. El primero de ellos, se obtuvo a partir de los caparzones de jaibas en un proceso de desproteínización, desmineralización y desacetilación química de los exoesqueletos en polvo; y la bentonita, se modificó con una sal de amonio cuaternaria con el fin de transformarla en una arcilla hidrofóbica, este último soporte es un material novedoso y poco utilizado para la inmovilización de enzimas aunque muy adecuado para inmovilizar lipasas pues éstas se adsorben fácilmente sobre superficies hidrofóbicas, pudiendo aumentar su actividad (8, 16-17).

El uso de las lipasas inmovilizadas para la hidrólisis de grasas en aguas residuales con altos contenidos de grasas, es un proceso novedoso como pre-tratamiento de aguas residuales, con un alto potencial debido a que la eficiencia del tratamiento biológico posterior se incrementa y los costos del tratamiento de estas aguas serán reducidos al poder reutilizar la enzima, la cual estando inmovilizada aumenta su estabilidad y conserva parte de actividad inicial después de un determinado número de ciclos de reacción; además de trabajar a condiciones moderadas de temperatura y pH.

Basados en los argumentos anteriores los objetivos que se propusieron en este trabajo fueron los siguientes:

OBJETIVOS

GENERAL

Inmovilizar dos lipasas comerciales para su aplicación en el pre-tratamiento de las aguas residuales de la industria láctea.

ESPECÍFICOS

- Seleccionar los sistemas catalíticos enzima-soporte evaluando quitina, dos resinas de intercambio iónico y bentonitas modificadas con varias sales de amonio cuaternarias.
- Caracterizar de los soportes mediante las técnicas de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT - IR), difracción de rayos X (DRX), adsorción y desorción de nitrógeno, y en el caso de la quitina determinar el grado de desacetilación mediante un método potenciométrico.
- Evaluar dos métodos de inmovilización de lipasas; por unión covalente y adsorción con los soporte seleccionados.
- Determinar el efecto de la temperatura y pH sobre el proceso de inmovilización de las enzimas.
- Estandarizar el protocolo de inmovilización de las lipasas sobre los soportes seleccionados.
- Evaluar la eficiencia del mejor sistema catalítico en el pre-tratamiento de las aguas residuales de la industria láctea, midiendo la reducción en el contenido de grasas totales y DQO.
- Determinar los parámetros cinéticos de la reacción de hidrólisis de grasas en aguas residuales con la enzima inmovilizada.

CAPÍTULO 1: ESTADO DEL ARTE

1.1. Lipasas

Las lipasas (acil-éster-hidrolasas EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos, especialmente de cadena larga para dar monoacilglicéridos, diacilglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol en una reacción de equilibrio controlada por el contenido de agua en el medio de reacción.

Modificando las condiciones de reacción, también son capaces de catalizar otras reacciones como esterificación, transesterificación e interesterificación (18), tal como se ilustra en la Figura 1

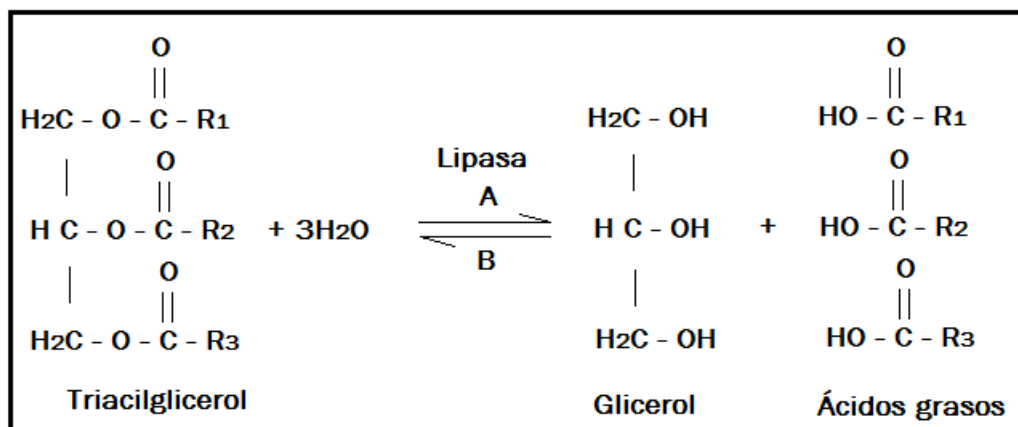


Figura 1: Acción catalítica natural de las lipasas. Un triacilglicerol puede ser hidrolizado hasta glicerol y ácidos grasos (A), o la reacción inversa que combina glicerol y ácidos grasos para formar el triacilglicerol (B).

Estas enzimas se caracterizan principalmente por ser enzimas solubles en agua que actúan sobre sustratos insolubles y agregados, por lo que operan unidas a interfases orgánico-acuosa, siendo las únicas enzimas capaces de esto; al contrario de las esterasas, las cuales hidrolizan esteres solubles, trabajando sin la necesidad de una interfase. La mayoría de las lipasas son esterasas, aunque las esterasas no son lipasas.

La transesterificación es una reacción de síntesis en la cual el acil donador es un éster y se puede clasificar a su vez en glicerólisis y alcoholólisis, según sea el glicerol o un alcohol, el acil receptor. (Ver Figura 2).

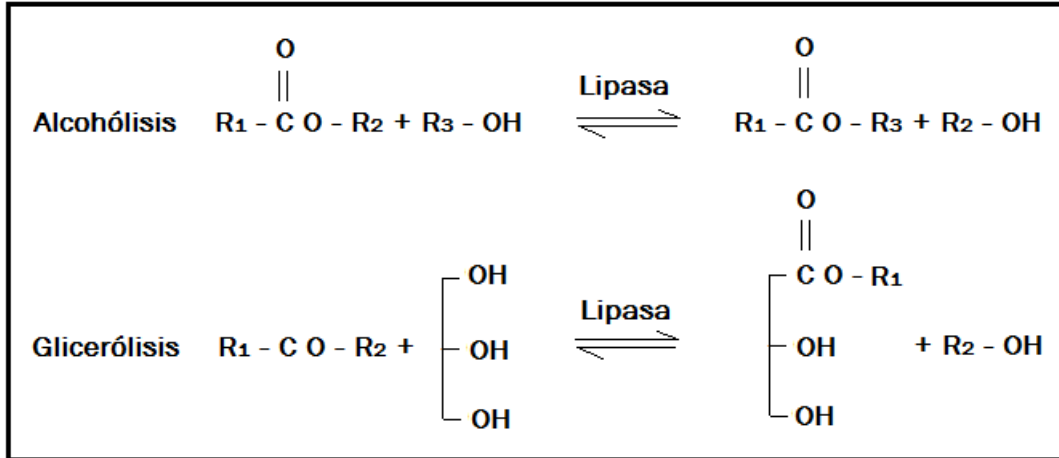


Figura 2: Tipos de transesterificaciones con lipasas

La interesterificación, es la reacción entre dos ésteres que intercambian sus grupos acilo y la acidólisis es la reacción entre un éster y un ácido carboxílico, que transcurre con el reemplazo del grupo acil del éster por el ácido libre. (Ver Figura 3).

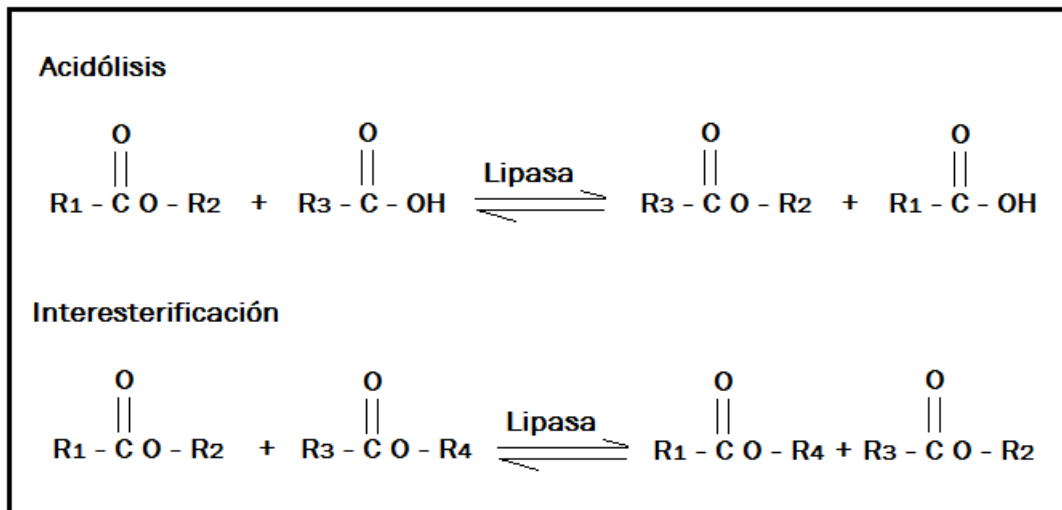


Figura 3: Tipos de intersesterificaciones con lipasas

1.2. Mecanismo de acción de las lipasas

Una característica propia de las lipasas es su capacidad para adsorberse sobre superficies hidrofóbicas, fenómeno que se conoce como activación interfacial y se explica mediante la estructura tridimensional de la enzima, este fenómeno fue reportado por primera vez en 1958 por Sarada y Desnuelle y actualmente se ha confirmado a través de cristalografía y difracción de rayos X de varias lipasas (19-20).

Para muchas lipasas, se han observado más de una conformación; en una de éstas, el sitio activo es inaccesible a los substratos, debido a que se encuentra protegido por un bucle anfifílico, el cual se conoce como “lid” (palabra inglesa que significa “tapadera”), que consecuentemente inactiva la enzima; esta estructura cerrada,

predomina en ambientes homogéneos; en otra conformación, la presencia de una interfase orgánico-acuosa produce una reestructuración conformacional de la lipasa y el movimiento del “lid” expone los grupos catalíticos de la proteína, permitiendo la interacción entre la enzima y el sustrato, mientras que la superficie hidrofóbica estabiliza el contacto de la enzima y la interfase orgánica, al tiempo que parte de la superficie hidrofílica previamente expuesta queda cubierta (21).

Otra característica importante de las lipasas, es la especificidad, y se distinguen los siguientes tipos de especificidad:

Posicional o regio-especificidad

Es la capacidad de la lipasa para discriminar entre las posiciones externas (1 y 3) y la interna (2) del esqueleto de los triglicéridos, así se puede hablar entonces de lipasas específicas sn 1-3 o específicas sn 2 y otras que no son específicas, las cuales hidrolizan el triglicérido en cualquiera de sus posiciones (22).

Especificidad respecto al ácido graso o acil especificidad

La mayoría de las lipasas son selectivas respecto a un ácido, o más bien, una clase de ácidos grasos con longitudes de cadenas y grados de insaturación definidos, particular de un triglicérido, esta propiedad está determinada por la adecuada acomodación de la cadena carbonada del ácido graso en el centro activo de la enzima (22).

Estéreo-especificidad

Las lipasas son capaces de diferenciar entre moléculas de sustrato enantiomeras cuando se trata de sustratos quirales e incluso diferenciar entre las posiciones 1 y 3 en sustratos proquirales (22).

1.3. Aplicaciones de las lipasas

Debido a las características descritas anteriormente, las lipasas son extraordinariamente versátiles, logrando catalizar reacciones con una generación reducida de subproductos, reduciendo el tratamiento de residuos y llevando a cabo procesos en condiciones moderadas de presión y temperatura, por esto han recibido considerable atención en biotecnología y cada día se enfocan los esfuerzos en mejorar sus propiedades catalíticas para ser implementadas en procesos industriales a gran escala. Las aplicaciones industriales de las lipasas están sujetas a los distintos tipos de reacción que son capaces de llevar a cabo, así pues, se tienen distintas posibilidades (6).

Reacciones de hidrólisis:

- Resolución de mezclas quirales (12).
- Hidrólisis de aceites vegetales en la industria oleoquímica (23).
- Inclusión en detergentes para la eliminación de manchas de grasas (24).

Reacciones de síntesis:

- Síntesis de esteres de sabor (25).
- Producción de esteroides para la industria farmacéutica (26).
- Resolución de mezclas racémicas de alcoholes (27).

Reacciones de transesterificación

- Producción de biodiesel (4, 28-30).

1.4. Inmovilización de enzimas

A pesar de las claras ventajas que tiene el uso de lipasas como biocatalizador, también se cuenta con problemas como la baja estabilidad, baja actividad o selectividad encontrada en algunos tipos de estas enzimas; los altos costos en su aislamiento y purificación, la inestabilidad de sus estructuras una vez son aisladas de su entorno natural, además al ser solubles en agua y operar en sistemas de reacción homogéneos, contaminan el producto y no pueden ser recuperadas para ser reutilizadas, lo cual es un problema económico debido a que parte de la actividad enzimática se pierde (7). Esos inconvenientes han sido el principal obstáculo para la rápida expansión de las lipasas en la industria a gran escala. Para lograr el uso de las lipasas a nivel industrial, es preciso su modificación física o química, con el objetivo de mejorar sus propiedades catalíticas en la hidrólisis y síntesis en solventes acuosos y no acuosos. Varios métodos han sido propuestos para este fin, uno de los más exitosos ha sido la inmovilización.

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizados repetidamente.

Las ventajas de utilizar enzimas inmovilizadas son (9, 31):

- Se pueden reutilizar y utilizar en forma continua.
- Permiten aumentar la concentración de la enzima en el medio de reacción.
- Se facilita su separación del medio de reacción.
- Se suele producir un aumento en la estabilidad de la enzima.

Las desventajas de utilizar enzimas inmovilizadas son (9, 31):

- Se añade una nueva etapa en la preparación del biocatalizador.
- La actividad catalítica se puede afectar negativamente.
- Los fenómenos de difusión pueden limitar la velocidad de reacción.

Existen numerosos métodos para lograr la inmovilización de enzimas y cada uno implica diferentes grados de complejidad y eficiencia. Estos métodos se pueden clasificar en dos categorías: *unión química* y *retención física* (31), como se muestra en la Figura 4.

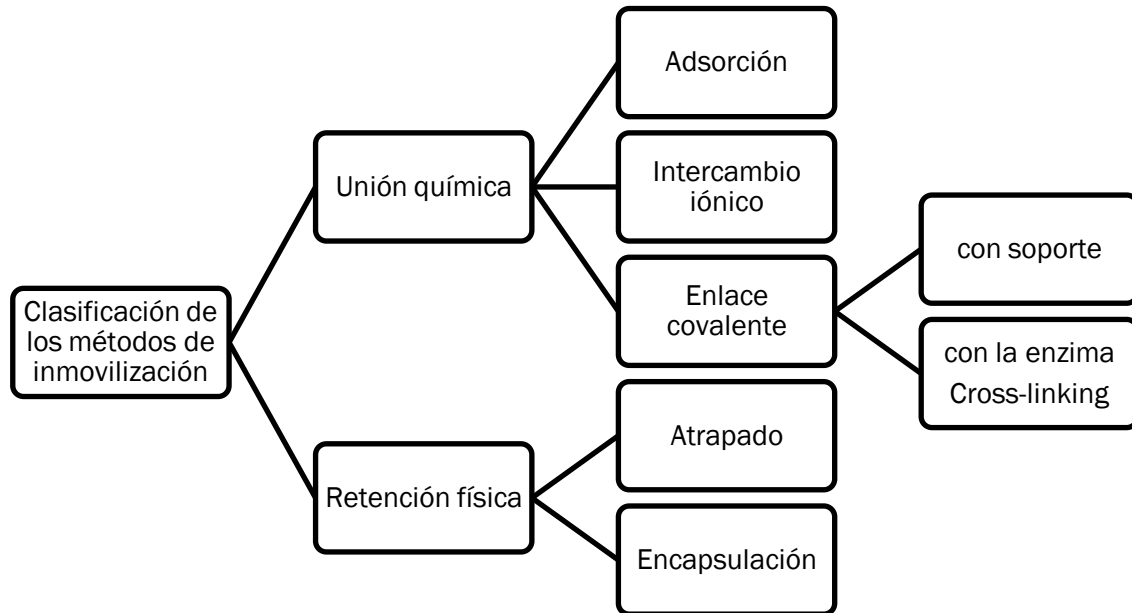


Figura 4: Clasificación de los métodos de inmovilización

1.4.1. Métodos de inmovilización por unión química

- Adsorción:

En la adsorción, la enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones reversibles entre las enzimas y el soporte, como fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno. Es el método más simple, barato y rápido; no son necesarios cambios químicos al soporte o a la enzima aunque tiene como desventajas la pérdida de enzima del soporte, el impedimento estérico posible por el soporte y la unión no específica (12, 18, 32).

- Enlace covalente:

La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte por un reactivo específico, para que reaccionen con los residuos de aminoácidos en la superficie de la enzima. La ventaja de este método es la fuerza de la unión y la estabilidad como consecuencia de la inmovilización. Los inconvenientes son los altos costos y los menores rendimientos, debido a que la conformación de la enzima y su actividad estarán fuertemente influenciadas por la unión covalente (12, 18, 32).

- Intercambio iónico:

Se basa en la unión iónica de las moléculas de enzima a soportes sólidos que contienen restos cambiadores de iones. Las ventajas y desventajas son las mismas del proceso de adsorción, pero a través del intercambio iónico, la fuerza de unión entre la enzima y el soporte es mucho más alta que por la adsorción, aunque ésta sea menor que la existente en el método de enlace covalente (12, 18, 32).

- Cross-linking:

Este método se basa en la formación de enlaces covalentes entre las moléculas de enzima, mediante reactivos bi- o multifuncionales, como el glutaraldehído, que dan lugar a la formación de agregados tridimensionales entrecruzados, totalmente insolubles en agua, pero que no necesitan el uso de soportes adicionales. Las desventajas son los bajos rendimientos de inmovilización, la ausencia de propiedades mecánicas y la pobre estabilidad (12, 18, 32).

1.4.2. Métodos de inmovilización por retención física

- Atrapado:

En este método de inmovilización la enzima está libre en solución, pero está limitada en su movimiento por la estructura enrejada, un gel, de forma que se evite la liberación de la proteína sin impedir la penetración del sustrato. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapado tiene la desventaja que el soporte puede actuar como una barrera a la transferencia de masa (12, 18, 32).

- Encapsulación:

El encapsulado de enzimas consiste en atrapar la enzima dentro de las diversas formas de membranas semipermeables esféricas cuyos diámetros oscilan entre 10 y 100 μm . Las enzimas están contenidas físicamente dentro de la membrana y las moléculas de producto y sustrato deben difundir a través de ella libremente siempre que sus tamaños sean lo suficientemente pequeños para que esto sea factible. Una desventaja es el problema de difusión aguda; una ventaja puede ser la coinmovilización de enzimas diferentes para aplicaciones especiales (12, 18, 32).

En la Tabla 2 (Tomado de (32)) se resumen las ventajas y desventajas relativas de los distintos métodos de inmovilización de enzimas.

Tabla 2: Comparación entre las distintas técnicas de inmovilización

Características	Cross-linking	Adsorción física	Intercambio iónico	Enlace covalente	Atrapado
Preparación	Intermedia	Simple	Simple	Difícil	Difícil
Fuerza de unión	Fuerte	Débil	Intermedio	Fuerte	Intermedia
Actividad enzimática	Baja	Intermedia	Alta	Alta	Baja
Regeneración del soporte	Imposible	Posible	Posible	Rara	Imposible
Coste de la inmovilización	Intermedia	Baja	Baja	Alta	Intermedia
Estabilidad	Alta	Baja	Intermedia	Alta	Alta
Aplicabilidad	No	Si	Si	No	Si
Protección de la enzima frente al ataque microbiano	Posible	No	No	No	Si

1.5. Soportes para la inmovilización

Las propiedades físicas y estructurales del soporte y las propiedades físicas y químicas de la enzima, proporcionan información fundamental para ser usada como guía en la selección de un adecuado procedimiento de inmovilización, obteniendo un sistema catalítico enzima-soporte con propiedades fisicoquímicas y cinéticas específicas totalmente diferentes a las de la enzima libre, convenientes para una reacción específica.

Existe una amplia variedad de soportes potencialmente viables para inmovilizar una enzima; se han empleado compuestos naturales o sintéticos, orgánicos o inorgánicos que difieren en tamaño, forma, densidad y porosidad, y que se utilizan en forma de láminas, tubos, fibras, cilindros, o, más popularmente esferas, los cuales deben proporcionar al sistema la permeabilidad y el área superficial adecuada para la biotransformación.

Cualquier material considerado para la inmovilización de enzimas debe presentar ciertas características como: resistencia mecánica, alta afinidad por las proteínas, resistencia microbiana, disponibilidad de grupos funcionales reactivos para reacciones directas con la enzima y/o modificaciones químicas, termo-estabilidad, rigidez, durabilidad química, regenerabilidad, biodegradabilidad y bajo costo (9, 32).

Se han investigado numerosos soportes y protocolos de inmovilización de lipasas, en la Tabla 3 se muestran algunas lipasas inmovilizadas en diferentes soportes que son utilizadas para diversos propósitos, en estos casos la enzima inmovilizada obtuvo mejores características que la enzima libre.

Tabla 3: Soportes utilizados para la inmovilización de lipasas por diferentes métodos.

Fuente de lipasa	Método de unión	Soporte	Propósito	Referencia
<i>Candida rugosa</i>	Covalente	Quitina	Síntesis de ésteres	(33)
<i>Candida rugosa</i>	Covalente	Metacrilato de poliuretano	Esterificación de ácido oleico	(34)
<i>Candida rugosa</i>	Adsorción	Caolín natural	Esterificación de ácido oleico	(35)
<i>Candida antarctica</i> y <i>Candida rugosa</i>	Covalente	Quitosano	Síntesis de oleato de butilo en iso-octano	(13-14)
<i>Pancreática</i>	Adsorción	Celite	Hidrólisis de trioleína	(3)
<i>Candida rugosa</i>	Covalente	Micro esferas magnéticas hidrofílicas	Hidrólisis de aceite de oliva	(36)
<i>Candida rugosa</i>	Adsorción	Bentonita	Hidrólisis de aceite de oliva	(37)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Adsorción	Partículas porosas de caolinita	Reacción de transesterificación para producir biodiesel	(28)
<i>Candida rugosa</i> y <i>Pseudomonas cepacia</i>	Adsorción	Nano partículas de Zirconio	Reacciones de esterificación	(38)
<i>Candida rugosa</i>	Covalente	Micro esferas de vidrio	Hidrólisis de aceites	(39)
<i>Candida cylindracea</i>	Adsorción	Vidrio	Hidrólisis de aceites	(23)
<i>Candida rugosa</i>	Adsorción	Alginato de calcio	Hidrólisis de grasas	(40)
<i>Candida cylindracea</i>	Adsorción	Zeolita tipo Y	Hidrólisis de aceite de palma	(41)
<i>Candida rugosa</i>	Incrustación de enzimas entrecruzadas	Membranas poliméricas	Esterificación de ácido oleico	(42)

1.5.1. Quitina y quitosano como soportes para inmovilización

La quitina (1-4)-2- acetamido-2-deoxy- β -D-glucano, es el segundo biopolímero más abundante en la tierra después de la celulosa; es un polisacárido duro, inelástico y nitrogenado que se encuentra en las paredes de algunos hongos y en los exoesqueletos de artrópodos, tales como insectos, escarabajos y crustáceos; se obtiene comercialmente a bajo costo de los exoesqueletos ya que estos son residuos de la industria de procesamiento de mariscos. El proceso de obtención consiste básicamente en la desproteización de los exoesqueletos crudos con una solución de NaOH y descalcificación con HCl. Es altamente insoluble en agua y en solventes orgánicos debido a los enlaces de hidrógeno que presenta la molécula, la quitina se vuelve soluble en ácidos inorgánicos diluidos cuando pierde el acetilo del grupo acetilamino, convirtiéndose en quitosano. (Figura 5).

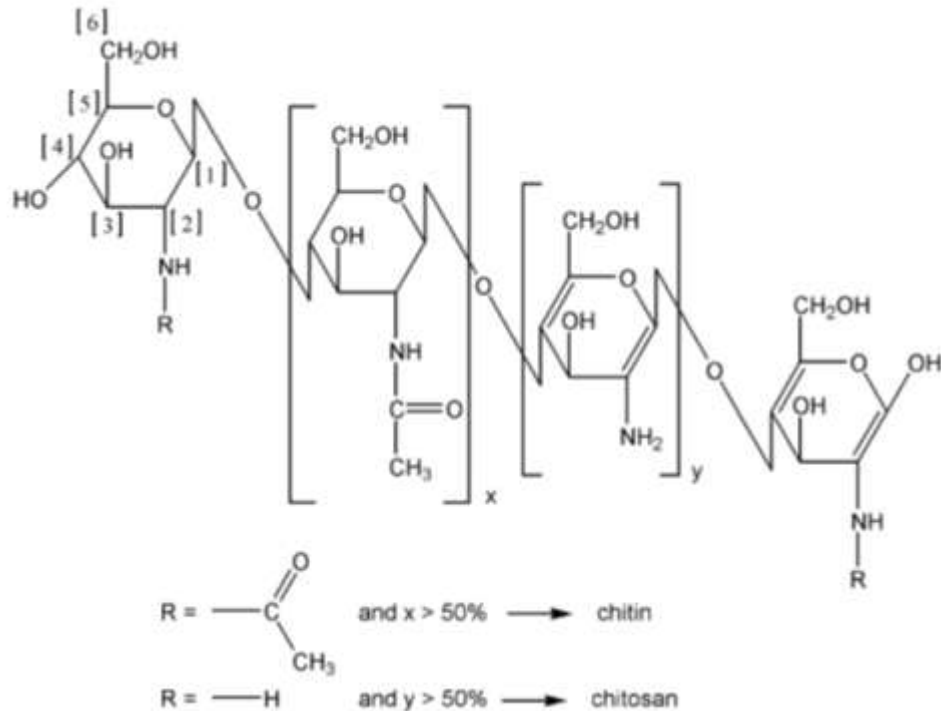


Figura 5: Estructura de la quitina y el quitosano

El quitosano es el principal derivado de la quitina (1-4)-2-amino-2-deoxi- β -D glucano, es obtenido por desacetilación alcalina de la quitina debido a un tratamiento con NaOH al 40-45% seguido por un proceso de purificación.

La desacetilación se da de una manera variable y se conoce como grado de desacetilación, así el quitosano, se puede definir como quitina suficientemente desacetilada; dependiendo del grado de desacetilación, se puede obtener un producto soluble. Cuando el grado de desacetilación es mayor al 50%, el quitosano comienza a ser soluble en soluciones ácidas y se comporta como un polielectrólito catiónico.

La quitina y sus derivados, principalmente el quitosano, tienen numerosas aplicaciones en diferentes campos; por ejemplo, en la industria de cosméticos, agricultura, alimentos, farmacéutica, tratamiento de aguas residuales (remoción de metales pesados, floculación/coagulación de colorantes y proteínas), como matriz para la inmovilización de biomoléculas, etc. (8, 16, 33, 43-44).

La quitina y el quitosano se consideran como soportes adecuados para la inmovilización de enzimas debido a que son materiales no tóxicos, biocompatibles y biodegradables, disponibles en diferentes formas (polvo, gel, fibras y membranas), tienen gran afinidad con las proteínas debido a la presencia de grupos amino que ofrecen a las proteínas un sitio de enlace. Adicionalmente, son soportes muy atractivos desde el punto de vista técnico y económico (45-46).

Se han reportados buenos resultados cuando inmovilizan lipasas en quitina o quitosano, con porcentajes de retención de la actividad de la enzima aceptables y

umentando la estabilidad de la enzima. Por ejemplo, Kılınça et al. (2006), inmovilizaron la lipasa pancreática sobre quitina y quitosano por adsorción y subsecuente entrecruzamiento con glutaraldehído, los resultados mostraron que el pH óptimo se desplazó de 8,5 a 9 para ambos sistemas enzima-soporte; la temperatura también se desplazó de 30 a 40 °C para el conjugado quitina-lipasa; y a 45 °C para el conjugado quitosano-lipasa. La eficiencia de inmovilización fue baja, pero la estabilidad y reusabilidad de la enzima inmovilizada fue buena, obteniéndose un adecuado sistema catalítico para la esterificación de ácidos grasos de cadena media (47).

Gomes et al. (2004), funcionalizaron quitina con hexametildiamina seguido por activación con glutaraldehído para inmovilizar la lipasa de *Candida rugosa*, con esta metodología se logró inmovilizar el 80 % de la proteína y retener el 27% de la actividad de la enzima, además, la estabilidad térmica de la enzima inmovilizada fue mayor a la de la enzima libre; por lo tanto la lipasa inmovilizada en quitina, fue efectiva para la aplicación en la síntesis de ésteres de butilo (33).

La lipasa *Talaromyces thermophilus* se inmovilizó por diferentes métodos, adsorción, intercambio iónico y por enlace covalente, usando varios soportes, encontrando que el quitosano, modificado con glutaraldehído fue el soporte más adecuado para la inmovilización de esta enzima, pues se preservó la actividad de esterificación de la enzima con una alta capacidad de inmovilización (76% y 91%, respectivamente), trabajando a condiciones óptimas de temperatura (50 a 60 °C) y pH (9,5 y 10) (48).

Pereira et al. (2001), inmovilizaron la lipasa de *Candida rugosa* en quitosano por un proceso de adsorción evaluando su funcionamiento frente a la lipasa libre, este trabajo arrojó como resultados una retención de la proteína del 80%, conservando el 17% de la actividad, se incrementó la estabilidad térmica de la enzima debido a que la temperatura óptima de la enzima inmovilizada fue 50 °C contra 37 °C de la enzima libre y el pH óptimo disminuyó ligeramente de un valor de pH 7 para la enzima libre a pH 6 para la inmovilizada (33).

Chiou et al. (2004), activaron los grupos hidroxilo del quitosano para la inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa*, mejorando la estabilidad frente a los cambios en el pH y la temperatura, también se observó un incremento en la actividad de la enzima del 2,11 % con una retención de la actividad después de 10 ciclos de hidrólisis del 85% (49).

1.5.2. Bentonita como soporte para inmovilización

La bentonita es un mineral arcilloso rico en esméctitas, disponible en la naturaleza, de gran interés debido a sus cualidades como: capacidad de hinchamiento en agua, un área superficial alta y capacidad de intercambio catiónico que le permite cambiar de carácter hidrofílico a hidrofóbico transformándola en un excelente adsorbente organofílico, además, tiene un amplio rango de aplicaciones industriales incluyendo la clarificación de los aceites comestibles y minerales, pinturas, cosméticos y productos farmacéuticos, entre otros (37, 50).

La bentonita es un soporte poco estudiado en el campo de la inmovilización de enzimas, sin embargo, algunos autores han reportado buenos resultados con este

material, por ejemplo, Yesiloglu (2005), inmovilizó la lipasa de *Candida rugosa* sobre bentonita por adsorción, mejorando su estabilidad térmica y desplazando el pH óptimo de 6 a 7 para la enzima libre e inmovilizada, respectivamente; el porcentaje de retención de actividad fue del 30% (37).

Además, se ha reportado la modificación de esta arcilla con sales orgánicas mostrando buenos resultados en el proceso de inmovilización de enzimas. El intercambio de cationes orgánicos por los cationes que se encuentran de manera natural en el espacio interlaminar de la arcilla produce materiales organofílicos con mayor capacidad de adsorción y adicionalmente, la intercalación del catión orgánico produce un aumento en el espaciado interlaminar de la arcilla. Típicamente se usan cationes de amonio cuaternarios (QAC's) de la forma general $[(CH_3)_3NR]^+$ o $[(CH_3)_2NRR']^+$, donde R es una cadena carbonada para la modificación.

Dong, et al. (2012), prepararon organobentonitas a partir de una bentonita sódica por intercalación con bromuro de cetiltrimetilamonio, CTMAB, para inmovilizar una lipasa pancreática porcina. La lipasa inmovilizada mostró mayor actividad de hidrólisis que la lipasa libre, al igual que presentó mayor resistencia a los cambios de pH y temperatura. Después de su almacenamiento durante 8 días, la enzima inmovilizada retuvo el 80.7% de la actividad inicial, lo cual fue 2.7 veces mayor que la actividad residual de la enzima libre (17).

Ghiaci et al. (2009), inmovilizaron la lipasa de *Candida rugosa* en bentonita modificada y sin modificar por adsorción, encontrando como el soporte más adecuado la bentonita modificada con una monocapa de surfactante recuperando un 56.6% de la actividad e inmovilizando 61.2% de la enzima. La enzima inmovilizada presentó una mayor estabilidad térmica entre 40 y 70°C y almacenada a 30°C conservó una actividad similar a la inicial hasta por 60 días (51).

1.6. Lipasas en el pre-tratamiento de aguas residuales con alto contenido de grasas.

El agua residual de las industrias lácteas contiene altos niveles de grasas, lo que causa problemas operacionales en los diferentes tratamientos biológicos tradicionales, debido a su lenta biodegradabilidad. Estos problemas se pueden solucionar por la hidrólisis enzimática de estas grasas antes de un tratamiento biológico.

En la Tabla 4 se muestran los trabajos realizados sobre la hidrólisis enzimática de grasas en aguas residuales, como un pre-tratamiento utilizando lipasas sin inmovilizar. En estos trabajos el pre-tratamiento mejoró la eficiencia del tratamiento biológico posterior.

Tabla 4: Lipasas utilizadas en el tratamiento de aguas residuales de diferentes fuentes

Aplicación	Enzima	Referencia
Tratamiento de aguas residuales de la industria láctea	Lipasa (<i>Penicillium restrictum</i>) Lipasa pancreática porcina	(52-57)
Tratamiento de aguas residuales domésticas	Lipasa <i>Pseudomona aeruginosa</i>	(58)
Tratamiento de aguas residuales de centrales de sacrificio de aves	Lipasa (<i>Penicillium restrictum</i>)	(59)
Tratamiento de aguas residuales de la industria de carne porcina	Lipolase 100 T y lipasa SEP	(60)
Tratamiento de aguas residuales de centrales de sacrificio	Lipasa pancreática PL- 250 Lipasa bacteriana LG- 1000 Lipasa EcoSystem Plus	(61)

Sin embargo, se tiene poca información de la hidrólisis enzimática utilizando lipasas inmovilizadas. Jeganathan et al. (2006), evaluaron la hidrólisis de grasas en aguas residuales con concentraciones altas de grasas de una industria de alimento para mascotas, usando lipasas inmovilizadas, mejorando el rendimiento del tratamiento comparado con el tratamiento donde se usa la enzimas libre (40, 62-63).

Dumore et al. (2012), inmovilizaron la lipasa *Aspergillus niger* en quitosano por adsorción obteniendo un porcentaje de inmovilización del 93.7%, esta enzima inmovilizada se utilizó en la hidrólisis de las grasas presentes en un agua residual sintética con concentraciones de 0.1 - 0.3 g/l de grasas, hidrolizando aproximadamente el 48 % de las grasas con 0.3 g/l de soporte y consecuentemente reduciendo el 47% de la DQO después del pre-tratamiento con la enzima inmovilizada (64).

CAPÍTULO 2: PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS SOPORTES

En este capítulo se describe el procedimiento de preparación de los soportes que se utilizaron para la inmovilización de las lipasas de *Candida rugosa* y *Rhizopus oryzae* y su caracterización mediante las técnicas de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT - IR), difracción de rayos X (DRX), adsorción y desorción de nitrógeno, y en el caso de la quitina se determinó el grado de desacetilación mediante un método potenciométrico.

Anterior a la producción de los soportes se realizaron algunos ensayos con el fin de encontrar el soporte más adecuado para la inmovilización por adsorción de las dos lipasas. Finalmente, se escogió como soporte una bentonita modificada con cloruro de benciltriethylamonio.

La quitina se escogió como el soporte para la inmovilización por enlace covalente, ya que es un material de gran afinidad con las proteínas por la presencia de grupos amino que mediante un reactivo bifuncional como el glutaraldehído permite la unión covalente entre la enzima y el soporte, además que es un material no tóxico, biocompatible, biodegradable y económico. Este material se obtuvo a partir de los caparazones de jaibas (*Callinectessapidus*) mediante un tratamiento alcalino a alta temperatura.

2.1. Ensayos para la selección del soporte.

En esta etapa se ensayaron soportes disponibles comercialmente (resinas de intercambio iónico). Romdhane et al. (2011), inmovilizaron la lipasa *Talaromyces thermophilus* en una resina de intercambio aniónico (DEAE-Sephadex) y en dos resinas de intercambio catiónico (Amberlite IRC-50 y Duolite C26) obteniendo rendimientos de inmovilización moderados (48). Fuentes et al. (2001), reportaron la inmovilización de lipasas en Duolite A-568, una resina de intercambio aniónico obteniendo altos rendimientos en la hidrólisis de formiato de etilo (65). Las resinas que se ensayaron (Tabla 5) son resinas de intercambio aniónico y catiónico de alto costo.

Tabla 5: Soportes utilizados en los ensayos previos.

Soporte	Observaciones
Resina aniónica	Marca Bayer, fuertemente básica tipo 1, con una matriz de copolímero de esternindivinilbenceno, grupo funcional $N(CH_3)^{3+}$.
Resina catiónica	Bio-Rex 70 de malla 100-200
Bentonita modificada con diferentes sales de amonio cuaternarias.	Suministradas por el grupo de investigación estado sólido y catálisis Ambiental (ESCA) de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Ver las propiedades fisicoquímicas de las sales en la Tabla 6.
Arcilla esméctica (24%) delaminada con alcohol polivinílico (PVA)	Suministradas por el grupo de investigación estado sólido y catálisis ambiental (ESCA) de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.
Bentonita modificada con cloruro de benciltrietilamonio (BTEA)	Producida en este trabajo como se explica en la sección 2.2.2

Otros soportes empleados fueron seleccionados con base en los desarrollos del grupo de investigación “Estado Sólido y Catálisis Ambiental”, (ESCA), de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá (Bentonitas modificadas con sales de amonio cuaternarias y una arcilla esméctica); y otro desarrollado en este trabajo (Bentonita modificada con cloruro de benciltrietilamonio, BTEA).

Se probaron las bentonitas modificadas debido a que se han reportado buenos resultados con estos soportes, por ejemplo, Ghiaci et al. (2009), inmovilizaron la lipasa de *Candida rugosa* en bentonita sódica y bentonita modificada con bromuro de cetiltrimetilamonio, encontrando que la lipasa inmovilizada en la bentonita modificada mostraba una actividad superior a la bentonita sin modificar y aumentaba su estabilidad térmica (51).

El soporte escogido se seleccionó teniendo en cuenta el porcentaje de inmovilización y los costos del proceso. Esos ensayos se realizaron únicamente con la lipasa de *Candida rugosa* debido al alto costo de la lipasa de *Rhizopus oryzae*. Estos soportes se describen en la Tabla 5.

En la Tabla 6, se describen las propiedades fisicoquímicas de las sales de amonio usadas para la modificación de la bentonita.

Tabla 6: Propiedades fisicoquímicas de las sales de amonio utilizadas

Catión orgánico	Formula molecular	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Solubilidad en agua a 20 °C (g l ⁻¹)
TPA	$(CH_3CH_2CH_2)_4N(Br)$	266.27	>1000
HDTMA	$CH_3(CH_2)_{15}N(Br)(CH_3)_3$	364.45	36.4
BTEA	$C_6H_5CH_2N(C_2H_5)_3 Cl$	227.78	630

Los ensayos consistieron en la inmovilización de la enzima de acuerdo a las condiciones encontradas en la revisión bibliográfica a 30 °C y pH 7.0 y el procedimiento realizado es el descrito más adelante en el Capítulo 3.

En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos con los diferentes soportes.

Tabla 7: Resultados de la inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa* en diferentes soportes por adsorción

Soporte	% inmovilización
Resina aniónica	9.20
Resina catiónica (BIO-REX)	9.4
TPA-Bent	69.8
HDTMA-Bent	16.4
BTEA-Bent	76.5
Arcilla esméctica	40.8

Según los resultados de la Tabla 7, se seleccionó la bentonita modificada con BTEA (BTEA-Bent) debido a que presentó el mayor porcentaje de inmovilización (76.5%) y es un material económico que se adquiere fácilmente en el mercado. Las resinas de intercambio iónico son materiales costosos comparados con la bentonita, además que con éstas se obtiene una adsorción débil de la enzima, por tal motivo se escogió la bentonita como soporte para la inmovilización de la lipasas, de las sales de amonio cuaternarias que se utilizaron en la modificación de las bentonitas, el cloruro de benciltrietilamonio es la sal más económica que se encuentra en el mercado.

Los soportes escogidos para el desarrollo de los objetivos fueron entonces la quitina para la inmovilización por unión covalente y la bentonita modificada con el cloruro de benciltrietilamonio la cual nombraremos como BTEA-Bent, para la inmovilización por adsorción.

2.2. Materiales

Los reactivos necesarios para la preparación de los soportes fueron:

Quitina:

Caparazones de jaibas obtenidos en una pescadería local, los cuales ya estaban lavados y totalmente libres de cualquier residuo orgánico, hidróxido de sodio (*Carlo Erba* al 99%), ácido clorhídrico, ácido acético, todos los demás reactivos fueron de grado analítico de casas comerciales reconocidas.

Bentonita:

Bentonita natural suministrada por Bentocol S.A, Valle del Cauca (66), cloruro de sodio (sal casera), cloruro de benciltrietilamonio (*Merk* 99%).

2.3. Equipos

Para la preparación de los soportes se utilizaron los siguientes equipos:

- Placa de agitación magnética VELP SCIENTIFICA.
- Estufa Binder ED
- Molino de cuchillas, *Thomas -Wiley*4.

- Molino pulverizador Agatha.
- Serie de tamices Tyler
- Autoclave *Eastern medical*.
- Centrifuga INDULAB ref. 004 special

La caracterización de los soportes se realizó mediante métodos convencionales como:

- Difracción de rayos X (DRX): La difracción está basada en las interferencias que se producen cuando una radiación monocromática atraviesa una rendija de anchura comparable a la longitud de onda de la radiación. Los ensayos se realizaron en un difractómetro de rayos X, Rigaku Miniflex II, con geometría Bragg° Brentano, equipado con una fuente de radiación de Cu K α de 0.1540562 nm de longitud de onda que opera a 30 kV y 15 mA con un detector de NaI que no emplea monocromador. Los patrones de difracción (PXR) fueron recolectados en el intervalo de 3 a 80° y de 3 a 20° en ángulos 2 Theta para la quitina y la bentonita, respectivamente, a una velocidad de barrido de 5°/min a condiciones ambientales.
- Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), la cual permite evaluar los grupos funcionales, proporcionando información sobre las propiedades internas de cualquier material (Composición química, impurezas, interacción entre sustituyentes, análisis de grupos funcionales, etc.), por lo que es de gran importancia en el análisis cualitativo. Los análisis se realizaron en un espectrómetro IR por transformada de Fourier marca Perkin Elmer Spectrum Bx, con fuente de tungsteno. Con un rango de lectura en la región de 400 – 4000 cm⁻¹.
- La adsorción y desorción de nitrógeno se llevó a cabo en un equipo *Micromeritics ASAP 2020* equipado con dos puertos de desgasificación. Las isotermas de adsorción-desorción de N₂ fueron registradas a partir de una presión relativa de 10⁻⁶ hasta 0.99. El área superficial BET (Brunauer-Emmett-Teller) se registró en un rango de 0.05-0.3 P/Po. La distribución de microporo se analizó en un rango de 10⁻⁶ P/Po hasta 0.3 y se analizó por el método *Hovarth-Kawazoe* utilizando una geometría tipo rendija.
- El grado de desacetilación de la quitina se realizó mediante un método potenciométrico (67), este procedimiento se llevó a cabo con una disolución de 0,1 g de quitina en 25 ml de HCl 0,1 M, que se dejó en agitación durante una hora a 55°C, luego se tituló con una solución de NaOH 0,1 M, previamente estandarizada y se realizó la curva de valoración a 30°C, la cual presenta dos puntos de inflexión que son calculados según el criterio de la primera derivada; la diferencia entre ellos corresponde a la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino de la quitina, la concentración de estos se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% NH_2 = \frac{16,1 (Y - X)f}{w} \quad (1)$$

Dónde:

Y: Punto de inflexión mayor (expresado como volumen)

X: Punto de inflexión menor (expresado como volumen)

f: Molaridad de la solución de NaOH

w: Masa en gramos de muestra.

16.1: Valor relacionado con el peso equivalente del quitosano.

2.4. Preparación de la quitina

Los caparazones de jaibas obtenidos se dejaron secando a 60 °C durante 48 h, ya secos se sometieron a un proceso de molienda, en un molino de cuchillas (75% gruesos malla 35), este material particulado se sometió a una esterilización a 121 °C durante 30 min. Posteriormente se realizó la desproteinización de la muestra con NaOH 0,1 N a 30 °C durante 2 h, luego se procedió a la neutralización con agua destilada, para llevar a cabo la descalcificación, el material obtenido se puso en contacto con una solución de HCl 6 N a 30 °C durante 24 h y se procedió a la neutralización con agua destilada nuevamente. La quitina obtenida finalmente, se somete al proceso de desacetilación con NaOH 5N a 121 °C por 5 h, luego se realizó el lavado con agua destilada y se dejó en reposo en una solución acuosa 1% v/v de ácido acético y 1 % p/v de NaCl a 30 °C durante 48 h, se realizó nuevamente un lavado con agua destilada y se dejó secando a 60 °C durante 48 h (68). (Figura 6)

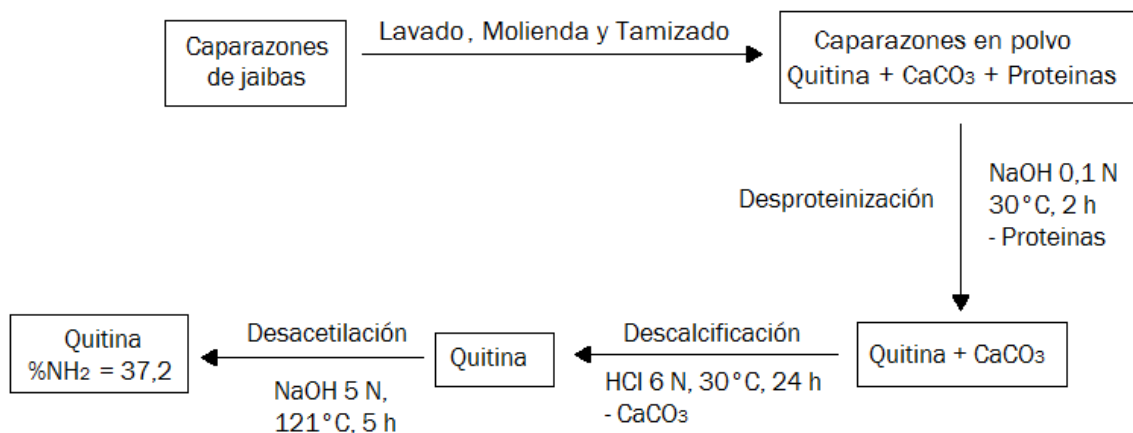


Figura 6: Proceso de preparación de quitina

2.5. Preparación de la bentonita modificada con BTEA

Inicialmente se realizó la separación del mineral arcilloso por tamaño de partícula, recolectando la fracción menor de 2 μm y posteriormente esta fracción se homoionizó

con NaCl 1M, mezclando la arcilla en una proporción 5% p/v, se dejó durante 21 h a temperatura ambiente mezclando de vez en cuando y luego se cambió la solución y se dejó otras 24 h. El sólido obtenido se separó por centrifugación, se hicieron 2 lavados de 15 min con agua destilada y desionizada, hasta conductividad $2.8 \mu\text{S}/\text{cm}$; se dejó secar a 60°C durante 36 h, se trituro en un molino pulverizador Agatha y se tamizó en malla 100 obteniendo la arcilla sódica homoionizada en polvo, la cual se identificó como Bentonita-Na.

La modificación de la bentonita para la obtención del material organofílico se llevó a cabo por intercambio de los cationes Na^+ presentes en la arcilla con cationes de amonio cuaternarios. Para este propósito se utilizó la sal cloruro de benciltrietilamonio (BTEA), cuyas características se muestran en la Tabla 6.

Se preparó una solución correspondiente a 2.1 veces la capacidad de intercambio catiónico de la arcilla homoionizada ($\text{CIC} = 47 \text{ meq}/100 \text{ g}$) y se adicionó a una suspensión de arcilla al 2% p/v para lograr una relación arcilla-solución 1:100 p/v. Luego de agitación y calentamiento a 45°C por 10 horas, se separó el sólido de la solución por centrifugación, se lavó durante más de 1 hora hasta una conductividad de $60 \mu\text{S}/\text{cm}$ y se secó a 35°C por 12 h. Una vez seco el sólido se trituro en un molino pulverizador Agatha y se tamizó en malla 100 para obtener la bentonita modificada en polvo.

2.6. Resultados y análisis

2.6.1. Caracterización fisicoquímica de la quitina

2.6.1.1. Análisis FT - IR

El espectro de la quitina se muestra en la Figura 7. La asignación de las diferentes señales de adsorción se realizó por comparación con los datos reportados en la literatura (69-71), donde las bandas encontradas se relacionan con la poliforma β -quitina principalmente por la banda encontrada a 1654 cm^{-1} característica de los puentes de hidrógeno intermoleculares en el grupo $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ e intramoleculares en el grupo $\text{C}=\text{O}\cdots\text{HOCH}_2$, esta banda confirma la presencia del grupo amida, lo que corrobora que el material obtenido es quitina.

Las bandas de estiramiento de los grupos OH envueltos en los puentes de hidrógeno $\text{O}-6-\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}$ y $\text{O}-3-\text{H}\cdots\text{O}-5$ ocurren a 3480 cm^{-1} y 3447 cm^{-1} , respectivamente aunque no se observan fácilmente en el espectro debido a su superposición.

En el espectro de la β -quitina los picos debido a la deformación axial del grupo NH envuelto en el puente de hidrogeno intermolecular $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ y los enlaces de H en los grupos NH, son picos poco definidos en un rango entre 3280 cm^{-1} y 3100 cm^{-1}

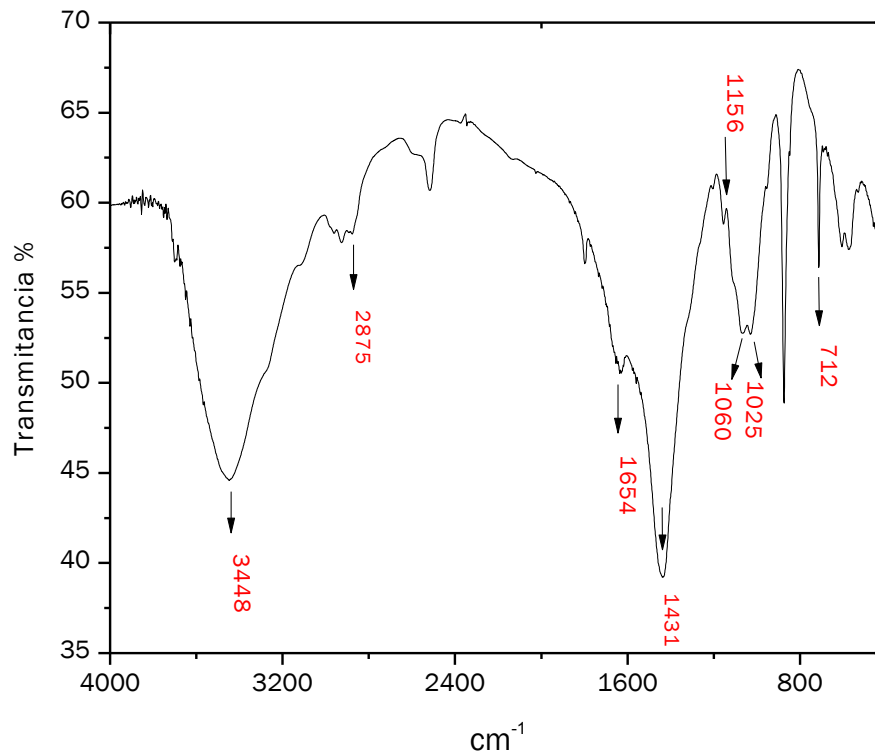


Figura 7: Espectro FT - IR de la quitina

La banda a 2875 cm^{-1} es representativo de la extensión de los grupos CH y el pico a 1431 cm^{-1} es característico de la flexión de los grupos CH_2 y deformación de los grupos CH_3 , la definición e intensidad de las dos últimas bandas se ven afectadas por las bandas características del H en los grupos CH_2OH .

Las señales a 1156 cm^{-1} , 1105 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} y 1025 cm^{-1} son asignados a las vibraciones de estiramiento de los grupos C-O-C y C-O, a 1114 cm^{-1} se encuentra una señal asociado al estiramiento asimétrico del anillo y por último a 712 cm^{-1} se presenta una banda atribuida a los grupos NH fuera del plano.

2.6.1.2. Análisis de difracción de rayos X (DRX) de la quitina

En la Figura 8 se muestra el patrón de difracción obtenido para la quitina, a partir del cual se puede obtener información acerca de su estructura cristalina, este muestra una quitina con baja cristalinidad debido a la naturaleza del tratamiento realizado con NaOH el cual degrada el polímero, comparado con otros tratamientos termoquímicos (72). Cortizo et al. (2008), encontraron señales para la β -quitina en ángulos 8.10 y $19.4^\circ 2\theta$ al igual que Sagheer, et al. (2009), los cuales obtuvieron señales a ángulos 9.6 y $19.6^\circ 2\theta$, en este trabajo se obtuvo uno de los picos característico a $18.8^\circ 2\theta$ y además se presenta una señal de alta intensidad a $29.22^\circ 2\theta$, propio de los residuos

de carbonato de calcio, lo cual nos demuestra que el paso de desmineralización en el proceso de extracción no fue eficiente (69, 71).

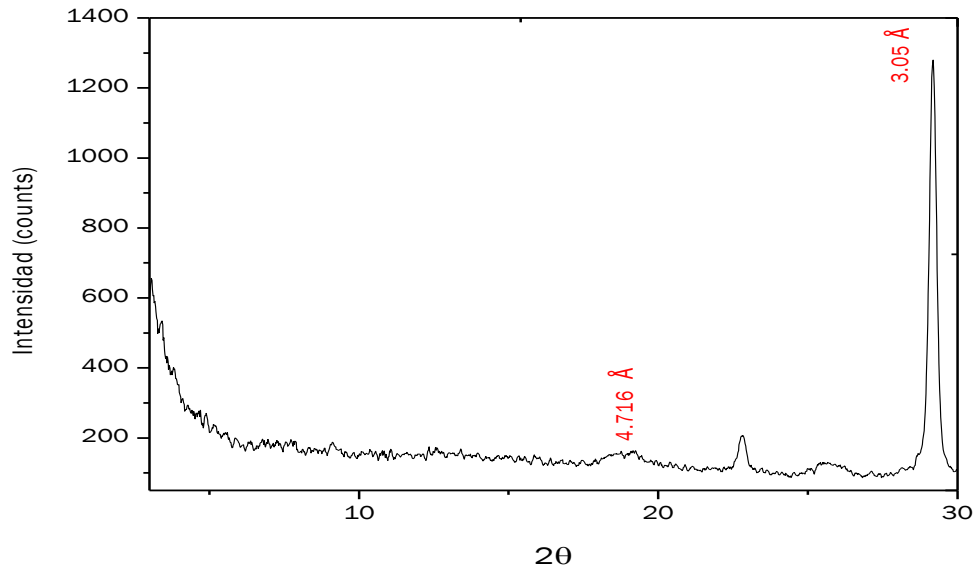


Figura 8: Patrón DRX para la quitina

De las dos pruebas anteriores podemos concluir que el material preparado es una β -quitina con baja cristalinidad debido a la agresividad del tratamiento de extracción con NaOH, el cual degrada el polímero.

2.6.1.3. Grado de desacetilación

En la Figura 9 se muestra la curva de titulación obtenida, en ella se observan dos puntos de inflexión, los valores de estos puntos se determinaron según el criterio de la primera derivada obteniendo valores de $X = 8.5$ y $Y = 11$. El grado de desacetilación calculado con la ecuación 1 fue 37.2%.

Este grado de desacetilación nos comprueba que el producto obtenido es quitina, debido a que este material se caracteriza por un grado de desacetilación bajo, que se presenta debido al proceso de extracción; cuando el grado de desacetilación está entre 50 – 95% este material se considera quitosano (73).

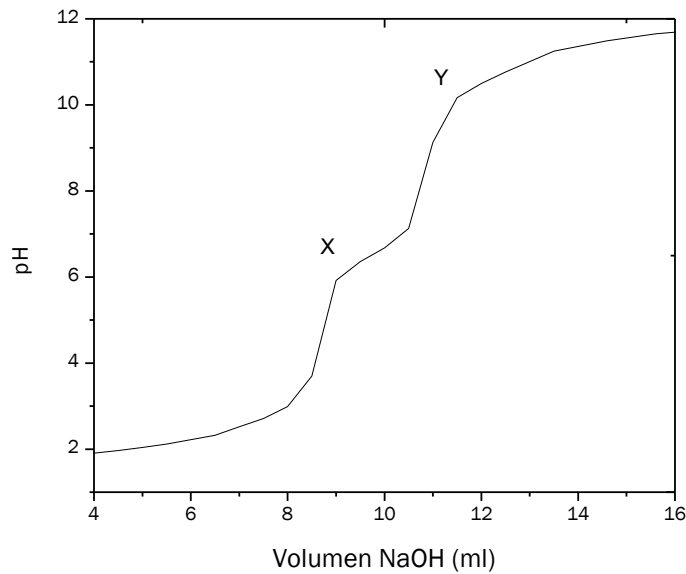


Figura 9: Curva de titulación de la quitina

2.6.2. Caracterización fisicoquímica de la bentonita-Na y BTEA-Bent

2.6.2.1. Análisis FT - IR

La Figura 10 muestra los espectros FT-IR para la arcilla de partida (Bentonita-Na) y la bentonita modificada con cloruro de benciltrietilamonio (BTEA-Bent). La asignación de las diferentes señales de adsorción se realizó por comparación con los datos reportados en la literatura (17, 74-78). Las señales a $3623 - 3625 \text{ cm}^{-1}$ (vibraciones de estiramiento de grupos OH estructurales), 1034 cm^{-1} (vibraciones de estiramiento Si-O), 913 cm^{-1} (vibraciones de deformación AlAlOH) se asignan generalmente al mineral esmectítico con alto contenido de Al en la capa octaédrica. Las bandas en 1090 cm^{-1} , 778 cm^{-1} y 797 cm^{-1} son características de vibraciones de estiramiento Si - O en la estructura de cuarzo, el cual es un mineral asociado a la fracción arcillosa. La banda en 3698 cm^{-1} corresponde al estiramiento de los grupos OH estructurales en la caolinita, el cual es un mineral arcilloso contaminante.

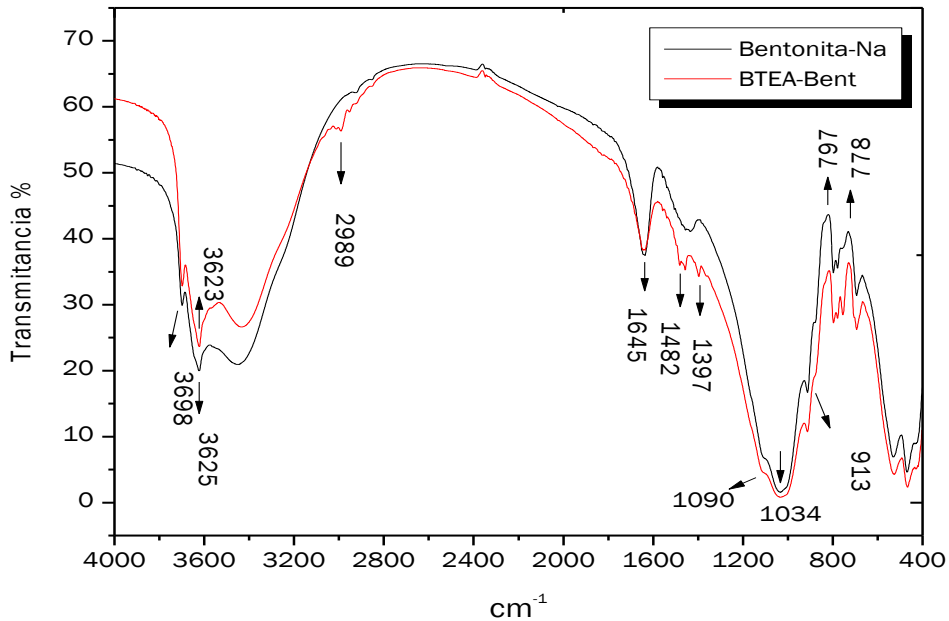


Figura 10: FT - IR de la bentonita-Na y BTEA-Bent

La señal característica de la sal de amonio utilizada está localizada a 2982 cm^{-1} el cual se ve con poca intensidad en el espectro de la BTEA-Bent a 2989 cm^{-1} .

A 1645 cm^{-1} se presenta una banda propia de las vibraciones tipo flexión del grupo hidróxido de la bentonita.

En el espectro de la bentonita modificada con BTEA se aprecian picos de mediana intensidad a 1482 y 1397 cm^{-1} debido a la torsión de los enlaces C-H, característicos del cloruro de benciltrietilamonio, los cuales no aparecen en el espectro de la Bentonita-Na debido a que ésta no fue intercambiada con los cationes orgánicos.

Las vibraciones asimétricas de los enlaces tipo amida (C-N) presentes en la arcilla modificada con la sal de amonio se presentan en un rango entre 1150 y 850 cm^{-1} , en este mismo rango se encuentran las vibraciones de los enlaces Si-O-Si presentes en todas las arcillas por lo que estas señales estarían superpuestas.

2.6.2.2. Análisis de difracción de rayos X (DRX) de la bentonita-Na y BTEA-Bent

En el difractograma de la arcilla natural se verifica la presencia de la señal esmectita en $6.5^\circ 2\theta$ y las impurezas de cuarzo en $19.7^\circ 2\theta$. La señal presente a $6.5^\circ 2\theta$ correspondiente a un estado basal $d_{001} = 13,6\text{ \AA}$ sufre alteración durante el proceso de modificación con los cationes de amonio cuaternarios, presentando un desplazamiento a ángulos 2θ menores.

Al comparar el patrón de difracción de rayos X de la arcilla modificada con BTEA con respecto al de la arcilla sódica, (figura 11), se observan diferencias en la señal correspondiente al espaciado basal. El desplazamiento de la reflexión d_{001} correspondiente al espaciado basal de 13,6 Å para la arcilla de partida (Bentonita-Na) a 15.7 Å en la organoarcilla confirma la modificación estructural del sólido. Este aumento en el espacio basal es debido al intercambio exitoso del catión Na^+ por un catión de mayor tamaño (benciltriethylamonio).

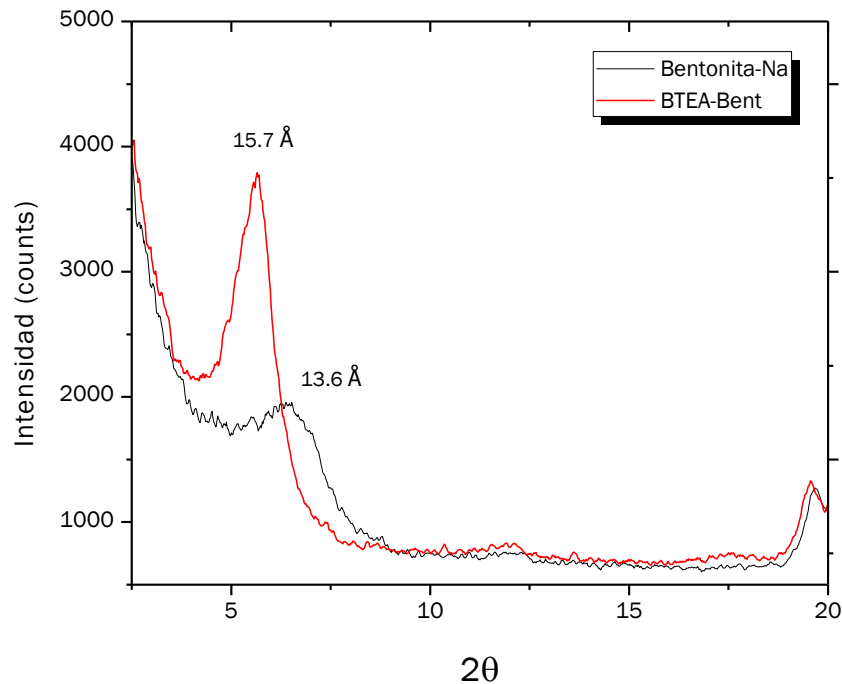


Figura 11: DRX de la bentonita sódica y bentonita modificada con BTEA

La arcilla modificada presenta una señal más angosta y definida que la arcilla de partida, lo cual indica que en la bentonita modificada, el BTEA se ha incorporado de manera uniforme en el espaciado interlaminar. Teniendo en cuenta el desplazamiento de la reflexión d_{001} , se puede inferir el tipo de ordenamiento de los cationes orgánicos en el espacio interlaminar. El espaciado de 17.7 Å generalmente se relaciona con un ordenamiento correspondiente a un arreglo tipo bicapa (77), por lo que el espaciado basal que se determinó para la bentonita modificada (15.7 Å) se puede relacionar con la adsorción en arreglo tipo bicapa.

2.6.2.3. Análisis textural de la bentonita-Na y BTEA-Bent

En la Figura 12 se muestran las isothermas de adsorción-desorción de N_2 para la Bentonita-Na y BTEA-Bent. De acuerdo con la clasificación de la IUPAC para las isothermas de adsorción y los ciclos de histéresis, las dos isothermas son del tipo II, características de los sólidos de textura heterogénea; e histéresis tipo H3. Este tipo de

bucle de histéresis es característico de materiales con poros en forma de hendidura abierta con paredes paralelas (rendija).

Las isothermas que se muestran en la Figura 12 presentan una parte inicial correspondiente a la formación de la monocapa (zona microporosa) y la restante a la adsorción en multicapa (zona mesoporosa). Se observa que el tratamiento de intercambio con la sal de amonio no ha modificado los ciclos de histéresis de las isothermas, las cuales corresponden al tipo H3 que se atribuye a sólidos con poros laminares.

Se aprecia una reducción del área superficial BET y una disminución en el área micro y mesoporosa, como consecuencia lógica del llenado de poros por las largas cadenas orgánicas.

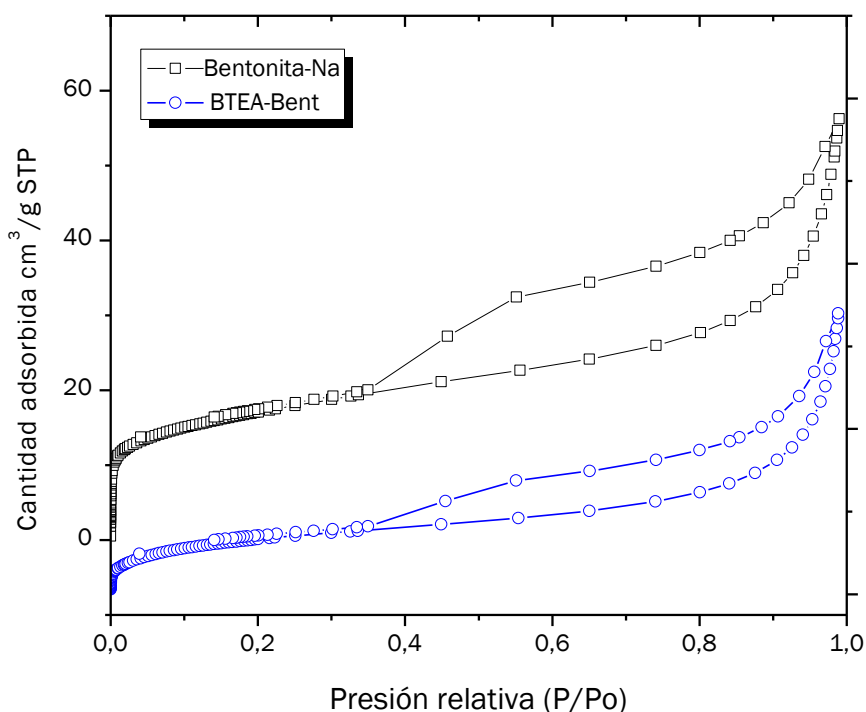


Figura 12: Isothermas de adsorción y desorción para la bentonita-Na y BTEA-Bent

Los resultados de los análisis de textura se muestran en la siguiente Tabla. (Tabla 8)

Tabla 8: Resultados de textura de la bentonita-Na y bentonita modificada con BTEA

Muestra	Area superficial BET (m ² /g)	Volumen de microporo (cm ³ /g)	Tamaño del poro (Å)
Bentonita-Na	59.1	0.0054	8.625
BTEA-Bent	23.6	0.0005	11.973

Se comprobó la modificación química, estructural y textural de la bentonita al ser intercambiada con la sal de amonio cuaternario.

CAPÍTULO 3: INMOVILIZACIÓN DE LIPASAS

En este capítulo se describe el procedimiento de inmovilización de las lipasas de *Candida rugosa* y *Rhizopus oryzae*, en dos soportes producidos en este trabajo, la quitina y BTEA-Bent, por métodos de enlace covalente con glutaraldehído como agente bifuncional, e interacciones hidrofóbicas, respectivamente. El procedimiento de inmovilización se llevó a cabo a diferentes temperaturas (30, 35 y 40 °C) y pH (6.5, 7.0 y 7.5), valores que se seleccionaron debido a que son cercanos a las condiciones óptimas reportadas para estas lipasas y a que no son condiciones que afecten la estructura de la enzima. Se realizó la medición de la actividad enzimática siguiendo una reacción de hidrólisis de aceite de oliva. El contenido de proteína de la enzima inmovilizada fue hallado por los métodos Biuret y Bradford.

3.1. Materiales

Lipasa de *Candida rugosa* tipo VII de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, US), esta muestra comercial está compuesta por un 83 % de la isoenzima “Lip 1” o “LIP B” y un 17% de la isoenzima “Lip 3” o “LIP A” (79).

Lipasa de *Rhizopus oryzae* de Fluka.

Ambas lipasas se caracterizaron midiendo la actividad de hidrólisis de aceite de oliva y el contenido de proteína por los métodos Biuret y Bradford, respectivamente.

Bentonita modificada con cloruro de benciltrietilamonio (BTEA-Bent).

Quitina con un grado de desacetilación de 37,2%

Albúmina bovina (*Fluka*), glutaraldehído (25% en agua) obtenido de Fisher Scientific, ácido o-fosfórico 85% (*Scharlau*), Azul de Coomassie G-250 (*Merck*), sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - *Merck*), tartrato de sodio y potasio ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ - *Merck* 99%), aceite de oliva (marca comercial), todos los demás reactivos fueron de grado analítico de casas comerciales reconocidas.

3.2. Equipos

Para llevar a cabo la inmovilización de las enzimas se utilizaron los siguientes equipos:

- Placa de agitación magnética VELP SCIENTIFICA.
- Centrifuga INDULAB Ref. 004 special.

- Espectrofotómetro GENESYS™ 20 ThermoSpectronic.
- Estufa Binder series ED

3.3. Métodos analíticos empleados

3.3.1. Determinación de la proteína.

La cantidad de enzima inmovilizada en los soportes se determinó con la medida de las concentraciones en la solución enzimática inicial (mg proteína inicial) y la concentración en el sobrenadante y en las soluciones de lavado (mg proteína final) usando los métodos Biuret y Bradford para las soluciones de las lipasas de *Candida rugosa* y *Rhizopus oryzae* respectivamente, esto debido a los rangos de concentración en los cuales los métodos son adecuados.

A partir de estos datos se calcularon los parámetros de porcentaje de inmovilización y mg de proteína/g de soporte utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Inmovilización} = \frac{\text{mg proteína inicial} - \text{mg proteína final}}{\text{mg proteína inicial}} * 100 \quad (2)$$

$$\frac{\text{mg proteína}}{\text{g soporte}} = \frac{\text{mg proteína inicial} - \text{mg proteína final}}{\text{g soporte}} \quad (3)$$

3.3.1.1. Método Biuret

Los compuestos que tienen dos o más enlaces peptídicos, dan un color rosado o lila característico cuando se tratan con sulfato de cobre en solución alcalina. El color es debido al complejo de coordinación del ión cúprico con cuatro átomos de nitrógeno, provenientes de los enlaces peptídicos, dos de cada péptido. La intensidad del color generado es proporcional al número de enlaces péptidos que participan en la reacción, esta es la base para un simple y rápido método colorimétrico para la cuantificación de la concentración de proteína total.

Para la preparación del reactivo Biuret se disolvieron 1,5 g de sulfato de cobre (III) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y 6,0 g de tartrato de sodio y potasio ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) en 500 ml de agua destilada. Luego se adicionó 300 ml al 10% de NaOH con agitación constante. Se diluyó 1 a 1 con agua destilada y se dejó en reposo en una botella de polietileno.

Para determinar la concentración de proteína, a 200 μl de la muestra se le adicionaron 800 μl del reactivo Biuret, se agitó la mezcla y se dejó en reposo durante 30 min a temperatura ambiente y en la oscuridad, luego se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

Este método se utilizó para la determinación de la concentración de la lipasa de *Candida rugosa*, debido al rango de sensibilidad del mismo, el cual se encuentra entre

1 y 10 mg. La curva de calibración del método se realizó en un rango de concentración entre 1 y 3 mg/ml (80). Ver Anexo 1.

3.3.1.2. Método Bradford

Esta prueba tiene la ventaja de ser una prueba rápida y fácil de realizar y se desarrolla a temperatura ambiente. Para preparar el reactivo Bradford se disolvieron 100 mg de azul de Coomassie G-250 (0,01% p/v final) en 50 ml de etanol 95% (4,7% final), en seguida se adicionaron 100 ml de ácido orto fosfórico (8,5% p/v final) en un baño de hielo y se completó el volumen hasta 1 litro, se filtró algunas veces hasta una absorbancia de 0.6-0.7.

Para determinar la concentración de proteína en una solución, por cada ml del reactivo Bradford se adicionó 20 µL de la muestra, se agitó la solución y después de 5 minutos se efectuó la lectura de absorbancia a 595 nm. La muestra es estable entre 5 y 20 minutos.

Este método se utilizó para la determinación de la concentración de la lipasa de *Rhizopus oryzae*, debido al rango de sensibilidad del mismo, el cual se encuentra entre 0,2 y 1 mg. La curva de calibración del método se realizó en este mismo rango de concentraciones (80). Ver Anexo 1.

En los dos métodos se hizo la comparación con un blanco de reactivos y se determinó la concentración de la muestra haciendo la interpolación con la curva patrón de albumina bobina (BSA) (80). Ver Anexo 1.

3.3.2. Actividad de hidrólisis de aceite de oliva.

La actividad hidrolítica de las dos lipasas de *Candida rugosa* y *Rhizopus oryzae* se determinó por titulación de los ácidos grasos liberados en la hidrólisis de los substratos nativos de la enzima (triacilglicéridos).

El procedimiento se realizó acorde con la metodología usada por Mendes et al. (2011), con algunas modificaciones, para la preparación del substrato se mezclaron 40.8 ml de buffer fosfato pH 7, 100 mM, 30 ml de aceite de oliva, 30 ml de agua destilada y 2.1 g de goma arábiga, hasta la formación de una emulsión estable. Para la mezcla de reacción se utilizaron 9 ml de la emulsión mas 1 ml de la solución enzimática o 200 mg del soporte con la enzima inmovilizada, se dejaron reaccionar por 5 min a 37 °C, la reacción se detuvo añadiendo 10 ml de etanol al 95% (81).

Los ácidos grasos liberados se titularon con KOH 0,025M, usando como indicador fenolftaleína. Para todas las pruebas se hizo un blanco de reactivos.

Para determinar la actividad relativa de las lipasas, los ácidos grasos liberados se calcularon basados en los equivalentes de KOH usados para alcanzar el punto final de la titulación, según la siguiente ecuación:

$$\frac{\mu\text{mol de ácidos grasos}}{\text{ml muestra} * \text{min}} = \frac{(A - B) * 1000 * N}{V_{rxn} * t} \quad (4)$$

Donde A es el volumen de KOH gastado por la muestra, B es el volumen de KOH gastado por el blanco, N es la normalidad del KOH, t es el tiempo de reacción y V_{rxn} , es el volumen del medio de reacción en ml.

La actividad específica de las lipasas se calculó conociendo la cantidad de enzima añadida usando la siguiente ecuación.

$$\text{Actividad específica lipasa libre} = \frac{(A - B) * 1000 * N}{t * C_E * V_E} \quad (5)$$

$$\text{Actividad específica lipasa inmovilizada} = \frac{(A - B) * 1000 * N}{t * g_{soporte} * \frac{mg_{proteina}}{g_{soporte}}} \quad (6)$$

Donde C_E es la concentración de la solución de la enzima y V_E es el volumen de solución de enzima (1 ml).

3.4. Procedimiento de inmovilización

El procedimiento utilizado para la inmovilización de las lipasas en quitina se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa la inmovilización se realizó por adsorción, se preparó 10 ml de la solución enzimática en buffer fosfato (pH 6.5, 7.0 y 7.5), la cual fue precalentada durante 2 horas a la temperatura de inmovilización evaluada (30, 35 y 40 °C) bajo agitación magnética suave, posteriormente se agrega el soporte en una relación del 10 % (p/v) y se mantiene con agitación y a la temperatura de inmovilización durante 22 horas. En la segunda etapa se añadió directamente sobre la suspensión el glutaraldehído (0,5%) y se dejó sin agitación durante 2 horas más (47).

La inmovilización en BTEA-Bent se llevó a cabo por las interacciones hidrofóbicas entre la superficie de la bentonita y la lipasa, este procedimiento es similar a la etapa de adsorción en la inmovilización en quitina.

Para finalizar se separó el sólido por centrifugación durante 30 min a 5700 rpm y se realizaron dos lavados con buffer fosfato al pH correspondiente. El soporte con la enzima inmovilizada se secó durante 12 h y se almacenó a 4 °C (Figura 13).

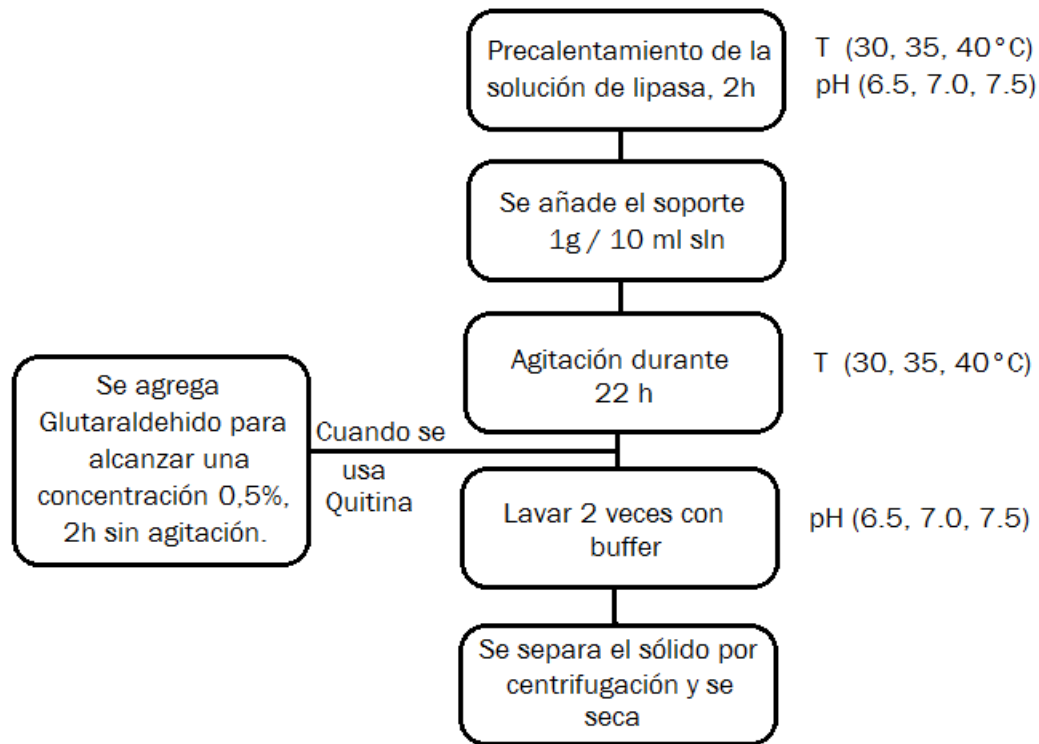


Figura 13: Diagrama general del proceso de inmovilización

En cada ensayo de inmovilización se determinó el porcentaje de inmovilización, la relación de mg de proteína / g de soporte, la actividad de la lipasa inmovilizada (μmol de ácidos grasos liberados mg de proteína $^{-1}$ min^{-1}) y el porcentaje de retención de actividad, el cual se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Retencion actividad} = \frac{\text{Actividad Final}}{\text{Actividad Inicial}} * 100 \quad (7)$$

3.5. Resultados y análisis

La caracterización de las lipasas utilizadas se muestra en la siguiente tabla. (Tabla 9)

Tabla 9: Características de las lipasas de *Candida rugosa* y *Rhizopus oryzae*

Lipasa	Actividad ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Contenido de proteína (%)
<i>Candida rugosa</i>	29.7	15.03
<i>Rhizopus oryzae</i>	585.3	0.91

En las Tablas 10 y 11 se muestran los resultados de porcentaje de inmovilización, la relación de mg de proteína / g de soporte y la actividad específica para las diferentes condiciones de inmovilización de las lipasas de *Candida rugosa* y *Rhizopus oryzae* inmovilizadas en quitina.

Tabla 10: Resultados de inmovilización para la lipasa de *Candida rugosa* en quitina

T °C	pH	% inmovilización	Actividad ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Retención actividad (%)
30	6.5	73.65	2.86	9.63
	7.0	54.00	5.80	19.51
	7.5	24.60	7.15	24.07
35	6.5	70.60	5.20	17.51
	7.0	53.13	2.73	9.19
	7.5	66.93	3.25	10.94
40	6.5	31.85	3.77	12.69
	7.0	46.67	0.71	2.39
	7.5	62.44	3.25	10.94

Tabla 11: Resultados de inmovilización de la lipasa de *Rhizopus oryzae* en quitina

T °C	pH	% inmovilización	Actividad ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Retención actividad (%)
30	6.5	53.47	0.74	0.20
	7.0	47.54	0.00	0.00
	7.5	61.04	0.00	0.00
35	6.5	72.17	1.12	0.31
	7.0	75.60	0.00	0.00
	7.5	83.90	22.10	6.03
40	6.5	80.04	0.31	0.08
	7.0	87.69	0.44	0.07
	7.5	85.80	0.24	0.07

Kılınça et al. (2006), utilizaron un procedimiento similar para inmovilizar una lipasa pancreática en quitina agregando el glutaraldehído después de una primera etapa de adsorción directamente a la solución enzimática, obteniendo un porcentaje de inmovilización del 23 % con una retención de la actividad de 13.6 % (47). En este trabajo se obtuvieron resultados similares a condiciones de inmovilización de 30 °C y pH 7.5 con un porcentaje de inmovilización del 24.6 % y la tasa de retención de actividad aun mayor del 24.07%.

Por otro lado Gomes et al. (2004), inmovilizaron la lipasa de *Candida rugosa* por unión covalente en quitina previamente activada con hexametildiamina y glutaraldehído obteniendo un porcentaje de retención de actividad máximo de 27% con un porcentaje de inmovilización del 80% (33).

La reducción de la actividad de la enzima es probablemente debida a las limitaciones conformacionales en los movimientos de la enzima como resultado de la unión multipunto de la enzima con el glutaraldehído y el soporte y la reacción de este agente bifuncional con grupos funcionales de la lipasa importantes para la acción catalítica de la enzima (47-48).

Para la lipasa de *Rhizopus oryzae* en el proceso de inmovilización se obtuvieron porcentajes de inmovilización altos entre 47 y 88 %, aunque se puede ver que este procedimiento de inmovilización afecto en gran medida la actividad de la enzima, pues apenas un 6 % de la actividad inicial de la enzima se conservó en el soporte, en

algunas condiciones se perdió completamente la actividad de la lipasa. El glutaraldehído es un agente bifuncional que reacciona con los grupos amino de la enzima y de la quitina, permitiendo que una mayor cantidad de enzima se una al soporte aunque con una baja actividad, como es el caso, esto probablemente es debido al impedimento estérico ocasionando por el aumento del nivel de polimerización entre la enzima y el soporte que impide el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima inmovilizada (48).

Las mejores condiciones para la lipasa de *Rhizopus oryzae* se encontraron a 35°C y pH 7.5 donde se obtuvo un porcentaje de inmovilización del 83.9% con una actividad específica de 22.1 μmol de ácidos grasos/mg min (6% de la actividad de la lipasa libre).

Con este protocolo de inmovilización se obtuvieron mejores resultados con la lipasa de *Candida rugosa*, aunque se debe tener en cuenta que el glutaraldehído es tóxico y causa la desnaturalización de la lipasa, por lo tanto se deben estudiar los efectos de la concentración del glutaraldehído sobre el rendimiento de inmovilización y actividad de la enzima (48). La lipasa de *Rhizopus oryzae* pierde mucha actividad y al ser una enzima tan costosa no es una buena elección para ser empleada en un pre-tratamiento enzimático de aguas residuales industriales con altos contenidos de grasas.

En las Tabla 12 y 13 se muestran los resultados de porcentaje de inmovilización, la relación de mg de proteína / g de soporte y la actividad específica para las diferentes condiciones de inmovilización de las lipasas de *Candida rugosa* y *Rhizopus oryzae* inmovilizadas en BTEA-Bent.

Tabla 12: Resultados de inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa* en BTEA-Bent.

T °C	pH	% inmovilización	Actividad ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	Retención actividad (%)
30	6.5	78.95	2.23	7.49
	7.0	76.15	2.50	8.40
	7.5	77.57	1.91	6.41
35	6.5	72.50	3.14	10.57
	7.0	48.05	4.36	14.68
	7.5	78.00	1.51	5.08
40	6.5	82.15	2.94	9.90
	7.0	69.05	2.97	10.0
	7.5	62.40	2.17	7.29

Tabla 13: Resultados de inmovilización de la lipasa de *Rhizopus oryzae* en BTEA-Bent.

T °C	pH	% inmovilización	Actividad ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	Retención actividad (%)
30	6.5	100	10.35	2.82
	7.0	98.54	3.26	0.56
	7.5	96.55	5.59	1.52
35	6.5	100	3.94	1.07
	7.0	98.9	5.70	0.97
	7.5	98.3	3.33	0.91
40	6.5	100	8.45	2.30
	7.0	98.40	6.30	1.08
	7.5	100	2.85	0.78

En el proceso de inmovilización por adsorción de la lipasa de *Candida rugosa* sobre una organoarcilla, se alcanzaron porcentajes de inmovilización entre 48 y 82% aunque con una retención de la actividad baja, entre 7.29 y 14.68 %.

La bentonita como soporte para la inmovilización de enzimas es un soporte poco estudiado, Yesiloglu (2005), utilizó bentonita sin modificar para inmovilizar la lipasa de *Candida rugosa* obteniendo 30% de retención de la actividad de la enzima (37). Ghiaci et al. (2009), inmovilizaron la lipasa de *Candida rugosa* en bentonita sódica y bentonita modificada con bromuro de cetiltrimetilamonio, encontrando que con el incremento en la lipofilidad de la bentonita, la lipasa mostraba una remarcable actividad en comparación con la bentonita sin modificar aunque, si el surfactante se recubría en una irregular bicapa la lipasa perdía su actividad, con el mejor soporte encontrado la enzima retenía un 56.6% de la actividad inicial (51). Dong et al. (2012), trabajaron con bentonita sódica y bentonita modificada con bromuro de cetilmetilamonio para inmovilizar una lipasa pancreática, como resultados encontraron que la lipasa inmovilizada en bentonita modificada con un 100% de la CIC de la bentonita-Na tenía una actividad específica mayor que la lipasa libre, esto se atribuyó a la activación interfacial por el microambiente hidrófobo y una superficie altamente dispersa creada por la organobentonita.

En este trabajo se modificó la bentonita con una cantidad de sal igual a 2.1 veces la CIC de la bentonita (47 meq/100 g), se utilizó una sal de amonio diferente a la

utilizada por los autores antes mencionados, esta sal tiene una cadena aromática, la cual se adsorbió como bicapa en los espacios interlaminares de la arcilla, provocando la formación de agregados de enzima sobre la superficie y la distorsión de su estructura terciaria y/o un posible bloqueo o inhibición del acceso del sustrato al sitio activo de la enzima, por tal motivo se obtuvieron porcentajes de retención de actividad bajos para las dos lipasas evaluadas.

Las condiciones más favorables para la inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa* en BTEA-Bent fueron 35°C y pH 7 a pesar que es el menor porcentaje de inmovilización pues retiene la mayor parte de la actividad de la lipasa de *Candida rugosa* (14.68%).

Los resultados de inmovilización de la lipasa de *Rhizopus oryzae* en bentonita son muy similares a los encontrados para la lipasa de *Candida rugosa* con altos porcentajes de inmovilización y con una reducción considerable de la actividad de la lipasa de *Rhizopus oryzae*, donde solo se retuvo 2.8% de la actividad inicial de la enzima. Los porcentajes de inmovilización del 100% son debido a la relación entre la cantidad de enzima utilizada y capacidad de adsorción del soporte, en donde se utilizó una cantidad de enzima menor a la capacidad máxima de adsorción de la bentonita.

A pesar de que los valores de actividad específica del sistema de la lipasa de *Rhizopus oryzae* - BTEA-Bent son más altos que los alcanzados con el sistema de la lipasa de *Candida rugosa* - BTEA-Bent, en el proceso de inmovilización se pierde gran parte de la actividad de la enzima lo que hace que este no sea eficiente y no sea adecuado para un tratamiento enzimático de aguas residuales.

CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE ESTABILIDAD Y CINÉTICO DE LA LIPASA INMOVILIZADA

De los resultados obtenidos, se escogió el mejor soporte y con éste se realizó el estudio de estabilidad de la enzima inmovilizada frente al pH y la temperatura; se establecieron los parámetros cinéticos de la reacción de hidrólisis en una muestra de agua residual proveniente de el proceso de elaboración de quesos; se evaluó la eficiencia en la reducción de parámetros de contaminación en aguas residuales, como son grasas totales y la demanda química de oxígeno (DQO) después de un tratamiento enzimático de 19 h; y por último, se hizo el seguimiento de la estabilidad operacional del sistema biocatalítico, midiendo la reducción de grasas en la muestra preparada después de 3 ciclos de reacción de la enzima inmovilizada.

4.1. Materiales

Lipasa de *Candida rugosa* tipo VII de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, US), ver características en la Tabla 9.

Se utilizó como sustrato una muestra de agua residual de la elaboración de quesos, productos de la industria láctea con las siguientes características:

Tabla 14: Características del medio preparado

Parámetro	Valor	Método
Grasas totales (ppm)	1521	Soxhlet
Demanda Química de Oxígeno (DQO) - (mg/L)	68196.7	Método del dicromato potásico
pH	6.8	pH-metro

Hexano 96%, tierra silíceo, solución de dicromato de potasio 0.1 N, ácido sulfúrico 95-97%, Sulfato de Amonio Ferroso (FAS), reactivos necesarios para la determinación de grasas totales y DQO. Todos estos reactivos, entre otros, fueron suministrados por Merck y otras casas comerciales reconocidas.

4.2. Equipos

- Bomba de Vacío
- Placa de agitación magnética VELP SCIENTIFICA.
- Estufa Binder ED

- Centrifuga INDULAB Ref. 004 special.
- Espectrofotómetro GENESYS™ 20 Thermo Spectronic.
- Extractor de grasas – Soxhlet.

4.3. Selección del mejor sistema enzima-soporte

El proceso de inmovilización con la lipasa de *Rhizopus oryzae* a las condiciones evaluadas, no arrojó buenos resultados, pues aunque se inmovilizó la mayor parte de la enzima se perdió gran parte de la actividad además de su alto costo, por tal motivo se descartó como posible sistema biocatalítico y se decidió trabajar con la lipasa de *Candida rugosa*.

Cada sistema biocatalítico fue evaluado en el medio de prueba, se siguió la reacción por el cambio de pH ya que los ácidos grasos liberados por la actividad de la lipasa se ionizan en solución acuosa mediante la pérdida de protones y la mezcla de reacción tiende a acidificarse, la velocidad de liberación de los ácidos grasos es proporcional a la velocidad de liberación de los protones; además el mejor sistema biocatalítico se comparó con la lipasa de *Mucor miehei* inmovilizada comercialmente en una resina macroporosa de intercambio iónico, utilizada anteriormente en el grupo de investigación.

4.4. Efecto de la temperatura y pH en la estabilidad enzimática. Diseño experimental.

La metodología de superficie de respuesta (MSR) fue usada para modelar la estabilidad del sistema biocatalítico, y hallar las condiciones de temperatura y pH que mejor preserven la actividad de hidrólisis de aceite de oliva de la enzima inmovilizada luego de 1 h de exposición a las diferentes condiciones del proceso. Con la MSR, se puede probar simultáneamente el efecto de diversas variables con un mínimo de ensayos acorde a arreglos experimentales basados en diseños factoriales. La respuesta es descrita por una ecuación polinomial como una función de las p variables independientes. Usualmente, esta respuesta es bien modelada por una ecuación polinomial de primer o segundo orden que representa una superficie de dimensión $(p+1)$, que se conoce como la superficie de respuesta. Los parámetros de estas ecuaciones son normalmente desconocidos y, por lo tanto, deben ser estimados a partir de los datos experimentales usando el principio estadístico de mínimos cuadrados. Además, la diferenciación parcial de las ecuaciones polinomiales es empleada para encontrar el óptimo de la función multivariable, estos valores óptimos son llamados puntos estacionarios. Los resultados obtenidos en este trabajo fueron procesados con el software Design-Expert 8.0 (82-84).

Los ensayos fueron llevados a cabo siguiendo un diseño experimental factorial 3^2 completamente aleatorio, como función de la temperatura (30, 40 y 45 °C) y pH (5.5, 6.5 y 7.5), como variable de respuesta se midió el porcentaje de retención de actividad. De esta forma se realizaron un total de 9 ensayos.

Se incubaron muestras de 0.1 g de CR/BTEA-Bent en 2 ml de buffer fosfato durante una hora a las diferentes condiciones de pH y temperatura, después del tiempo

establecido se refrigeraron las muestras y se midió la actividad de hidrólisis de aceite de oliva. Los ensayos se hicieron por duplicado, los datos corresponden al promedio de los resultados.

4.5. Determinación de parámetros cinéticos

Se calcularon los parámetros cinéticos para la hidrólisis de grasas en la muestra preparada, con la lipasa libre e inmovilizada. Para determinar la relación entre la concentración del sustrato y la velocidad de reacción enzimática se aplicó la ecuación de Michaelis-Menten. Ecuación (7)

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (7)$$

Donde v y V_{max} son la velocidad y velocidad máxima de reacción respectivamente ($\mu\text{mol ml}^{-1} \text{min}^{-1}$), $[S]$ es la concentración del sustrato (ppm) y K_m es la constante de Michaelis (ppm). Los valores de V_{max} y K_m se obtienen de la gráfica de Lineweaver-Burk.

Se prepararon muestras con diferentes concentraciones de grasas ($[S] = 200, 400, 600, 800$ y 1000 ppm) a las cuales se les ajustó el pH a 7 con una solución de NaOH, se tomaron 5 ml y se precalentaron a 37°C durante 5 min, luego se añadieron 0.25 ml de la solución de lipasa de *Candida rugosa* (10 mg ml^{-1} en buffer fosfato pH 7) o 0.25 g de enzima inmovilizada, la reacción se llevó a cabo a 37°C y se detuvo con 10 ml de etanol 95%, los ácidos grasos se determinaron por titulación con KOH 0.025M y con fenolftaleína como indicador. Se calculó la concentración de ácidos grasos liberados utilizando la ecuación (8) en diferentes tiempos de reacción (3, 6 y 10 min). El blanco se realizó con una muestra sin tratamiento enzimático.

$$\frac{\mu\text{mol de ácidos grasos}}{\text{ml muestra}} = \frac{(A - B) * 1000 * N}{V_{rxn}} \quad (8)$$

Donde A es el volumen de KOH gastado por la muestra, B es el volumen de KOH gastado por el blanco, N es la normalidad del KOH y V_{rxn} , es el volumen del medio de reacción en ml.

4.6. Ensayo de hidrólisis de grasas en muestra de agua residual.

El mejor sistema enzima-soporte se probó midiendo la reducción de parámetros de calidad del agua residual como grasas y DQO, después del tratamiento con la lipasa inmovilizada a las condiciones óptimas de estabilidad térmica.

Esta prueba se llevó a cabo con el medio de prueba con alto contenido de grasas (1521 ppm). A 75 ml de la muestra se le ajustó el pH en 7 y se dejó durante 19 h a la temperatura de estabilidad óptima. Se midió el contenido de grasas y DQO al inicio y al final de tratamiento.

Se evaluó la estabilidad operacional del sistema biocatalítico repitiendo el tratamiento enzimático 2 veces más con medio fresco, después de cada ciclo de reacción se midió

el contenido de grasas al inicio y al final, el soporte se retiró por centrifugación y fue lavado con agua destilada para su posterior uso. Entre cada ciclo de reacción el sistema biocatalítico se almacenó durante una semana a 4 °C.

4.7. Resultados y análisis

Como se determinó en el capítulo anterior las mejores condiciones de inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa* en quitina fueron a 30 °C y pH 7.5 y en BTEA-Bent fueron a 35 °C y pH 7.

Para seleccionar el mejor sistema biocatalítico se ensayaron los dos en el medio de prueba donde el cambio de pH fue apreciable para el sistema CR/BTEA-Bent al contrario que para el sistema CR/Quitina el cual no presentó un cambio importante en el pH, estos resultados evidenciaron que este último sistema enzima-soporte no tenía un buen desempeño con este tipo de sustrato y no alcanzaba una reducción considerable de las grasas.

Por lo tanto el mejor sistema enzima-soporte es el establecido por la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada por adsorción sobre una bentonita modificada con benciltrietilamonio (CR/BTEA-Bent). Este sistema obtuvo una mayor actividad de hidrólisis de aceite de oliva ($4.36 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) que la determinada para la lipasa inmovilizada comercialmente *Mucor miehei* ($0.20 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$).

4.7.1. Estabilidad térmica y frente al pH

De acuerdo con el diseño experimental ya mencionado se determinó la actividad hidrolítica de cada una de las muestras después de 1 h de permanecer en solución acuosa a diferentes pH y temperaturas.

Los resultados de actividad de hidrólisis finales y del porcentaje de retención de actividad se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15: Resultados obtenidos en el diseño experimental para la evaluación de la estabilidad enzimática frente al pH y la temperatura.

Ensayos	Variables Reales		Actividad ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Retención Actividad (%)
	T (°C)	pH		
1	30	5.5	2.34	53.66
2	30	6.5	2.76	63.47
3	30	7.0	2.65	60.74
4	40	5.5	2.90	66.63
5	40	6.5	3.10	71.24
6	40	7.0	2.97	68.13
7	45	5.5	3.36	77.23
8	45	6.5	3.59	82.37
9	45	7.0	3.39	77.89

Los valores de actividad de hidrólisis estuvieron entre 2.34 (Retención Actividad = 53.66%) y 3.59 (Retención Actividad = 82.37%) $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$.

4.7.1.1. Ajuste de los modelos y análisis de varianza (ANOVA)

Los datos de porcentaje de retención de actividad de la Tabla 15 fueron procesados mediante el software Design-Expert 8.0 y se utilizó el análisis de varianza ANOVA para obtener la interacción entre las variables de proceso y la respuesta (porcentaje de retención de actividad). La significancia estadística del modelo y de cada término, con base en un análisis de regresión a un nivel de confianza del 95%, fueron hallados y sus valores se muestran en la Tabla 16. Un modelo cuadrático (sugerido por el software) fue usado para ajustar los datos resultantes mediante análisis de mínimos cuadrados. La calidad del ajuste del modelo polinomial fue expresada por el coeficiente de determinación R^2 . El modelo empírico obtenido para la variable de respuesta evaluada se presenta en la Tabla 17.

Tabla 16: Resultados del análisis de varianza para el modelo de estabilidad enzimática empleando Design-Expert 8.0

Términos	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrada	F - Valores	Probabilidad
Modelo	667.19	5	133.44	104.32	0.0015
pH	14.23	1	14.23	11.12	0.044
T	592.42	1	592.42	463.17	0.0002
pHT	10.30	1	10.30	8.06	0.0657
pH ²	49.60	1	49.60	38.78	0.0083
T ²	0.63	1	0.63	0.49	0.5342
Error Puro	671.02	8			

Tabla 17: Modelo empírico para la variable de respuesta en función del pH y la temperatura

Respuesta	Ecuación del modelo	R ²	R ² _{adj}
Retención Actividad (%) - R.A	R.A = -275.54 + 79.12 pH + 2.28 T - 0.32 pHT - 4.98 pH ² + 0.02 T ²	0.99	0.98

Los términos resaltados en gris son los términos no significativos

El F-valor del modelo de 104.32 y la probabilidad de 0,0015 implica que el modelo es significativo, lo que indica que la ecuación del modelo describe adecuadamente la superficie de respuesta del porcentaje retención de actividad en el intervalo de investigación. Los valores de probabilidad < 0,05 indican que los términos del modelo son significativos, por lo tanto para este caso los términos que tienen mayor efecto en la variable de respuesta son pH, T y pH² siendo la temperatura el término que más influyó la estabilidad del sistema CR/BTEA-Bent.

En la Figura 14 se muestran los porcentajes de retención de actividad experimentales contra los encontrados por el modelo empírico para el sistema biocatalítico, se prueba que los datos de la respuesta predichos por el modelo empírico están de acuerdo con los experimentales en el rango de variables evaluados. El alto valor del ajuste de datos, $R^2 = 0.99$ indican que el modelo se adecuó bien a los datos obtenidos.

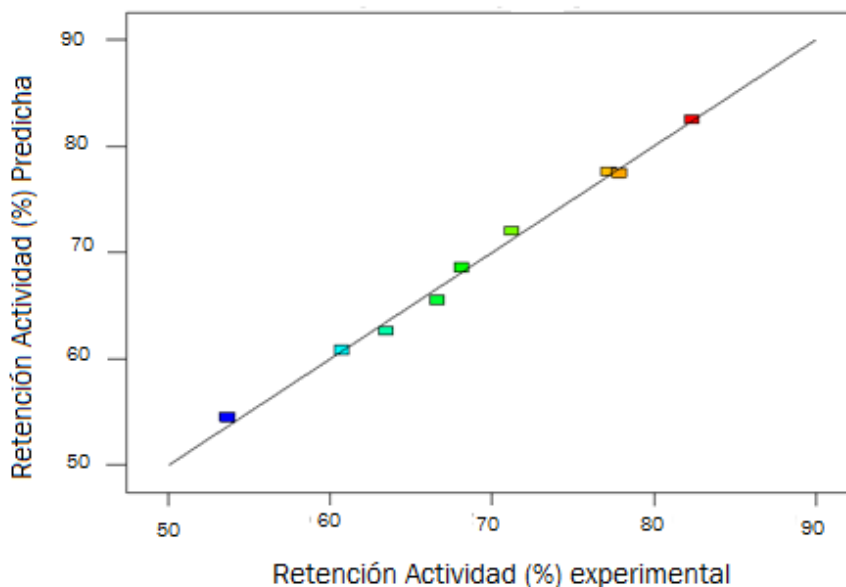


Figura 14: Datos de porcentaje de retención de actividad experimentales vs datos predichos por el modelo

Las condiciones de operación que maximizan la respuesta en el rango evaluado fueron encontradas igualando las derivadas parciales de las ecuaciones del modelo (Tabla 17) a cero con respecto a las correspondientes variables.

En la Figura 15 se muestran, las gráfica de contorno (a) y la superficie de respuesta (b), para el sistema CR/BTEA-Bent. Se observa que al aumentar la temperatura se incrementa la estabilidad del sistema catalítico y el pH óptimo es de 6.5.

Se presentó la mayor retención de actividad a las condiciones del ensayo No. 8, que corresponden a 45°C y pH 6.5. El modelo generado por el análisis MSR mediante el software Design Expert 8.0 predijo que efectivamente se espera la mayor retención de actividad alrededor de este punto experimental. Dicho modelo se ajustó adecuadamente a los resultados de los ensayos en todo el rango de estudio de los factores, lo que se demuestra con su alto factor de correlación ($R^2 = 0,99$). Estos resultados indican que la inmovilización preserva la estructura de la enzima de la desnaturalización por efecto de la temperatura. La resistencia térmica de la lipasa inmovilizada es una ventaja potencial para aplicaciones prácticas de la enzima.

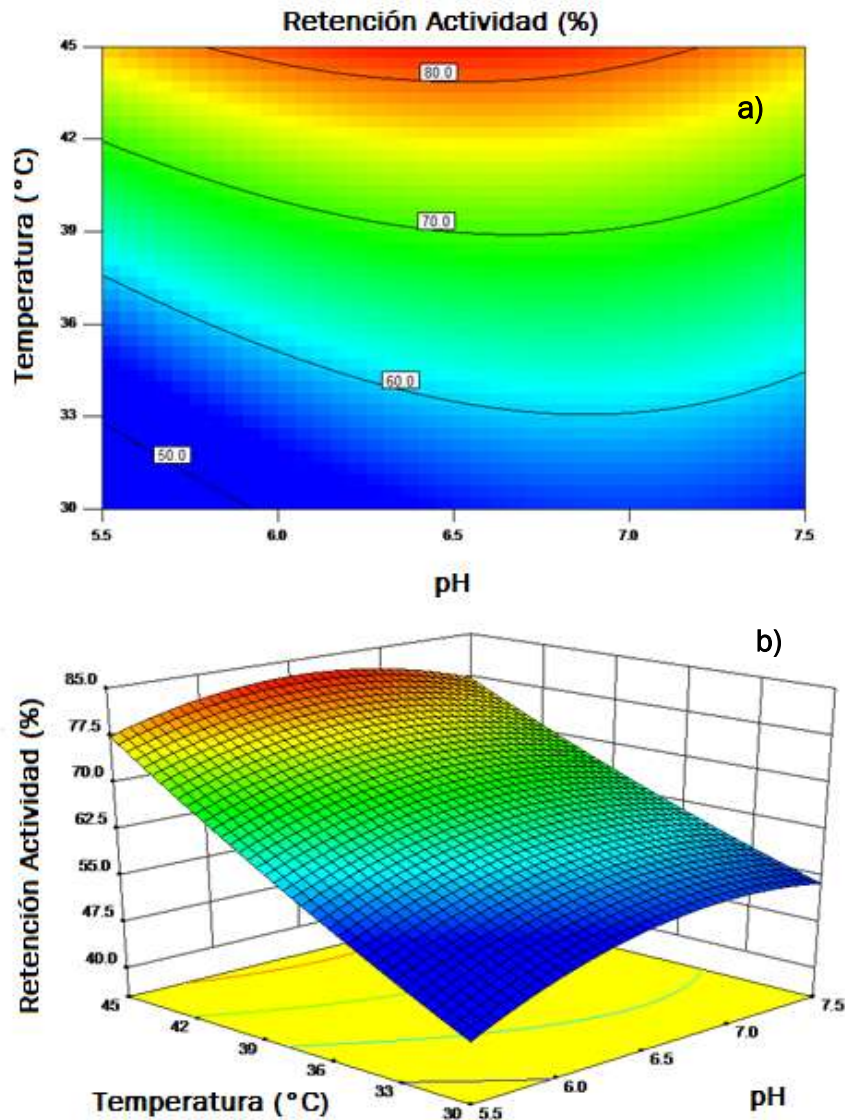


Figura 15: Resultados gráficos del análisis de los datos experimentales de retención de actividad del sistema CR/BTEA-Bent (a) Gráfica de contorno (b) Superficie de respuesta.

4.7.2. Cinética de hidrólisis

Para el cálculo de la velocidad inicial de reacción (v) se construyó la gráfica de concentración de ácidos grados liberados frente al tiempo de reacción. La velocidad inicial de reacción se determina usualmente tan próxima al tiempo cero como sea posible. Ecuación (4) a los 3 min de reacción.

La velocidad inicial de reacción frente a la concentración del sustrato para la enzima libre e inmovilizada se muestra en la Figura 16.

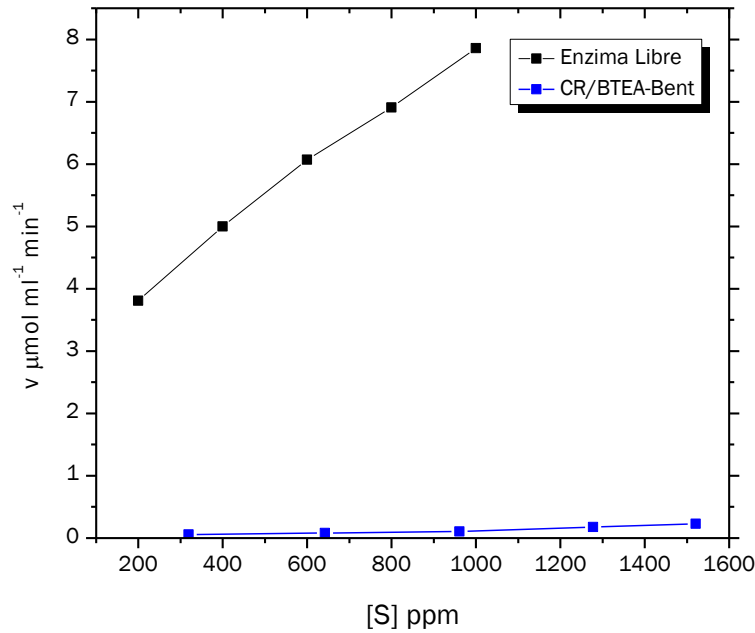


Figura 16: Velocidad inicial de reacción (v) de Michaelis-Menten frente a la concentración del sustrato ($[S]$) para la lipasa libre e inmovilizada.

Para efectuar la gráfica de Lineweaver-Burk (Figura 17) se representa $1/v$ vs $1/[S]$ para obtener una relación lineal, permitiendo la determinación de las constantes de Michaelis-Menten a partir de la intersección de $1/[S]$ y $1/v$ con los ejes, mediante la siguiente ecuación de la línea recta:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (9)$$

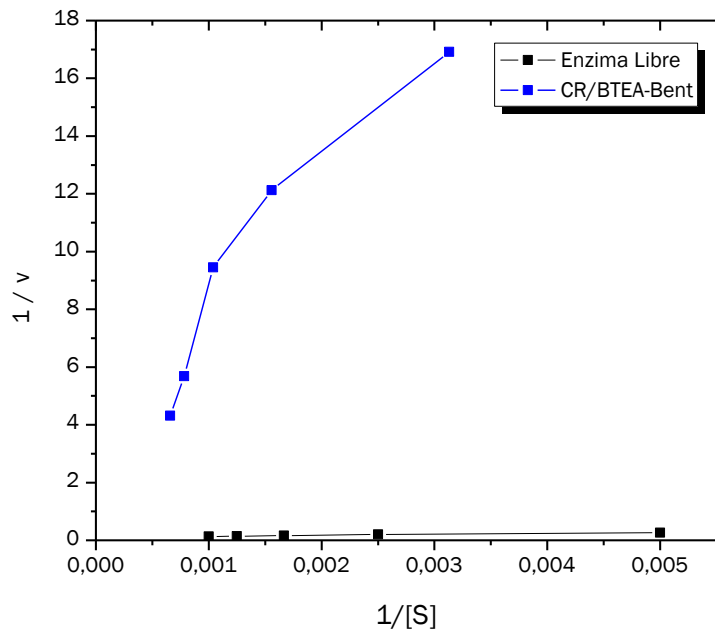


Figura 17: Gráfico de Lineweaver-Burk para la lipasa libre e inmovilizada

En la Tabla 18 se muestran los valores de V_{\max} y K_m para la lipasa de *Candida rugosa* libre e inmovilizada en la reacción de hidrólisis de grasas de la muestra preparada.

Tabla 18: Parámetros cinéticos de la lipasa de *Candida rugosa* libre e inmovilizada basados en la ecuación de Michaelis-Menten

Lipasa	K_m (ppm)	V_{\max} ($\mu\text{mol/ml min}$)	R^{2*}
Libre	309.43	9.524	0.969
CR/BTEA-Bent	1647.3	0.345	0.899

El valor de K_m para la enzima inmovilizada es aproximadamente 5 veces mayor que el valor para la enzima libre, un incremento similar al obtenido por Jeganathan et al. (2007), donde la lipasa de *Candida rugosa* fue inmovilizada en un híbrido alginato de calcio/sol-gel y se utilizó como sustrato un agua residual de una industria de alimento para mascotas, para este estudio el valor de K_m para la enzima inmovilizada fue 6 veces mayor que el de la enzima libre, aunque los valores de V_{\max} fueron similares para la enzima libre e inmovilizada (40).

El incremento en el valor de K_m indica que la enzima inmovilizada tiene menor afinidad por el sustrato que la enzima libre, esto es probablemente por el impedimento estérico del sitio activo por el soporte, la pérdida de flexibilidad de la enzima necesaria para unirse al sustrato o la resistencia difusional para el transporte de solutos cerca de las partículas (51). La velocidad máxima también disminuyó lo que sugiere un posible bloqueo del sitio activo de la enzima.

4.7.3. Evaluación del sistema biocatalítico en el pre-tratamiento de aguas residuales con altos contenidos de grasas

Del estudio de estabilidad del sistema biocatalítico, CR/BTEA-Bent las mejores condiciones de estabilidad son 45°C y pH 6.5, a las cuales se desarrollo el tratamiento enzimático de la muestra preparada durante 19 h, los resultados se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19: Eficiencia del tratamiento enzimático de la muestra preparada con el biocatalizador

Muestra	pH	Grasas (ppm)	DQO (mg/L)
Inicio	7.0	1521	68196.7
Final	5.62	503.1	55081.9

Después del tratamiento enzimático se alcanza una remoción de las grasas y la DQO del 66.9% y 19.2%, respectivamente. Estos resultados son comparables con los obtenidos por otros autores que han trabajado en el pre-tratamiento de esta clase de aguas residuales con lipasas inmovilizadas. Los resultados de Jeganathan et al. (2006), mostraron que se redujo entre un 40 y 60% las grasas durante 3 días de tratamiento con la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en alginato de calcio, estos mismos autores en otro trabajo obtuvieron una reducción de las grasas entre el 48 y 32%, en un agua residual de una industria de alimentos para mascotas utilizando la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en un híbrido alginato de calcio/sol-gel (40, 62). En ambos casos no hay una reducción apreciable de la DQO después del pre-tratamiento, debido a que se generan ácidos grasos de cadenas largas y ácidos grasos volátiles que son productos solubles, lo que aumenta la DQO soluble y no induce a un cambio apreciable en el valor de la DQO total, pero es un factor favorable para el tratamiento biológico posterior pues aumenta la biodegradabilidad del agua residual, reduciendo la DQO total y las grasas en un 65 y 64% después del tratamiento anaerobio posterior.

Dumore et al. (2012), utilizaron una lipasa de *Aspergillus niger* inmovilizada en quitosano obteniendo una reducción en la concentración de las grasas y la DQO del 48 y 47% después de 3 días de hidrólisis enzimática.

Estos resultados confirman que el sistema biocatalítico desarrollado en este trabajo es efectivo como un pre-tratamiento de aguas residuales con alto contenido de grasas, pues se obtiene una reducción considerable de las grasas y aumenta la biodegradabilidad de este residuo.

En el tratamiento biológico posterior, el proceso de digestión consiste en la hidrólisis de las partículas orgánicas a substratos solubles, lo cual es la etapa limitante del proceso de degradación, debido a que para los microorganismos, la mayor parte de la fuente de carbono no se encuentra en forma soluble, dificultándose el acceso de los compuestos orgánicos al interior de las células. Como se muestra en la Figura 18 (Tomada de (85)), según un modelo difusional por etapas de la degradación de cuatro grupos de compuestos que se citan a continuación:

Grupo A: Acetato y Metanol

Grupo B: Etanol y ácidos orgánicos volátiles de más de 3 átomos de carbono

Grupo C: Materia orgánica simple

Grupo D: Materia orgánica compleja.

La velocidad del proceso de degradación está en función a la clase de compuestos tratados, siendo la materia orgánica compleja (Grupo D) el tipo de compuestos de baja velocidad de degradación y que aumentan así el tiempo del tratamiento.

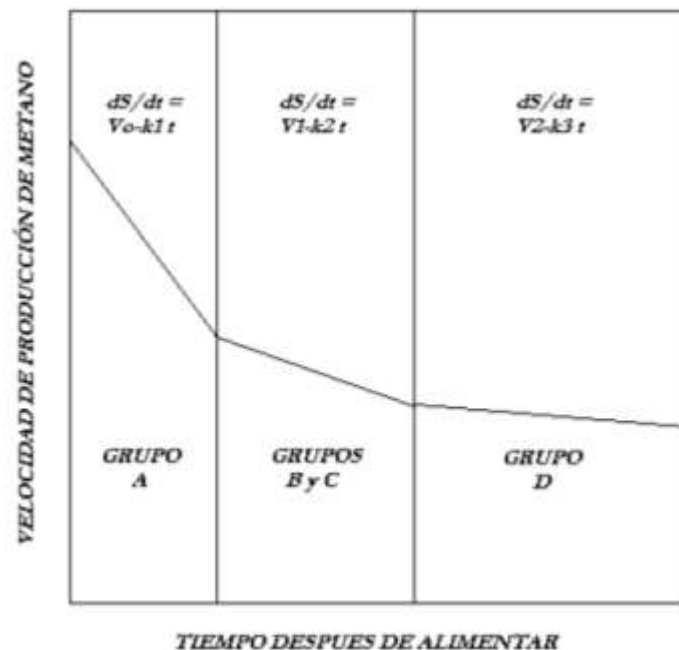


Figura 18: Esquema de degradación de los principales grupos de compuestos de acuerdo a un modelo difusional por etapas

Por lo anterior es evidente la importancia del pre-tratamiento enfocado a la hidrólisis de esta clase de compuestos complejos, como en este caso las grasas, para incrementar la velocidad de degradación de estos materiales en el tratamiento biológico posterior.

Se ha reportado la reducción de parámetros de contaminación como la DBO_5 (Demanda Bioquímica de Oxígeno) y el contenido de grasas después del tratamiento con lipasas de aguas residuales con concentraciones altas de grasas, mostrando la factibilidad del tratamiento enzimático y contribuyendo al incremento en la biodegradabilidad del agua residual.

Cammarota et al. (2001), realizaron el pre-tratamiento de un agua residual proveniente de una industria láctea con alto contenido de grasas (868 mg/l) utilizando una composición enzimática, la cual parcialmente degradó las grasas del agua residual, causando un decrecimiento en el tiempo de retención en el reactor biológico y redujo los problemas operacionales que causan las grasas. El reactor

UASB tuvo una mayor remoción de la DQO cuando el afluente fue previamente tratado con la composición enzimática que cuando no se trató el afluente (52).

Mendes et al. (2010), realizaron un pre-tratamiento de hidrólisis enzimática de aguas residuales de una industria láctea con una lipasa porcina pancreática encontrando una velocidad de reacción de biodegradabilidad y remoción de la DQO mayor en la muestra con el tratamiento enzimático que en la muestra sin tratar (57).

Este pre-tratamiento también soluciona problemas operacionales tales como la pérdida de eficiencia e incluso el colapso del reactor debido a la formación de espuma que causa la flotación de biomasa granular; la formación de capas de grasa en la superficie del reactor las cuales no se digieren; obstrucciones y malos olores debido a la solidificación de las grasas a bajas temperaturas, entre otros (86).

4.7.4. Estabilidad operacional de sistema biocatalítico CR/BTEA-Bent.

Se evaluó la estabilidad operacional de la enzima inmovilizada a las condiciones óptimas de estabilidad (45 °C y pH 6.5) y después de ser almacenada durante una semana antes del siguiente ciclo de reacción, los resultados en 3 ciclos de reacción fueron similares (Grasas final \approx 457.5 ppm) lo que significa una reducción de aproximadamente el 67% en el contenido de grasas en el medio preparado conservando su actividad catalítica durante el almacenamiento a 4 °C.

Los resultados son comparables con los reportados en la literatura científica donde se ha encontrado que la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada, utilizada para hidrólisis de grasas puede ser utilizada por 4 ciclos de reacción con una retención de la actividad del 55% (62).

Por último, se evidencia entonces, el potencial de la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en el pre-tratamiento enzimático de aguas residuales industriales con altos contenidos de grasas, pues se obtuvieron remociones de grasas y DQO considerables, lo que hace que estas aguas residuales aumenten su biodegradabilidad y se facilite un tratamiento aerobio o anaerobio posterior; además, la lipasa inmovilizada conserva su actividad y se puede reutilizar por lo menos tres veces más, removiendo en cada ciclo de reacción aproximadamente el 70% de las grasas.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES GENERALES

Mediante las técnicas de caracterización de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), difracción de rayos X (XRD) y el grado de desacetilación por un método potenciométrico, se comprobó que el material obtenido fue β -quitina, con baja cristalinidad debido a la naturaleza del tratamiento realizado con NaOH el cual degrada el polímero y residuos de carbonato de calcio debido a que el paso de desmineralización en el proceso de extracción no fue eficiente, además con un grado de desacetilación de 37.2%.

Se comprobó la modificación química, estructural y textural de la bentonita debido a la incorporación de manera uniforme del catión orgánico, benciltrietilamonio (BTEA), en el espacio interlamina de la bentonita en un arreglo tipo bicapa.

La lipasa de *Candida rugosa* soportó mejor el proceso de inmovilización por unión covalente que la lipasa de *Rhizopus oryzae*, aunque ambas lipasas se vieron afectadas por el glutaraldehído causando su desnaturalización y pérdida considerable de la actividad, inconveniente propio del método de inmovilización.

Para el protocolo de inmovilización por adsorción, la lipasa de *Candida rugosa* también mostró los mejores resultados, aunque con rendimientos de inmovilización moderados como es característico de este método de inmovilización, debido a que la unión de la enzima es mediante interacciones reversibles, este método fue más simple, rápido y efectivo en el medio de prueba.

La lipasa de *Rhizopus oryzae* en el proceso de inmovilización pierde gran parte de la actividad de la enzima ($\approx 94\%$), lo que hace que el proceso de inmovilización sea poco eficiente y no adecuado para un tratamiento enzimático de aguas residuales industriales.

El mejor sistema biocatalítico para la hidrólisis de grasas en aguas residuales fue el compuesto por la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada por adsorción sobre una bentonita modificada con benciltrietilamonio (CR/BTEA-Bent), este sistema es comparable con los biocatalizadores que se encuentran en el mercado, por ejemplo, con la lipasa *Mucor miehei* inmovilizada comercialmente en una resina macroporosa de intercambio iónico, lo que demuestra que la bentonita modificada es un material satisfactorio para la inmovilización de enzimas, pues es económico y brinda a la enzima condiciones adecuadas para su estabilidad y el eficiente desempeño en la hidrólisis de grasas.

El sistema biocatalítico CR/BTEA-Bent presentó la mayor retención de actividad a 45 °C y pH 6.5 indicando que el proceso de inmovilización preserva la estructura de la

enzima de la desnaturalización por efectos de la temperatura y le genera un microambiente que le permite trabajar a condiciones acidas. La resistencia térmica de la lipasa inmovilizada es una ventaja potencial para aplicaciones a gran escala.

La remoción de grasas y DQO de una muestra de agua residual con alto contenido de grasas utilizando la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en bentonita modificada fue del 66.9% y 19.2% respectivamente, confirmando que el sistema biocatalítico desarrollado en este trabajo es efectivo para ser utilizado en el pre-tratamiento de este tipo de aguas residuales, pues se obtienen una reducción considerable de las grasas y aumenta la biodegradabilidad de estas.

La enzima puede ser almacenada a 4 °C y reutilizada al menos 3 veces removiendo en promedio el 70% de las grasas en cada ciclo, lo que hace al sistema catalítico rentable y funcional como aplicación en el pre-tratamiento de aguas residuales con altos contenidos de grasas.

Entre los métodos convencionales para retirar las grasas antes de la biodigestión de las aguas residuales tales como: la filtración con membranas, la coagulación, la adsorción en carbón activado o quitosano, entre otros (5, 85), el tratamiento con enzimas inmovilizadas se propone como una alternativa, limpia y amigable con el ambiente, ya que se alcanzan remociones considerables de grasas (67%).

La enzima inmovilizada, se puede reutilizar, siendo esto una ventaja para emplear el sistema biocatalítico a gran escala, además, se facilita la biodegradación de los lípidos debido a la conversión de la materia orgánica en componentes de bajo peso molecular.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

La modificación de la bentonita debe realizarse evaluando otras concentraciones de la sal de amonio, cloruro de benciltrietilamonio, para tener un ordenamiento tipo monocapa que evite los impedimentos estéricos, la formación de agregados de enzima sobre la superficie y los posibles bloqueos del sustrato al sitio activo de la enzima y poder alcanzar una mayor retención de la actividad enzimática.

El glutaraldehído es un reactivo clave en el protocolo de inmovilización que se llevó a cabo en este trabajo, afectando seriamente la actividad de la enzima por lo que se debe determinar la concentración de glutaraldehído óptima en donde se alcance un equilibrio entre la cantidad de la enzima unida al soporte y la actividad retenida.

La lipasa de *Rhizopus oryzae* es una enzima con una gran actividad hidrolítica ($585,3 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$), se recomienda el estudio de otras condiciones de inmovilización o el uso de otros soportes donde se alcance una mayor retención de la actividad.

Para un seguimiento estricto de la reacción de hidrólisis y la determinación de parámetros cinéticos, se recomienda la determinación de los ácidos grasos volátiles o ácidos grasos de cadena larga por cromatografía de gases.

Se recomienda evaluar el efecto del pre-tratamiento de hidrólisis con el sistema CR/BTEA-Bent en el desempeño de un tratamiento biológico posterior ya sea anaerobio o aerobio.

Para la medición de la actividad hidrolítica de la enzima libre e inmovilizada se recomienda evaluar otros métodos más rápidos y precisos.

Es conveniente realizar un análisis más detallado y posiblemente un diseño experimental en el rango de las variables evaluadas donde se presentaron la mayor retención de actividad, con el fin de encontrar máximos y mínimos locales en esta región y poder hallar con mayor certeza las condiciones óptimas de estabilidad de la enzima.

Al obtener buenos resultados con el sistema biocatalítico CR/BTEA-Bent en la reacción de hidrólisis, también se recomienda ensayar el desempeño de éste en reacciones de síntesis en medio orgánico, por ejemplo, para la producción de monoglicéridos de amplio uso en la industria cosmética, farmacéutica y de alimentos.

ANEXO 1: CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS

Método Biuret. Carga de proteína.

Para el cálculo de la cantidad de proteína se realizó con anterioridad una curva patrón con albumina bovina, que relaciona la concentración de proteína y la absorbancia a 540 nm de longitud de onda. La curva patrón se muestra en la Figura 19.

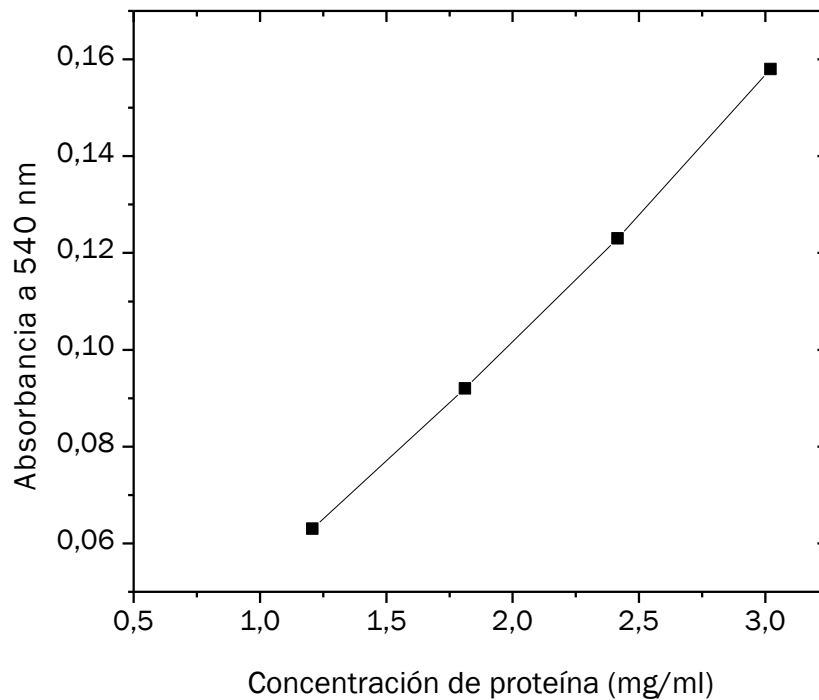


Figura 19: Curva patrón para el cálculo de la carga de proteína por el método Biuret

La regresión lineal arrojó una correlación de $R^2 = 0,997$ y la ecuación que relaciona la concentración de la proteína en mg/ml con la absorbancia a 540 nm es la siguiente:

$$\text{Concentración de proteína } \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = \frac{\text{absorbancia a } 540 \text{ nm} + 0,0016}{0,052} \quad (10)$$

Método Bradford. Carga de proteína.

Para el cálculo de la cantidad de proteína se realizó con anterioridad una curva patrón con albumina bovina, que relaciona la concentración de proteína y la absorbancia a 595 nm de longitud de onda. La curva patrón se muestra en la Figura 20.

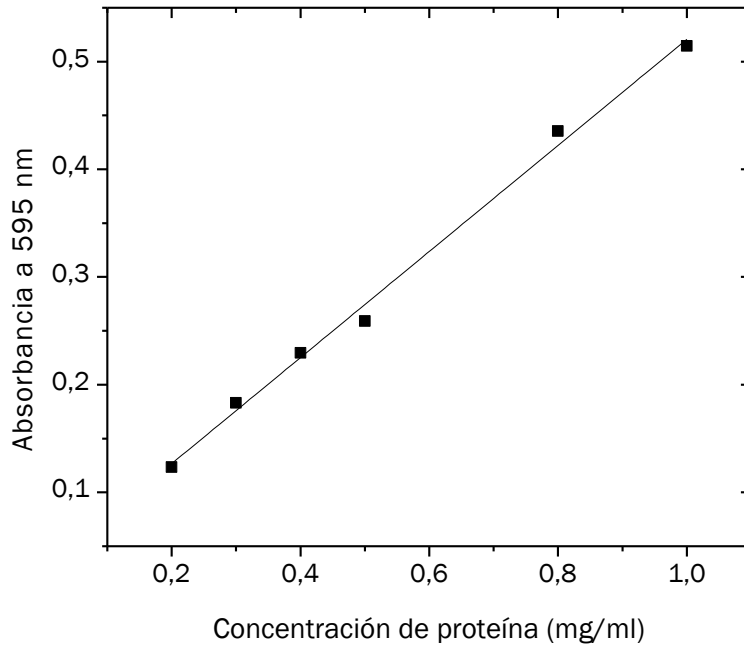


Figura 20: Curva patrón para el cálculo de la carga de proteína por el método Bradford

La regresión lineal arroja una correlación de $R^2 = 0,994$ y la ecuación que relaciona la concentración de la proteína en mg/ml con la absorbancia a 595 nm es la siguiente:

$$\text{Concentración de proteína } \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = \frac{\text{absorbancia a 595 nm} - 0,028}{0,492} \quad (11)$$

REFERENCIAS

1. Dandik, L., and Aksoy, H. A. (1996) Applications of *Nigella sativa* seed lipase in oleochemical reactions, *Enzyme and Microbial Technology* 19, 277-281.
2. Zhang, Y., Li, J., Han, D., Zhang, H., and Peng Liu, C. L. (2008) An efficient resolution of racemic secondary alcohols on magnetically separable biocatalyst, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 365, 609-613.
3. Plou, F. J., Barandiarhn, M., Calvo, M. V., Ballesteros, A., and Pasto, E. (1996) High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein, *Enzyme and Microbial Technology* 18, 66-71.
4. Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., and Solinas, V. (2005) Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis, *Journal of Biotechnology* 119, 291-299.
5. Cammarota, M. C., and Freire, D. M. G. (2006) A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content, *bioresource Technology* 97, 2195-2210.
6. Hasan, F., Shah, A. A., and Hameed, A. (2006) Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme and Microbial Technology* 39, 235-251.
7. Baldo, V. M., F, A. L. P. a., and Malcata, X. (1996) Bioreactors with immobilized lipases: State of the art, *Enzyme and Microbial Technology* 18, 392-416.
8. Krajewska, B. (2004) Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme and Microbial Technology* 35, 126-139.
9. Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., and Fernandez-Lafuente, R. (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1451-1463.
10. Matsumoto, M., and Ohashi, K. (2003) Effect of immobilization on thermostability of lipase from *Candida rugosa*, *Biochemical Engineering Journal* 14, 75-77.
11. Al-Duri, B., and Yong, Y. P. (2000) Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports, *Biochemical Engineering Journal* 4, 207-215.

12. Murty, V. R., Bhat, J., and Muniswaran, P. K. A. (2002) Hydrolysis of Oils by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 7, 57-66.
13. Orrego, C. E., Salgado, N., Valencia, J. S., Giraldo, G. I., Giraldo, O. H., and Cardona, C. A. (2010) Novel chitosan membranes as support for lipases immobilization: Characterization aspects, *Carbohydrate Polymers* 79, 9-16.
14. Orrego, C. E., Valencia, J. S., and Zapata, C. (2009) Candida rugosa Lipase Supported on High Crystallinity Chitosan as Biocatalyst for the Synthesis of 1-Butyl Oleate, *Catalysis Letters* 129, 312-322.
15. Romero, C. M., Lozano, J. M., Sancho, J., and Giraldo, G. I. (2007) Thermal stability of lactoglobulin in the presence of aqueous solution of alcohols and polyols, *International Journal of Biological Macromolecules* 40, 423-428.
16. Felse, P. A., and Panda, T. (1999) Studies on applications of chitin and its derivatives, *Bioprocess Engineering* 20, 505-512.
17. Dong, H., Li, J., Li, Y., Hu, L., and Luo, D. (2012) Improvement of catalytic activity and stability of lipase by immobilization on organobentonite, *Chemical Engineering Journal* 181-182, 590-596.
18. Villeneuve, P., Muderhwa, J. M., Graille, J., and Haas, M. J. (2000) Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 9, 113-148.
19. Tyndall, J. D. A., Sinchaikul, S., Fothergill-Gilmore, L. A., Taylor, P., and Walkinshaw, M. D. (2002) Crystal Structure of a Thermostable Lipase from Bacillus stearothermophilus P1, *Journal of Molecular Biology* 323, 859-869.
20. María, P. D. d., Sánchez-Montero, J. M., Sinisterra, J. V., and Alcántara, A. R. (2006) Understanding Candida rugosa lipases: An overview, *Biotechnology Advances* 24, 180-196.
21. Fernandez-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Fernández-Lorente, G., and Guisán, J. M. (1998) Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports, *Chemistry and Physics of Lipids* 93, 185-197.
22. Ferrer, A. S. (1998) Recuperación, purificación y caracterización de lipasas producidas por *Candida rugosa*. Aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático., In *Departament d'Enginyeria Química*, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
23. Murty, V. R., Bhat, J., and Muniswaran, P. K. A. (2002) Hydrolysis of Rice Bran Oil Using Immobilized Lipase in a Stirred Batch Reactor, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 7, 367-370.
24. Rathi, P., Saxena, R. K., and Gupta, R. (2001) A novel alkaline lipase from Burkholderia cepacia for detergent formulation, *Process Biochemistry* 37, 187-192.

25. Abbas, H., and Comeau, L. (2003) Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp., *Enzyme and Microbial Technology* 32, 589-595.
26. Gotor-Fernández, V., Brieva, R., and Gotor, V. (2006) Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 40, 111-120.
27. WANG, D.-L., NAG, A., LEE, G.-C., and SHAW, J.-F. (2002) Factors Affecting the Resolution of dl-Menthol by Immobilized Lipase-Catalyzed Esterification in Organic Solvent, *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 262-265.
28. Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., and Shrestha, S. (2001) Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16, 53-58.
29. Nouredini, H., Gao, X., and Philkana, R. S. (2005) Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil, *Bioresource Technology* 96, 769-777.
30. Orcaire, O., Buisson, P., and Pierre, A. C. (2006) Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 42, 106-113.
31. Bommarius, A. S., and Riebel, B. R., (Eds.) (2004) *Biocatalysis. Fundamentals and applications*.
32. Wiseman, A. (1991) *Manual de biotecnología de los enzimas*, ZARAGOZA
33. Gomes, F. M., Pereira, E. B., and Castro, H. F. d. (2004) Immobilization of Lipase on Chitin and Its Use in Nonconventional Biocatalysis, *Biomacromolecules* 5, 17-23.
34. Pujari, N. S., Vaidya, B. K., Bagalkote, S., Ponrathnam, S., and Nene, S. (2006) Poly(urethane methacrylate-co-glycidyl methacrylate)-supported-polypropylene biphasic membrane for lipase immobilization, *Journal of Membrane Science* 285, 395-403.
35. Rahmana, M. B. A., Tajudina, S. M., Hussein, M. Z., Rahman, R. N. Z. R. A., Salleh, A. B., and Basria, M. (2005) Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification, *Applied Clay Science* 29, 111-116.
36. Yong, Y., Bai, Y.-X., Li, Y.-F., Lin, L., Cui, Y.-J., and Xia, C.-G. (2008) Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity, *Process Biochemistry* 43, 1179-1185.
37. Yesiloglu, Y. (2005) Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase, *Process Biochemistry* 40, 2155-2159.

38. Chen, Y. Z., Yang, C. T., Ching, C. B., and Xu, R. (2008) Immobilization of Lipases on Hydrophobilized Zirconia Nanoparticles: Highly Enantioselective and Reusable Biocatalysts, *Langmuir* 24, 8877-8884.
39. Murty, V. R., Bhat, J., and Muniswaran, P. K. A. (2004) Hydrolysis of rice bran oil using an immobilized lipase from *Candida rugosa* in isooctane, *Biotechnology Letters* 26, 563-567.
40. Jeganathan, J., Nakhla, G., and Bassi, A. (2007) Hydrolytic pretreatment of oily wastewater by immobilized lipase, *Journal of Hazardous Materials* 145, 127-135.
41. Knezevic, Z., Mojovic, L., and Adnadjevic, B. (1998) Palm oil hydrolysis by lipase from *Candida cyhdracea* immobilized on zeolite type Y, *Enzyme and Microbial Technology* 22, 275-280.
42. Hilal, N., Nigmatullin, R., and Alpatova, A. (2004) Immobilization of cross-linked lipase aggregates within microporous polymeric membranes, *Journal of Membrane Science* 238, 131-141.
43. Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardoa, A. N., Valle, M. G. V.-d., Hernández-López, M., Barka, E. A., Bosquez-Molina, E., and Wilson, C. L. (2006) Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities, *Crop Protection* 25, 108-118.
44. Sashiwa, H., and Aiba, S.-i. (2004) Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials, *Progress in polymer science* 29, 887-908.
45. Abdou, E. S., Nagy, K. S. A., and Elsabee, M. Z. (2008) Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources, *Bioresource Technology* 99, 1359-1367.
46. Rinaudo, M. (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress in Polymer Science* 31, 603-632.
47. Kılınça, A., Tekeab, M., Önal, S., and Telefoncu, A. (2006) Immobilization of Pancreatic Lipase on Chitin and Chitosan, *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 36, 153-163.
48. Romdhane, I. B.-B., Romdhane, Z. B., Gargouri, A., and Belghith, H. (2011) Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 68, 230-239.
49. Chiou, S.-H., and Wu, W.-T. (2004) Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups, *Biomaterials* 25, 197-204.
50. Kozaka, M., and Domka, L. (2004) Adsorption of the quaternary ammonium salts on montmorillonite, *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 65, 441-445.
51. Ghiaci, M., Aghaei, H., Soleimanian, S., and Sedaghat, M. E. (2009) Enzyme immobilization Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase, *Applied Clay Science* 43, 289-295.

52. Cammarota, M. C., Teixeira, G. A., and Freire, D. M. G. (2001) Enzymatic pre-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents, *Biotechnology Letters* 23, 1591-1595.
53. Leal, M. C. M. R., Freire, D. M. G., Cammarota, M. C., and Jr., G. L. S. A. (2006) Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater, *Process Biochemistry* 41, 1173-1178.
54. Jung, F., Cammarota, M. C., and Freire, D. M. G. (2002) Impact of enzymatic pre-hydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewater, *Biotechnology Letters* 24, 1797-1802.
55. Rosa, D. R., Duarte, I. C. S., Saavedra, N. K., Varesche, M. B., Zaiat, M., Cammarota, M. C., and Freire, D. M. G. (2009) Performance and molecular evaluation of an anaerobic system with suspended biomass for treating wastewater with high fat content after enzymatic hydrolysis, *Bioresource Technology* 100, 6170-6176.
56. Mendes, A. A., Pereira, E. B., and Castro, H. F. d. (2006) Effect of the enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on the anaerobic biodigestion, *Biochemical Engineering Journal* 32, 185-190.
57. Mendes, A. A., Pereira, E. B., Jr., A. F., and Castro, H. F. d. (2010) Anaerobic Biodegradability of Dairy Wastewater Pretreated with Porcine Pancreas Lipase, *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY* 53, 1279-1284.
58. Dharmsthiti, S., and Kuhasuntisuk, B. (1998) Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 21, 75-80.
59. Valladao, A. B. G., Freire, D. M. G., and Cammarota, M. C. (2007) Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses, *International Biodeterioration & Biodegradation* 60, 219-225.
60. Rigo, E., Rigoni, R. E. z., Lodea, P., Oliveira, D. D., Freire, D. M. G., Treichel, H., and Luccio, M. D. (2008) Comparison of Two Lipases in the Hydrolysis of Oil and Grease in Wastewater of the Swine Meat Industry, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 47, 1760-1765.
61. Masse, L., Kennedy, K. J., and Chou, S. (2001) Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater, *Bioresource Technology* 77, 145-155.
62. Jeganathan, J., Bassi, A., and Nakhla, G. (2006) Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation, *Journal of Hazardous Materials B137*, 121-128.
63. Jeganathan, J., Nakhla, G., and Bassi, A. (2007) Oily wastewater treatment using a novel hybrid PBR-UASB system, *Chemosphere* 67, 1492-1501.

64. Dumore, N. S., and Mukhopadhyay, M. (2012) Removal of oil and grease using immobilized triacylglycerin lipase, *International Biodeterioration & Biodegradation* 68, 65-70.
65. Fuentes, I. E. d., Viseras, C. A., Ubiali, D., Terreni, M., and Alcántara, A. R. (2001) Different phyllosilicates as supports for lipase immobilisation, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11, 657-663.
66. Camargo, L. M. Modificación de Bentonita del Valle del Cauca con sales cuaternarias de amonio para la remoción de Fenol en agua, In *Departamento de Química, Facultad de Ciencias*, p 20, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C. Colombia.
67. Cervera, M. F., Hidalgo, C., and Suárez, Y. (2008) Validación de una técnica potenciométrica para determinar el grado de desacetilación de la quitosana, *Ars Pharmaceutica* 49, 245-257.
68. Rios, L. R., and Arias, F. J. (2002) Inmovilización de pectinasas y/o celulasas y determinación de algunos de sus efectos en el jugo de guayaba, In *Ingeniería Química*, Universidad Nacional de Colombia, Manizales.
69. Cortizo, M. S., Berghoff, C. F., and Alessandrini, J. L. (2008) Characterization of chitin from *Illex argentinus* squid pen, *Carbohydrate Polymers* 74, 10-15.
70. Lavall, R. L., Assis, O. B. G., and Campana-Filho, S. P. (2007) B-Chitin from the pens of *Loligo* sp.: Extraction and characterization, *Bioresource Technology* 98, 2465-2472.
71. Sagheer, F. A. A., Al-Sughayer, M. A., Muslim, S., and Elsabee, M. Z. (2009) Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf, *Carbohydrate Polymers* 77, 410-419.
72. López, M. L. F. (2008) Recuperación Termoquímica de Quitina de Camarón por Tecnología Limpia y su Caracterización Físicoquímica, In *Investigación en alimentos*, p 102, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE COAHUILA, Saltillo.
73. Pillai, C. K. S., Paul, W., and Sharma, C. P. (2009) Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation, *Progress in Polymer Science* 34, 641-678.
74. Carriazo, J., Molina, R., and Moreno, S. (2007) Caracterización estructural y textural de una Bentonita Colombiana, *Revista Colombiana de Química* 36, 213-225.
75. Madejová, J., and Komadel, P. (2001) Baseline studies of the clay minerals society source clays: Infrared Methods, *Clays and Clay Minerals* 49, 410-432.
76. Madejová, J. (2003) FTIR techniques in clay mineral studies, *Vibrational Spectroscopy* 31, 1-10.
77. Lazo, J. C., Navarro, A. E., Sun-Kou, M. R., and Llanos, B. P. (2008) Síntesis y caracterización de arcillas organofílicas y su aplicación como adsorbentes del Fenol, *Revista de la Sociedad Química del Perú* 74, 3-19.

78. Alemdar, A., Atıcı, O., and Güngör, N. (2000) The influence of cationic surfactants on rheological properties of bentonite–water systems, *Materials Letters* 43, 57-61.
79. Casa, R. M. d. I., Sinisterra, J. V., and Sánchez-Montero, J. M. (2006) Characterization and catalytic properties of a new crude lipase from *C. rugosa*, *Enzyme and Microbial Technology* 38, 599-609.
80. Wrolstad, R. E. (2001) *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* John Wiley & Sons Inc.
81. Mendes, A. A., Castro, H. F. d., Rodrigues, D. d. S., Adriano, W. S., Tardioli, P. W., Mammarella, E. J., Giordano, R. d. C., and Giordano, R. d. L. C. (2011) Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38, 1055–1066.
82. Beveridge, G. S. G., and Schechter, R. S. (1970) *Optimization: Theory and Practice*, McGraw-Hill, New York.
83. Box, G. P. G., Hunter, W. G., and Hunter, J. S. (1978) *Statistics for Experimenters: An Introduction To Design, Data Analysis And Model Building*, John Wiley & Sons., New York.
84. Gutierrez, H. P. (1995) *Análisis y Diseño de Experimentos*, Maracaibo.
85. Güelfo, L. A. F. (2008) Caracterización cinética de la degradación anaerobia termofílica seca de la FORSU. Efecto de diferentes pretratamientos sobre la biodegradabilidad del residuo. , In *Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente*, Universidad de Cádiz, Cádiz.
86. Vidal, G., Carvalho, A., Mendez, R., and Lema, J. M. (2000) Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters, *Bioresource Technology* 74, 231-239.