

Universidad  
Autónoma  
Metropolitana



Casa abierta al tiempo **Azcapotzalco**

Departamento de Ciencias Básicas e Ingeniería  
Licenciatura en Ingeniería Ambiental

Proyecto de investigación

Producción de lipasas por *Aspergillus niger* empleando aceites de  
cocina usados

Presenta:

Fernanda María Alejandra Morán Castillo

2123002631

Asesores:

M. en C. María del Rocío Cruz Colín

M. en C. Miguel Ávila Jiménez

Noviembre, 2020

## **Declaratoria**

Yo, M. en C. María del Rocío Cruz Colín, declaro que aprobé el contenido del presente *Reporte de Proyecto de Integración* y doy mi autorización para su publicación en la Biblioteca Digital, así como en el Repositorio Institucional de UAM Azcapotzalco.

Yo, M. en C. Miguel Ávila Jiménez, declaro que aprobé el contenido del presente *Reporte de Proyecto de Integración* y doy mi autorización para su publicación en la Biblioteca Digital, así como en el Repositorio Institucional de UAM Azcapotzalco.

Yo, Fernanda María Alejandra Morán Castillo, doy mi autorización a la Coordinación de Servicios de Información de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, para publicar el presente documento en la Biblioteca Digital, así como en el Repositorio Institucional de UAM Azcapotzalco.

## **Dedicatoria**

A mis padres, que siempre me han apoyado y gracias a ellos llegué tan lejos. A mi madre por ser mi confidente y compañera. A mi padre por siempre velar por mí y cuidar que nunca me falte nada.

A Mauricio, el amor de mi vida. Siempre has sido mi apoyo, mi motor y me brindaste el tiempo que necesitaba para poder lograr mis metas pendientes. Si alguien me ha apoyado a seguir mis sueños, eres tú. Iniciamos este camino juntos y juntos lo terminamos.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Autónoma Metropolitana por haberme aceptado, por haberme dado un hogar, un refugio, una fuente inagotable de conocimientos y los mejores años de mi vida.

A mis asesores, la M. en C. María del Rocío Cruz Colín y el M. en C., Miguel Ávila Jiménez, por haber compartido conmigo sus conocimientos, haber sido pacientes y siempre estar dispuestos a atender mis dudas sin importar cuan insignificantes pudieran ser.

Al Laboratorio de Microbiología Ambiental, por haberme recibido con los brazos abiertos, siempre brindándome la oportunidad de crecer como profesionista y como persona.

A todos los profesores de la licenciatura en Ingeniería Ambiental, por haber compartido sus conocimientos con todos nosotros y por compartirnos esa pasión por la profesión

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Declaratoria</b> .....	<b>I</b>
<b>Dedicatoria</b> .....	<b>II</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>III</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1 Las lipasas .....	1
1.2 Características de <i>A. niger</i> .....	1
1.3 Producción de biodiésel .....	2
1.4 Transesterificación por vía biocatalítica.....	2
1.5 Antecedentes .....	3
1.6 Justificación .....	5
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>7</b>
<b>3. Marco teórico</b> .....	<b>8</b>
<b>4. Metodología</b> .....	<b>10</b>
4.1 Preparación del inóculo.....	11
4.2 Producción de lipasa en biorreactores.....	14
4.3 Medición de actividad enzimática.....	16
4.3.1 Medición por espectrofotometría.....	16
4.3.2 Medición por titulación .....	18
4.4 Extracción de lipasa.....	19
4.5 Análisis de resultados.....	20
<b>5. Resultados</b> .....	<b>21</b>
5.1 Preparación del inóculo.....	21
5.2 Medición de actividad enzimática.....	21
5.3 Producción de lipasa en biorreactores.....	22
5.3.1 Medición por espectrometría .....	24
5.3.2 Medición por titulación .....	25
5.4 Extracción de lipasa y su actividad .....	27
<b>6. Análisis y discusión de resultados</b> .....	<b>31</b>
6.1 Medición de actividad enzimática.....	31
6.1.1 Medición por espectrometría .....	31
6.1.2 Medición por titulación .....	32
6.2. Extracción de lipasa y su actividad .....	33
<b>7. Conclusiones</b> .....	<b>34</b>
<b>8. Bibliografía</b> .....	<b>36</b>

## Lista de figuras

Figura 1.0 Reacción de hidrólisis catalizada por lipasa.....	1
Figura 1.1 Reacción biocatalítica de transesterificación.....	2
Figura 4.0 Diagrama de flujo de la metodología aplicada .....	8
Figura 4.1 Hongo <i>Aspergillus niger</i> .....	9
Figura 4.2 Botellas Roux inoculadas con <i>Aspergillus niger</i> .....	9
Figura 4.3 Cámara Neubauer empleada .....	10
Figura 4.4 Cuadrícula de la cámara Neubauer empleada .....	11
Figura 4.5 Esporas dentro de un cuadrante de la cámara Neubauer .....	11
Figura 4.6 Biorreactores con fuente de carbono estériles .....	12
Figura 4.7 Biorreactores testigo y blanco estériles .....	13
Figura 4.8 Reactivo p-nitrofenilbutirato utilizado .....	15
Figura 4.9 Medición de actividad enzimática mediante titulación .....	16
Figura 4.10 Centrífuga empleada .....	17
Figura 5.0 Material necesario para el ajuste de concentración de esporas .....	19
Figura 5.1 Biorreactores testigo al final de la producción .....	20
Figura 5.2 Biorreactores “B” al final de la producción .....	20
Figura 5.3 Biorreactores después de la producción de lipasa.....	21
Figura 5.4 Curva de calibración de p-NP .....	22
Figura 5.5 Actividad promedio por fuente de carbono empleando espectrometría .....	23
Figura 5.6 Actividad promedio por fuente de carbono empleando titulación ...	24
Figura 5.7 Sedimento adherido a las paredes del contenedor .....	25
Figura 5.8 Sedimento aglomerado del extracto C .....	26
Figura 5.9 Medio enzimático antes y después del proceso de extracción .....	26
Figura 5.10 Extractos enzimáticos .....	27

## Listado de abreviaturas

- **CINVESTAV:** Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- **p-NP:** p-Nitrofenol, compuesto orgánico fenólico ocupado en la síntesis de analgésicos y antipiréticos. A temperatura ambiente se encuentra en pequeños cristales de color blanco o amarillo claro. Es empleado en espectrofotometría a una lectura de 415 nm.
- **p-NPB:** p-Nitrofenilbutirato, compuesto químico empleado como sustrato de esterasas y lipasas. Al ser hidrolizado es liberado el p-NP.
- **SDA:** Agar Dextrosa Sabouraud, medio de cultivo no selectivo para mantenimiento y cultivo de hongos patógenos y no patógenos.
- **SN:** Sobrenadante, líquido que se encuentra en la parte superior del recipiente al centrifugar una mezcla.
- **UL:** Unidad de Lipasa, cantidad de actividad enzimática que reacciona con un  $\mu\text{mol}$  de p-NPB

## Resumen

En el presente proyecto se estudió la producción de lipasas a partir del hongo *Aspergillus niger* el cual ha sido reportado como un buen productor de enzimas. Se emplearon aceites usados como fuente de carbono para el hongo, creando así condiciones favorables para la producción de las lipasas.

En los experimentos se utilizaron los siguientes aceites de grado alimenticio: aceite de oliva extra virgen, aceite de oliva extra virgen usado y aceite de canola usado, los cuales sirvieron como principal fuente de carbono para el hongo. La producción de lipasas se realizó empleando biorreactores que contenían una solución salina con la siguiente composición: 12 g/L de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.3 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.25 g/L de  $\text{CaCl}_2$ , 1% p/v de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 0.05% v/v de Tween 80, manteniendo un pH de 6.33. Los biorreactores fueron adicionados con 2% de cada tipo de aceite y un inóculo consistente en una suspensión de esporas del hongo *A. niger*, cuya concentración fue de  $2 \times 10^6$  esporas/mL, y dejándolos en incubación en un cultivo agitado a 100 rpm y a una temperatura de 30 °C durante diez días.

La actividad enzimática de las lipasas en cada biorreactor se determinó empleando dos métodos: (1) por titulación de los ácidos grasos de la leche y (2) por espectrofotometría (en un equipo Shimadzu UV-1800 en un intervalo de 450 a 350 nm) midiendo la producción de p-nitrofenol (p-NP).

La biomasa desarrollada en cada uno de los biorreactores fue separada del medio de cultivo mediante filtración para proceder a la obtención de un extracto enzimático saturando con sulfato de amonio al 50 %. Finalmente, se determinó la actividad enzimática en cada uno de los extractos.

Los valores de actividad obtenidos de los extractos enzimáticos fueron los siguientes: 79 UL para la lipasa producida con aceite de oliva usado; 99 UL para la lipasa producida con aceite de oliva extra virgen y 442 UL para la lipasa producida con aceite de canola usado.

# 1. Introducción

## 1.1 Las lipasas

Las lipasas clasificadas como *EC 3.1.1.3 triacylglycerol lipase* (BRENDA, 2020) son enzimas que la mayoría de los seres vivos poseen en su organismo, así como también pueden ser encontradas en microorganismos como hongos, bacterias y levaduras. Estas enzimas hidrolizan los enlaces de los ésteres de los compuestos insolubles en agua formando así moléculas de glicerol y ácidos grasos, como se observa a continuación (Enciclopedia Británica, 2019).

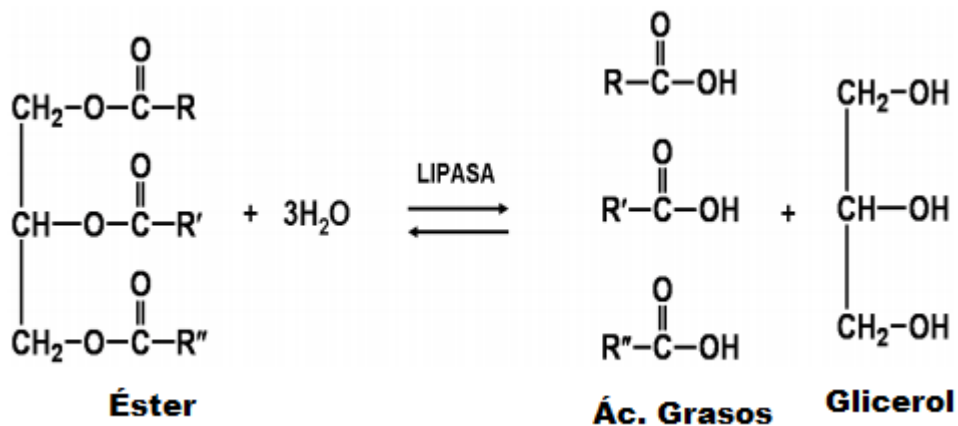


Figura 1.0 Reacción de hidrólisis catalizada por lipasa. **Fuente:** (Wanionok,2017)

En el metabolismo de los microorganismos quimiorganotrofos, los triglicéridos y los ácidos grasos pueden servir como fuente de energía al ser hidrolizados por lipasas microbianas (Prescott, 2003).

Las lipasas en los microorganismos pueden ser internas o externas, es decir, pueden encontrarse dentro del microorganismo o pueden ser excretadas por éste. La mayor parte de los microorganismos que sintetizan lipasas, las excretan en medios grasos para aumentar la viabilidad del medio (Aceves y Castañeda, 2012).

Las lipasas de origen microbiano, que son las que más se han comercializado, se clasifican de acuerdo con su origen (Bart *et al.*, 2010). Los siguientes géneros microbianos se han reportado como productores de lipasas:

- Bacterias (*Bacillus*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*).
- Hongos (*Aspergillus*, *Mucor* y *Rhizomucor*).
- Levaduras (*Candida* y *Cryptococcus*).

## 1.2 Características de *A. niger*

El hongo *Aspergillus niger* es un hongo filamentoso saprófito cuyo hábitat radica en la vida silvestre, por lo que puede encontrarse en el suelo, en el agua o en el aire cuando sus esporas se ven suspendidas. El género *Aspergillus* es gran productor de enzimas principalmente en las siguientes especies: *A. oryzae* es un productor de amilasas, glucoamilasas, glucosidasas y proteasas; *A. fumigatus*

de catalasas; *A. niger* de celulasas, tanasa y lipasas; *A. japonicus* de invertasas y *A. foetidus* de pectinasas. Debido a su diversa producción de enzimas es que *Aspergillus* es uno de los géneros de hongos con mayor número de aplicaciones dentro de la biotecnología tal y como el empleo de *A. oryzae* para la producción de alcohol potable gracias a que este hongo es productor de amilasa. También *A. sojae* es empleado en la fermentación de la soja para la producción de salsa y tofu (EcuRed, 2020)

### 1.3 Producción de biodiésel

El biodiésel es un biocombustible en cuya fabricación se emplean lípidos de origen vegetal o animal. El proceso al que se someten los lípidos para obtener biodiésel es conocido como transesterificación. Por fines prácticos la transesterificación suele llevarse a cabo empleando una base fuerte o un ácido como catalizador de la reacción. Cuando se emplean catalizadores químicos, ya sean bases o ácidos, además del biodiésel también se forman subproductos. Estos subproductos deben de ser retirados mediante un proceso de purificación para no afectar la eficiencia del biocombustible (San Miguel *et al.*, 2015). Generalmente se emplean para su producción aceites de semillas tales como la soja, el maíz, el girasol, el ricino y el maní (Moreira, 2012). No es necesario un aceite puro como materia prima para la producción de biodiesel ya que diversos centros de acopio de aceites usados destinan este residuo a la producción de biodiésel empezando el proceso desde la filtración del aceite y su asentamiento para posteriormente ser sometidos al proceso de transesterificación y finalmente determinar su calidad. Es posible el empleo de aceites gastados a pesar de que este factor pueda afectar el rendimiento del proceso (Ramírez *et al.*, 2011). Cuando se desean producir grandes cantidades de biodiésel generalmente se emplea el maíz como materia prima de los aceites que posteriormente serán convertidos en biodiésel, pero esto genera cierta controversia de carácter social debido al uso de un alimento como materia prima de un combustible.

### 1.4 Transesterificación por vía biocatalítica

La transesterificación puede realizarse también de manera biocatalítica. En este proceso se emplea la enzima lipasa como catalizador de la reacción que convertirá los triglicéridos en ésteres alquílicos (figura 1.1).

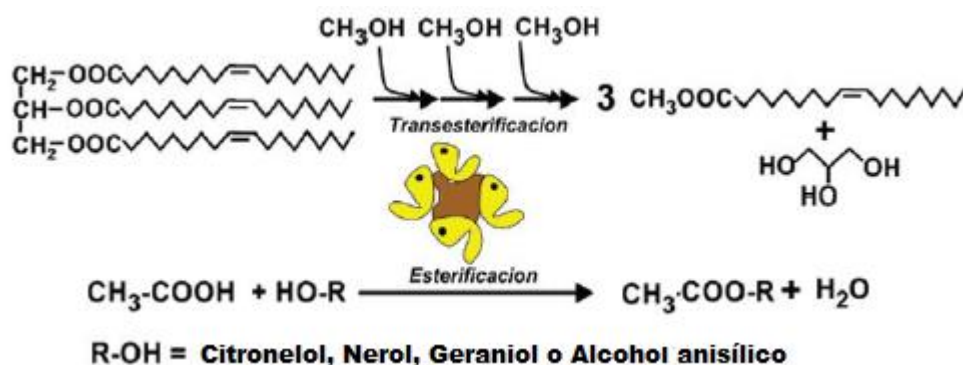


Figura 1.1 Reacción biocatalítica de transesterificación. Fuente: (Gómez *et al.*, 2011)

La producción de biodiésel a través de una reacción biocatalítica es un proceso sencillo y amigable con el ambiente. Las lipasas utilizadas en el proceso ya pueden ser adquiridas en el mercado, teniendo la ventaja que si se encuentran inmovilizadas puede ser posible su reutilización.

El proceso de transesterificación se simplifica cuando se emplea un biocatalizador debido a que el producto final no necesita de purificación y puede llevarse a cabo en condiciones que no requieren de extremas precauciones como temperaturas muy altas. Una desventaja del uso de enzimas en la transesterificación es que la actividad de la enzima puede ser muy baja y debido a esto la reacción puede no llevarse a cabo totalmente. Una vez que la transesterificación se lleva a cabo es posible reutilizar y regenerar la enzima fácilmente.

Cuando se usa una lipasa como biocatalizador se corre el riesgo de que el alcohol, metanol en la mayoría de los casos, desactive la enzima haciendo que la reacción de transesterificación no se realice completamente. El proceso de transesterificación vía enzimática puede mejorarse racionalizando el alcohol, es decir, manteniendo su concentración menor a un equivalente molar. En los casos donde se requiere una concentración mayor de alcohol, se adicionará paulatinamente el alcohol al medio de la reacción hasta lograr la concentración deseada (Bart *et al.*, 2010).

No es necesaria una lipasa específica para ser usada en el proceso de transesterificación, por lo tanto, es posible extraer lipasas de cualquier microorganismo siempre y cuando éste la produzca (Aceves y Castañeda, 2012).

### **1.5 Antecedentes**

El interés hacia el estudio de las lipasas ha aumentado con el tiempo debido a que pueden ser empleadas en distintos procesos industriales, donde las grasas estén involucradas, tales como la industria de los detergentes o la industria del papel para eliminar la cera de la pulpa del papel. Si bien la producción de lipasas microbianas no es un tema nuevo, existen estudios donde se analiza su producción por distintos microorganismos. Un estudio de la Facultad de Química de Cuba analizó la producción de lipasa por dos especies del *Aspergillus*, un hongo filamentoso, *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus*, comprobando que las condiciones del medio de cultivo favorecen la producción enzimática (Coca *et al.*, 2001). En su trabajo de investigación analizaron la capacidad lipolítica de doce microorganismos: hongos, levaduras y bacterias. Como medio de cultivo se utilizó una solución con la siguiente composición: 12 g/L de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.3 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  y 0.25 g/L de  $\text{CaCl}_2$  y como fuentes de nitrógeno y carbono sulfato de amonio al 1% y aceite al 2% respectivamente. Los tipos de aceites empleados fueron de oliva, de coco y de girasol. Durante el ensayo *A. niger* y *A. fumigatus* obtuvieron valores de actividad de 0.26 UI/mL y 0.21 UI/mL respectivamente, siendo los más altos obtenidos empleando aceite de oliva como fuente de carbono, esto se le atribuye a la afinidad de los hongos hacia la fuente de carbono. Se presentó actividad enzimática por parte de *A. niger* en el empleo del aceite de oliva, de coco y de girasol como fuente de

carbono. Mientras que *A. fumigatus* presentó actividad enzimática únicamente en presencia de aceite de oliva. Se comprobó que la glucosa, el almidón y el glicerol no favorecen la síntesis de lipasas.

Por otro lado, la producción de biodiésel a nivel laboratorio es una práctica que cada día presenta mayor interés debido a que existe una gran variedad de materiales oleaginosos que pueden emplearse como materia prima. La mayoría son residuos de diversos procesos alimenticios o industriales. Tal es el caso de la investigación de Betanzos y Garcés en el 2011, donde se estudió la obtención de biodiésel a partir de aceites comestibles usados, mediante el proceso de transesterificación enzimática (Betanzos y Garcés, 2011). Para la producción de biodiésel emplearon aceite de canola nuevo y usado, además de 3 tipos de lipasas comerciales: lipasa pancreática de cerdo tipo II L3126 marca Sigma-Aldrich, lipasa pancreática de cerdo grado comercial marca ENMEX y lipasa de *Candida rugosa* tipo VII, Sigma-Aldrich. Para que el aceite usado fuese apto para su transesterificación fue necesario filtrarlo y eliminar el agua presente en él. Se realizaron pruebas en biorreactores tipo Batch con cada una de las lipasas dando como resultado una producción parcial de biodiésel a las 24 horas de producción. En la transesterificación del aceite de canola nuevo se obtuvo un mayor rendimiento con el empleo de la lipasa pancreática de cerdo Sigma-Aldrich mientras que la producción con un aceite usado es mayor con el empleo de lipasa pancreática marca ENMEX.

Dentro de la UAM-Azcapotzalco se han realizado distintos proyectos cuya finalidad ha sido la obtención de biodiésel a partir de distintos tipos de microorganismos como es el caso de levaduras cultivadas en agua residual (Trejo, 2017) y microalgas oleaginosas en medio de cultivo líquido (Cruz, 2015).

Por otro lado, existen investigaciones acerca de la recuperación y extracción de lipasas de la levadura *Candida rugosa* (Sánchez, 2003) así como de lipasas bacterianas extraídas de *Bacillus pumilus* (Wong y Farrés, 1999) donde se inoculó *B. pumilus* en un medio líquido de infusión de cerebro y corazón (BHI) adicionado con tributirina al 1%, y se incubó durante 24 horas a una temperatura de 37°C. La actividad lipolítica se determinó mediante un método espectrofotométrico utilizando o-nitrofenil-laurato como sustrato. Una vez terminado el tiempo de incubación se extrajo un crudo enzimático para posteriormente ser saturado con sulfato de amonio al 80%, el precipitado fue disuelto en solución buffer de fosfatos (pH 8.0). El extracto obtenido presentó una actividad lipolítica de 9.7UI/mL bajo las condiciones del ensayo.

Asimismo, se sabe que no es rigurosamente necesario el empleo de una lipasa de grado comercial para poder obtener biodiésel, es posible emplear lipasas provenientes de procesos microbianos en la producción de biodiesel. Los microorganismos capaces de producir lipasa pueden ser desde bacterias, como *Pseudomona spp.* (Yildirim y Tükel, 2013), hasta levaduras como *Candida rugosa* (Sánchez, 2003). La implementación de hongos microbianos en la producción de lipasas resulta atractiva debido a que los hongos presentan una mayor flexibilidad en cuanto a sus condiciones de cultivo. Hernández y

colaboradores (2017) realizaron una búsqueda de hongos filamentosos que pudieran ser aplicados en la producción de lipasas. Obtuvieron buenos resultados con hongos identificados como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium janthinellum* y *Penicillium verrucosum*. Si bien únicamente se identificaron hongos que son capaces de producir lipasas, es posible continuar una investigación identificando la actividad lipolítica de cada uno.

El proceso bioquímico mediante el cual los hongos filamentosos secretan lipasas es la fermentación de un sustrato con composición lipídica. La fermentación puede ser en un medio acuoso ó en un medio sólido. Ambos tipos de fermentación deben tener un control en cuanto al pH del medio de cultivo. El pH óptimo para la producción de lipasas en una fermentación sólida es de 5 (Cujilema *et al*, 2018).

Los sustratos que son sometidos a fermentación deben de ser ricos en lípidos para poder fomentar el aumento en la producción de lipasa. Los sustratos pueden ser residuos ricos en lípidos, como en el estudio de Aceves y colaboradores (2012) dónde se estudió la producción de lipasas empleando residuos agroindustriales como fuente de carbono. Estos residuos agroindustriales, como la cascarilla de arroz y el bagazo de caña de azúcar, permitieron el crecimiento microbiano proporcionando nutrientes y un soporte físico. Si estos residuos son impregnados con lípidos durante su generación, favorecerán la producción enzimática.

## **1.6 Justificación**

Las energías renovables son un área de oportunidad en el sector energético del país para lograr un nuevo enfoque energético lejos de los combustibles fósiles. El uso de biodiésel no ha sido introducido como una alternativa al combustible fósil cuando se habla de fuentes de energía en automóviles. La implementación de energías renovables es cada vez más imperante debido a las consecuencias provocadas por el cambio climático.

Los aceites usados de cocina usados representan un residuo de manejo especial del cual no se tiene un buen manejo a pequeña y alta escala. Debido a esto, en este proyecto se plantea una manera de reciclarlos y valorizarlos, ya que representan una problemática ambiental seria a la cual no se le ha atendido de la manera adecuada. Los aceites usados son un residuo que proviene de todas las cocinas, ya sean de una casa habitación o alguna empresa donde la producción de alimentos involucre su uso. Un litro de aceite usado puede llegar a contaminar 40,000 litros de agua, por lo que contar con una buena alternativa para su adecuado manejo es de suma importancia.

El uso de lipasas fúngicas aplicadas en la transesterificación enzimática para la producción de biodiésel supone como resultado un producto de mayor pureza en comparación al proceso de transesterificación catalítica. Las temperaturas adecuadas para la vía enzimática son hasta 40°C menores a las que se emplean por vía catalítica. Por otra parte, por la ruta enzimática no es necesaria la adición

de agentes químicos externos que puedan afectar la pureza del producto y/o generar residuos químicos que afecten al ambiente. Cabe señalar que la lipasa puede ser extraída del medio en el que se llevó a cabo la transesterificación, purificarse y ser apta para reutilizarse. Además de que el beneficio también es económico dado que no se requiere de la compra de una lipasa para su uso como biocatalizador.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

- Determinar la producción de lipasas por *Aspergillus niger* empleando aceites usados de cocina como fuente de carbono.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Aplicar una técnica de obtención de lipasas utilizando el hongo *Aspergillus niger*.
- Estimar la producción de lipasas empleando aceites usados de cocina como fuente de carbono.
- Determinar la actividad enzimática de las lipasas obtenidas.
- Comparar la producción de lipasas obtenidas empleando un aceite puro y un aceite usado como fuente de carbono.

### 3. Marco teórico

Los organismos vivos llevan a cabo una gran cantidad de reacciones químicas para poder cumplir con sus funciones vitales. Estas reacciones se ven aceleradas gracias al uso de biocatalizadores conocidos como enzimas. Las enzimas la mayoría de las veces son proteínas, también puede ser ARN, que las células producen de forma intrínseca o pueden segregar al medio en el que se encuentran. Las enzimas pueden dividirse en seis familias de acuerdo con el tipo de reacción que catalizan, a saber:

- Oxidorreductasas: Reacciones de óxido-reducción.
- Transferasas: Reacciones de transferencia de un grupo químico de una molécula a otra.
- Hidrolasas: Reacciones de hidrólisis.
- Liasas: Reacciones de ruptura de sustratos por reacciones diferentes a la hidrólisis.
- Isomerasas: Reacciones de interconversión entre isómeros.
- Ligasas: Reacciones de unión de moléculas dependientes de energía.

En la familia de las hidrolasas se encuentran las lipasas, las cuales catalizan la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los lípidos. La mayoría de los seres vivos producen lipasas, desde microorganismos unicelulares hasta el ser humano. Los microorganismos capaces de producir lipasas son bacterias, hongos, levaduras y algunos actinomicetos, los cuales las producen en presencia de lípidos para cumplir con sus funciones metabólicas empleándolos como fuente de carbono. Aceites naturales, como el aceite de soya, de canola y de oliva, así como los ácidos y los ésteres grasos son inductores para la producción de lipasas. Debido a que las lipasas son altamente solubles en agua y son capaces de hidrolizar compuestos insolubles, actúan sobre la interfaz lípido-agua. El empleo de enzimas inmovilizadas resulta atractivo debido a que es posible recuperar la enzima del medio al que fue adicionada, en este caso las lipasas son inmovilizadas en soportes hidrofóbicos mediante adsorción selectiva (González *et al.*, 2010)

Las lipasas microbianas, tienen una gran cantidad de aplicaciones dentro de la industria en reacciones de hidrólisis, síntesis, interesterificación y transesterificación. Este tipo de hidrolasas son empleadas en la producción de detergentes, cosméticos y alimentos, así como también en el tratamiento de aguas residuales y en diversos tratamientos dentro de la industria del cuero. La industria alimenticia emplea lipasas como aditivo alimenticio para acentuar el sabor y olor, así como dentro de la producción de aceites de grado comestible. La industria farmacéutica emplea lipasas mediante la química fina para la síntesis de nuevos fármacos. La industria energética emplea lipasas en el proceso de transesterificación de aceites para la producción de biodiesel (Aceves y Castañeda, 2012).

Las grasas y los aceites son sustancias químicas con las que el ser humano se encuentra sumamente familiarizado ya que se encuentran presentes en gran parte de los alimentos que conforman su dieta básica. Las grasas y los aceites son obtenidos de fuentes vegetales o animales. Estas moléculas, están conformadas principalmente por triglicéridos que son ésteres de una molécula de glicerol con tres ácidos grasos. El tipo de ácido graso que se encuentra presente depende su fuente de origen. Los aceites vegetales contienen ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Las grasas saturadas se presentan en una menor cantidad en los aceites de origen vegetal a excepción de los aceites de coco, cacao y palma; mientras que los ácidos grasos monoinsaturados se encuentran en mayor proporción en los aceites de canola, oliva, cártamo y girasol. Los ácidos grasos poliinsaturados se encuentran en mayor proporción los aceites de soya, maíz y linaza (Procuraduría Federal del Consumidor [PROFECO], 2010)

Los porcentajes de ácidos grasos presentes en el aceite de oliva extra virgen son: 77% de ácidos grasos monoinsaturados, 16% de ácidos grasos saturados y 6% de ácidos grasos poliinsaturados, siendo el ácido oleico, conocido como *Omega 9*, el nombre del ácido graso presente en mayor proporción (55-83%). Por otra parte, el aceite de canola posee un 61% de ácidos grasos monoinsaturados, 29% de ácidos grasos poliinsaturados y un 6% de ácidos grasos saturados conteniendo también ácido oleico en una alta concentración (50-70%) más no en la misma proporción que el aceite de oliva extra virgen (Ramírez et al.,2014)

Cuando un aceite comestible es sobrecalentado emite gases indicando que las grasas insaturadas presentes se empiezan a quemar produciendo acroleína, un compuesto sumamente tóxico y potencialmente cancerígeno. (PROFECO, 2010) Es por esta razón que no se recomienda el reuso de los aceites de fritura. Debido a lo anterior, las casas habitación y locales productores de comida se convierten en generadores de este residuo peligroso. Una de las opciones para los aceites usados es su empleo como materia prima en la producción de biodiesel (SIGAUS,2020)

## 4. Metodología

La experimentación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la UAM-Azcapotzalco. En la Figura 4.0 se presenta el diagrama del proceso de la metodología aplicada.

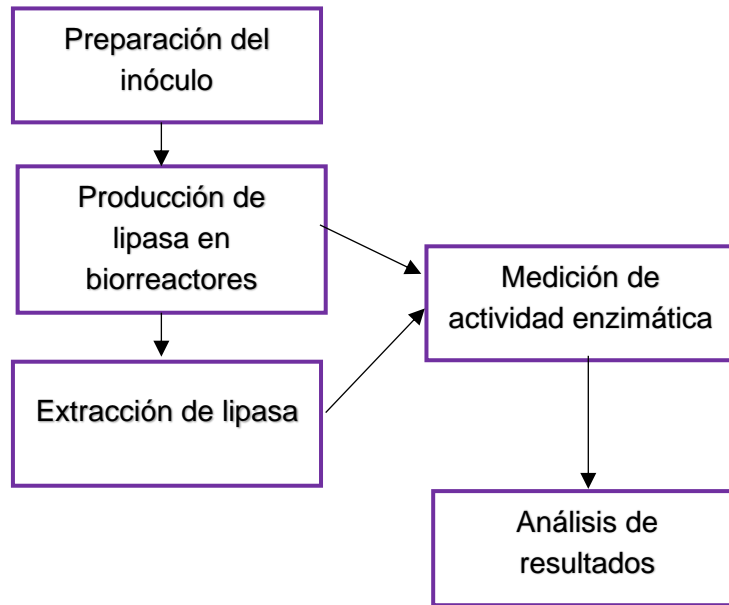


Figura 4.0 Diagrama de flujo de la metodología aplicada

A continuación, se describen las etapas del procedimiento presentado en la Figura 4.0, así como el material, equipo y sustancias que fueron necesarias para su realización.

#### 4.1 Preparación del inóculo

El microorganismo que se usó para la obtención de lipasa es la cepa del hongo *Aspergillus niger* (Figura 4.1) N° CDBB 623 que fue obtenida de la Colección de Cultivos Microbianos del CINVESTAV. La cepa se encontraba en refrigeración por lo que fue necesario resembrarla en tubos de Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) para activarla y pudiera crecer de una manera más rápida (Castañeda, 2004).

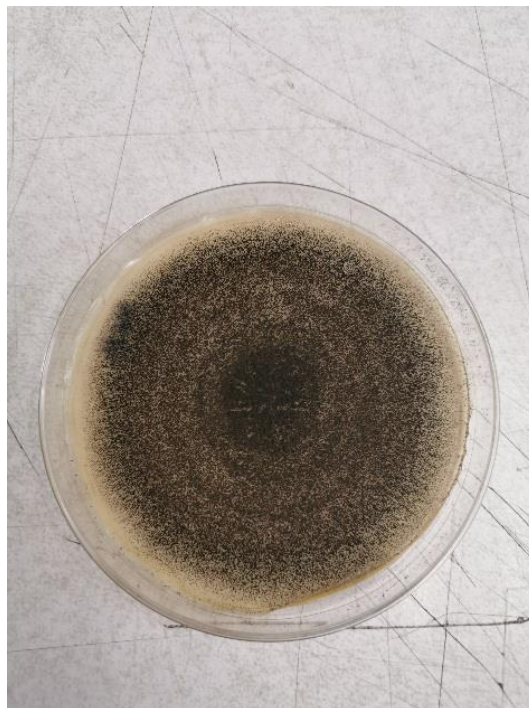


Figura 4.1 Hongo *Aspergillus niger*

Una vez que el hongo presentó un crecimiento normal dentro de los tubos de agar SDA se procedió a inocular por picadura dos botellas Roux con agar SDA estéril como se muestra en la Figura 4.2. Las botellas fueron llevadas a incubación a una temperatura de 28°C durante 48 horas.

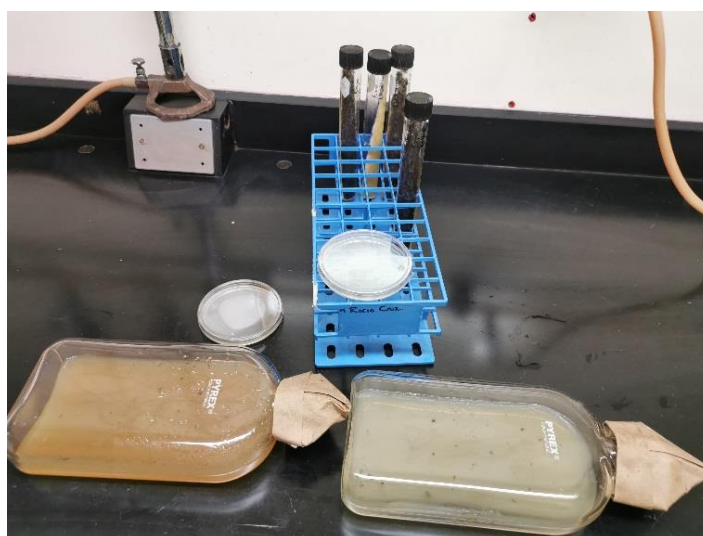


Figura 4.2 Botellas Roux inoculadas con *Aspergillus niger*



líneas superiores y derechas. Si una espora se encontraba sobre las líneas izquierdas e inferiores no era contabilizada.

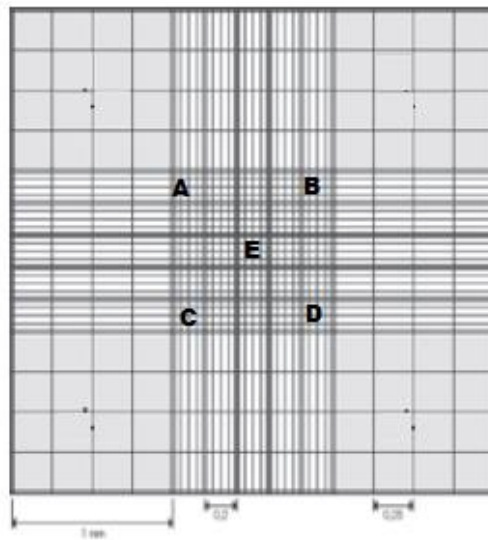


Figura 4.4 Cuadrícula de la cámara Neubauer empleada

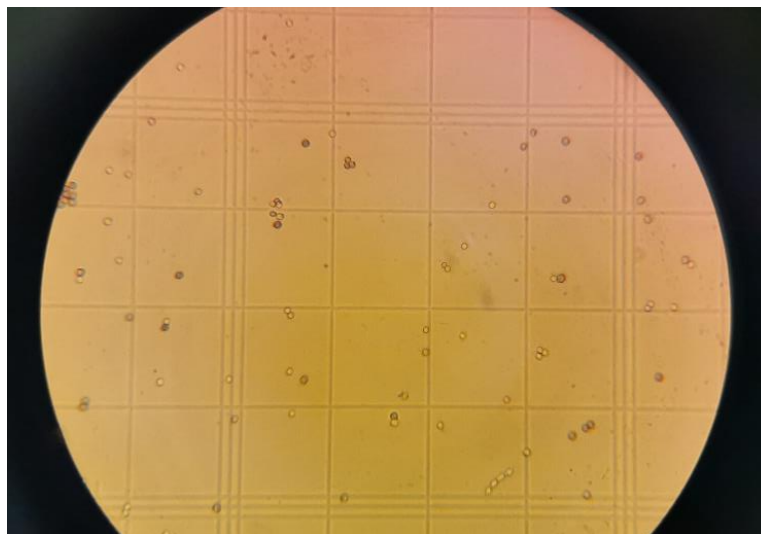


Figura 4.5 Esporas dentro de un cuadrante de la cámara Neubauer

Este proceso fue repetido 5 veces más, dando un total de 30 conteos. De los 30 conteos realizados se obtuvo el promedio de esporas contabilizadas. Para obtener la concentración actual de esporas se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de esporas} = \frac{\text{Promedio de esporas}}{0.02} = \frac{\text{Número de esporas}}{\mu\text{L}}$$

Debido a que la concentración obtenida fue mayor a la esperada, fue necesario diluir la suspensión de esporas con la solución salina de lavado. La cantidad de suspensión de esporas necesaria para preparar la solución a la concentración de esporas deseada fue obtenida mediante la siguiente relación:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

En donde:

- $C_1$ : Concentración actual de esporas
- $V_1$ : Volumen de la suspensión de esporas necesaria
- $C_2$ : Concentración deseada
- $V_2$ : Volumen de la suspensión de esporas deseado

#### 4.2 Producción de lipasa en biorreactores

La producción de lipasa contempló el uso de tres diferentes tipos de aceites como fuente de carbono: aceite de oliva extra virgen (A), aceite de oliva usado (B) y aceite de canola usado (C). Los biorreactores estaban conformados por 300 mL de medio de cultivo el cual estaba compuesto por solución salina y un 10% de suspensión de esporas. Adicionalmente se agregó un 2% de la fuente de carbono a emplear. Cada fuente de carbono fue probada por triplicado (Figura 4.7), además cada aceite tenía 3 testigos: uno sin fuente de carbono (TA1, TB1 y TC1) y dos sin inóculo (TA2, TA3, TB2, TB3, TC2 y TC3) como se puede apreciar en la Figura 4.8. Los testigos que no poseían una fuente de carbono tienen el objetivo de demostrar que la producción de lipasa se ve limitada debido a la falta de lípidos en el medio. Por otra parte, los testigos que no poseen inóculo tienen como objetivo verificar que el aceite que se encuentra presente en el medio no sea hidrolizado por sí solo en el medio de cultivo. Los 18 biorreactores construidos fueron puestos en incubación durante 10 días, a una agitación de 100 rpm y a una temperatura de 30°C.

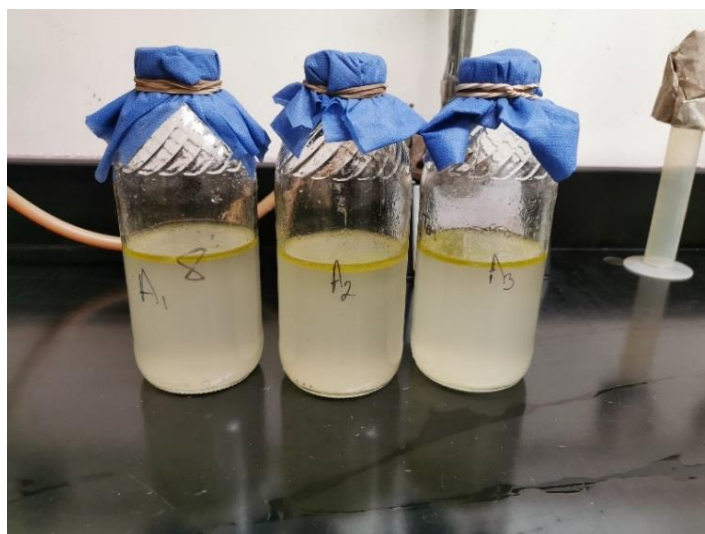


Figura 4.7 Biorreactores con fuente de carbono estériles



Figura 4.8 Biorreactores testigo y blanco estériles

Los biorreactores utilizados en la producción de lipasa tuvieron las siguientes características:

Tabla 4.1 Nomenclatura y composición de los biorreactores empleados

Identificación del biorreactor	Solución salina	Inóculo	Fuente de carbono
A1,	X	X	Aceite de oliva extra virgen
A2	X	X	Aceite de oliva extra virgen
A3	X	X	Aceite de oliva extra virgen
TA1	X	X	
TA2	X		Aceite de oliva extra virgen
TA3	X		Aceite de oliva extra virgen
B1	X	X	Aceite de oliva usado
B2	X	X	Aceite de oliva usado
B3	X	X	Aceite de oliva usado
TB1	X	X	
TB2	X		Aceite de oliva usado
TB3	X		Aceite de oliva usado
C1	X	X	Aceite de canola usado
C2	X	X	Aceite de canola usado
C3	X	X	Aceite de canola usado
TC1	X	X	
TC2	X		Aceite de canola usado
TC3	X		Aceite de canola usado

### 4.3 Medición de actividad enzimática

Durante el cultivo del hongo en los biorreactores la actividad enzimática se midió cada dos días a aquellos biorreactores que sí contaban con inóculo (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, TA<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, TB<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> y TC<sub>1</sub>) y cada cuatro días a aquellos que no tenían inóculo, mejor conocidos como testigos (TA<sub>2</sub>, TA<sub>3</sub>, TB<sub>2</sub>, TB<sub>3</sub>, TC<sub>2</sub> y TC<sub>3</sub>).

La actividad enzimática se midió mediante dos métodos: por titulación, midiendo la acidez que logra el medio de cultivo en un sustrato al hidrolizar los ácidos grasos presentes (Paz y García, 2017), y un método espectrométrico basado en la hidrólisis de un cromógeno (Cervantes *et al.*, 2013), en este caso el p-nitrofenilbutirato (p-NPB).

Debido a que la lipasa es una enzima extracelular y se encuentra disuelta en el medio donde se está cultivando el hongo, es necesario extraer una muestra del medio de cultivo para ser sometida a las pruebas de medición de actividad. Por lo tanto, fueron tomados 6 mL de medio de cultivo de cada biorreactor bajo condiciones asépticas.

#### 4.3.1 Medición por espectrofotometría

Esta parte de la metodología tiene como base lo establecido por Cervantes y colaboradores (2013). La técnica se basa en el principio de la hidrólisis del p-NPB mediante la adición de lipasa. La lipasa hidroliza el p-NPB liberando el ión p-nitrofenol (p-NP) el cuál presenta un máximo de absorbancia a los 400 nm. Para este caso la actividad enzimática se midió en unidades de lipasa (UL), las cuales se definen como la cantidad de enzima que transforma un  $\mu\text{g}$  p-NP por mL de medio en un minuto 
$$\frac{\mu\text{g p-NP}}{\text{mL de medio de cultivo} * \text{minuto}}$$

Los datos recabados fueron unidades de absorbancia por lo que fue necesario la preparación de una curva de calibración en la que se relacionó la concentración de p-NP y absorbancia. La curva de calibración se obtuvo a partir de una solución stock de p-NP: se pesaron 2.6 mg de p-NP, se disolvieron en una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM de pH 7.25 y se aforó con la misma solución amortiguadora a 100 mL; dando así una concentración de 2.6 mg p-NP/ 100 mL de solución. Se adicionó un mL de solución stock a un matraz volumétrico de 10 mL para posteriormente ser aforado con solución amortiguadora de fosfatos. Se repitió el proceso para los volúmenes de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 mL de solución stock y aforados igualmente a 10 mL de solución amortiguadora de fosfatos. Cada dilución se elaboró por duplicado.

Una vez preparadas, fueron leídas en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 en un intervalo de 450 a 350 nm. Se buscó aquella longitud de onda que presentara un máximo de absorbancia para la construcción de la curva de calibración.

Para la medición de actividad se prepararon las siguientes soluciones:

✓ Solución amortiguadora de fosfatos 100 mM con un pH de 7.25. Se pesaron 6 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y disolvieron en 400 mL de agua desionizada. Se ajustó el pH con una solución de NaOH 1N y se aforó a 500 mL.

✓ Solución de p-nitrofenilbutirato (p-NPB) 100 mM. Se tomaron 35  $\mu\text{L}$ , lo equivalente a 41.3 mg de p-NPB (Figura 4.9) y se disolvieron en 2 mL de isopropanol.

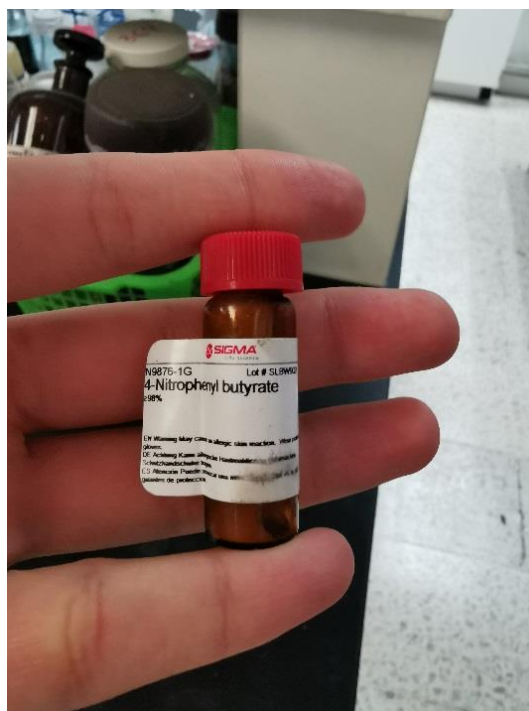


Figura 4.9 Reactivo p-nitrofenilbutirato utilizado

Se tomaron 0.5 mL del medio de cultivo para ser diluidos en 1.5 mL de solución amortiguadora de fosfatos. Se homogeneizó la muestra, se tomó un mL de la solución homogeneizada y se leyó en el espectrofotómetro, para ser tomado como T0. Simultáneamente al otro mililitro restante se le adicionó 10  $\mu\text{L}$  de solución de p-NPB. Una vez que la primera muestra fue leída se reemplazó con la que fue adicionada con p-NPB para ser leída 2 minutos después de la primera lectura. Se tomaron 6 lecturas de cada muestra, una cada 2 minutos para así poder determinar la actividad a lo largo de 10 minutos.

Cada día que hubo una lectura de actividad se obtuvieron 6 datos de absorbancia por cada muestra analizada. Estos datos fueron organizados por día en una base de datos para posteriormente ser graficados y observar la tendencia de los datos. Para poder delimitar la cantidad de datos que sería tomados en cuenta, se tomaron aquellos datos de absorbancia que en la gráfica presentaron un comportamiento lineal ascendente. Una vez que los datos fueron seleccionados se procedió a calcular la pendiente de estos mismos, este valor de la pendiente fue empleado como el valor de absorbancia que se sustituyó en la ecuación obtenida a través de la curva de calibración. Este proceso de repitió para cada

uno de los biorreactores leídos, así como para todos los días de producción en los que se leyó la actividad enzimática.

#### 4.3.2 Medición por titulación

Esta parte de la metodología consta en la medición de la acidez generada debido a la hidrólisis de los lípidos presentes en la leche de vaca una vez que la lipasa fue agregada.

De acuerdo con Paz y García (2017), para medir la acidez presente en el medio es necesario 10 mL de leche de vaca, 10 mL de alcohol etílico al 96% y 2 mL de medio de cultivo, dejar reaccionar la lipasa durante cinco minutos para posteriormente ser titulada con una solución de NaOH a 0.05N y usar fenolftaleína como indicador (Figura 4.10). Este proceso se realizó a cada uno de los medios de cultivo. Para el blanco se tomaron 10 mL de alcohol etílico y 10 mL de leche y se adicionaron 2 mL de agua desionizada dejando por el mismo lapso de cinco minutos.



Figura 4.10 Medición de actividad enzimática mediante titulación.

En ambos casos se registró el volumen gastado de titulante. Para calcular la cantidad de ácidos grasos liberados en cada muestra, con base a los equivalentes de NaOH empleados hasta llegar al punto de equivalencia se emplea la siguiente ecuación:

$$\frac{\mu\text{mol ácido graso}}{\text{mL de medio} * \text{minuto}} = \frac{[Vt - Vb]}{Vm * T} * M * 1000$$

En donde:

- M: Molaridad de la solución de NaOH
- Vt: Volumen de NaOH gastado en la determinación.
- Vb: Volumen de NaOH gastado en el blanco
- Vm: Volumen del medio de cultivo utilizado
- T: Tiempo que actúa la lipasa antes de la titulación

#### 4.4 Extracción de lipasa

Una vez transcurridos los 10 días de producción se procedió a separar la biomasa del cultivo de los biorreactores. Para esto se filtraron con papel filtro el contenido de los biorreactores que contenían aceite y también fueron inoculados, es decir A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>. Una vez filtrados se procedió a juntar en un frasco aquellos que tenían la misma fuente de carbono, es decir, todos los A, todos los B y todos los C. Disminuyendo así el número de muestras, ahora 3.

Para la extracción de la lipasa se siguió el método presentado por Qingchun y colaboradores, donde se satura con sulfato de amonio el medio en el que se encuentra disuelta la lipasa para así lograr una precipitación de las enzimas disueltas en el medio. Para esto se tomaron 500 mL de cada muestra de medio de cultivo filtrado, estos fueron saturados a un 20% de sulfato de amonio y homogeneizados durante dos horas a una velocidad baja y una temperatura de 4°C. El proceso de centrifugado se realizó con la ayuda de una centrífuga Hermle Benchmark Z-206-A como se aprecia en la Figura 4.11. La Solución se centrifugó a 6,000 rpm durante 20 minutos, se separó el sobrenadante (SN20) y se guardó el sedimento (S20). El sobrenadante fue llevado al 50% de saturación de sulfato de amonio, homogeneizado a velocidad baja y a una temperatura de 4°C. Una vez disuelto se detuvo la agitación y se dejó reposar durante cuatro horas. Posteriormente fue llevado a centrifugación a una velocidad de 6,000 rpm durante 30 minutos para separar el sobrenadante (SN50) del sedimento (S50). Los sedimentos obtenidos (S20 y S50) fueron disueltos con 5 mL de una solución de fosfato de sodio 0.05M y pH 7 (Qingchun, *et al.*, 2010). Se midió mediante espectrometría la actividad enzimática de los sedimentos. Una vez que se obtuvieron los extractos enzimáticos se aplicó una prueba de actividad enzimática a los sobrenadantes de ambos procesos de centrifugación (SN20 y SN50). Esto con la finalidad de descartar la presencia de lipasa en los sobrenadantes y así verificar que el proceso de extracción es efectivo.



Figura 4.11 Centrífuga empleada.

#### **4.5 Análisis de resultados**

Como última parte de la metodología se procedió al análisis de los resultados obtenidos identificando si en ambos métodos existe una diferencia de actividad con respecto al testigo sin fuente de carbono. Así como también se comparó la actividad enzimática obtenida en cada uno de los extractos enzimáticos con la actividad obtenida en trabajos de investigación similares que fueron mencionados anteriormente.

## 5. Resultados

En este apartado se presentan los resultados de la actividad enzimática de los medios de cultivo durante la producción de lipasa y de los sobrenadantes y sedimentos después del proceso de extracción.

### 5.1 Preparación del inóculo

El recuento de las esporas dio como resultado un promedio de 108.13 esporas, este valor fue empleado en la determinación de la concentración de esporas presentes en un  $\mu\text{L}$ .

$$\text{Concentración de esporas} = \frac{108.13}{0.02} = 5406 \frac{\text{esporas}}{\mu\text{L}}$$

Debido a que la concentración real de la suspensión de esporas es mayor a la deseada (2,000 esporas/  $\mu\text{L}$ ) se procedió a ajustar la concentración empleando la relación concentración-volumen de la siguiente forma:

$$V_1 = \frac{V_2 C_2}{C_1} = \frac{2000 \frac{\text{esporas}}{\mu\text{L}} * 540 \text{ mL}}{5406 \frac{\text{esporas}}{\mu\text{L}}} = 199.8 \text{ mL de suspensión de esporas}$$

La inoculación de los biorreactores requirió de 540 mL de suspensión de esporas a la concentración deseada, por lo que se tomaron 199.8 mL de la suspensión de esporas actual y se diluyó con solución salina estéril hasta obtener el volumen necesario. Para el ajuste de la concentración fue empleado material esterilizado, como se aprecia en la Figura 5.0, para no contaminar la solución salina.

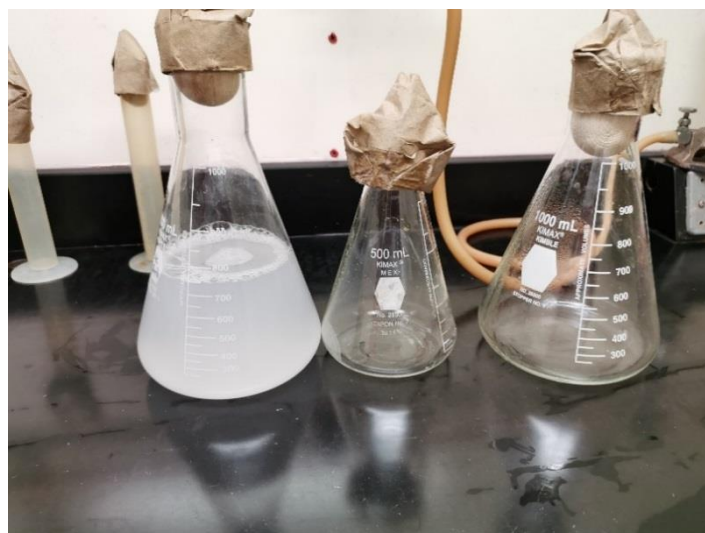


Figura 5.0 Material necesario para el ajuste de concentración de esporas

### 5.2 Medición de actividad enzimática

La medición de actividad enzimática por el método espectrométrico requirió de la elaboración de una curva de calibración que relacionó la concentración de p-

NP con la absorbancia. Los valores de absorbancia tomados en cuenta para la construcción de la curva de calibración fueron aquellos obtenidos a 398 nm, ya que a esta longitud de onda se presentó la máxima absorbancia de p-NP. A continuación, en la Figura 5.4 se presenta la gráfica de absorbancia contra concentración de p-NP en µg/mL.

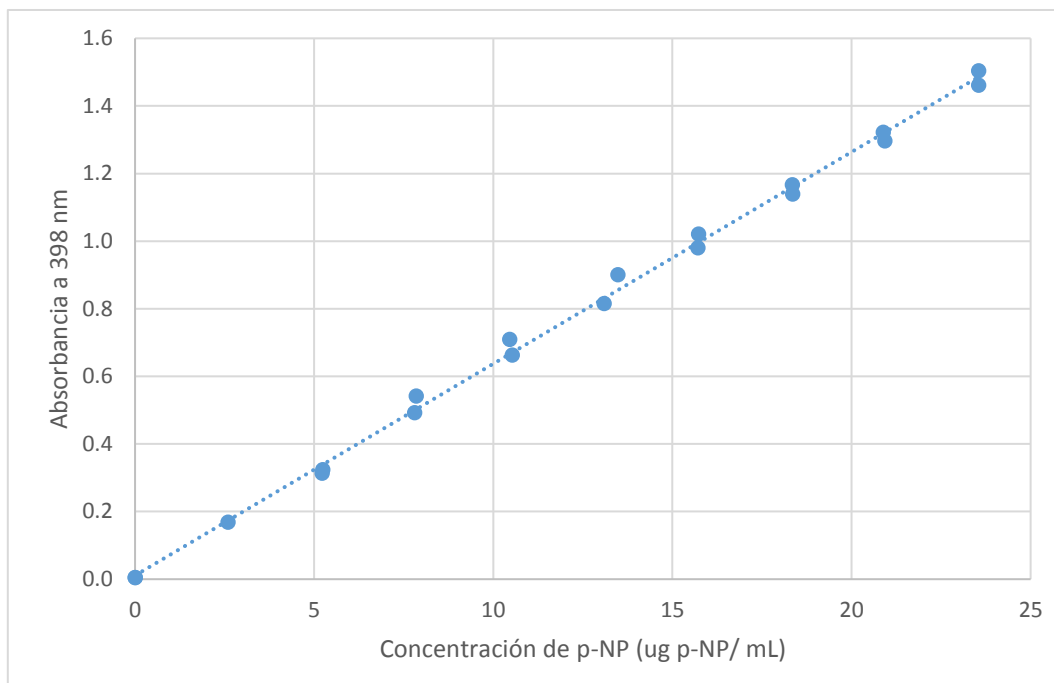


Figura 5.4 Curva de calibración de p-NP

La curva de calibración presentó un coeficiente de correlación de 0.9976 y una relación directa entre la absorbancia y la concentración de p-NP en el intervalo de concentraciones trabajado con la siguiente ecuación de la recta:

$$Absorbancia = 0.063[p - NP] + 0.011$$

Con esta ecuación se determinó la cantidad de p-NP liberado en la muestra una vez que la reacción de hidrólisis fue iniciada y con base a esto se determinó la actividad enzimática como se describió en la metodología.

### 5.3 Producción de lipasa en biorreactores

La producción de lipasa se llevó a cabo durante 10 días bajo condiciones de temperatura y agitación controladas. Algunos biorreactores presentaron distintas características durante la producción, tal es el caso de los biorreactores testigo (TA1, TB1 y TC1), estos biorreactores presentaron un crecimiento de biomasa (Figura 5.1) a pesar de no tener ningún aceite como fuente de carbono

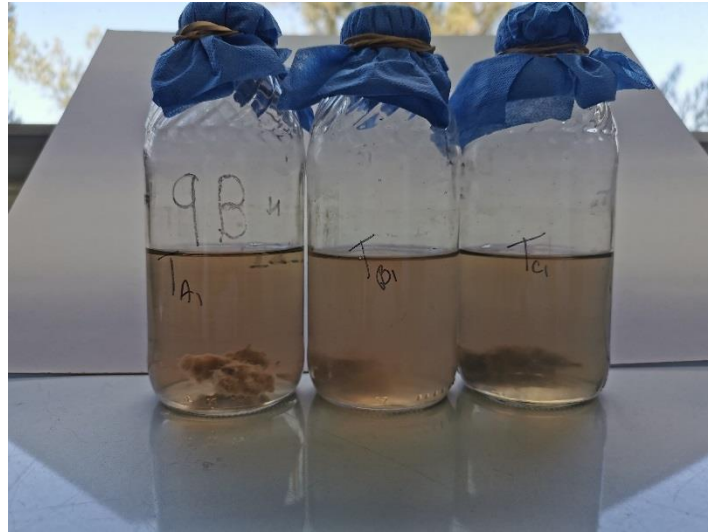


Figura 5.1 Biorreactores testigo al final de la producción

Por otra parte, uno de los triplicados de los biorreactores, aquel identificado como “B2”, contenía la mitad del volumen debido a que, durante el proceso de esterilización, la presión y la temperatura propiciaron la expulsión del medio del contenedor. Como se muestra en la Figura 5.2 la falta de medio no impidió el crecimiento de biomasa.



Figura 5.2 Biorreactores “B” al final de la producción

Otra característica de los biorreactores después de la producción fue la presencia de cierta turbidez como se aprecia la Figura 5.3. Esta turbidez en el medio se atribuyó a la liberación de enzimas, entre ellas lipasa. Todos los

biorreactores presentaron turbidez a excepción del “B2” como se nota en la Figura 5.2.



Figura 5.3 Biorreactores después de la producción de lipasa

### 5.3.1 Medición por espectrometría

A continuación, se presentan los resultados obtenidos a lo largo de los diez días de producción mediante el método espectrométrico. Las siguientes gráficas presentan la actividad medida en unidades de lipasa (UL). Debido a que los biorreactores identificados con la misma letra fueron cultivados bajo las mismas condiciones es posible compararlos entre sí y, por ende, tratarlos como iguales dejando de lado al biorreactor B2 ya que por haber perdido más de la mitad del medio de cultivo durante el proceso de esterilización, no poseía las mismas características de producción. La Figura 5.5 presenta los valores promedio de actividad enzimática de cada tipo de biorreactor con una fuente de carbono y un único testigo conocido como T el cual promedia los resultados reportados por los testigos, ya que los testigos TA1, TB1 y TC1 estaban compuestos de la misma manera

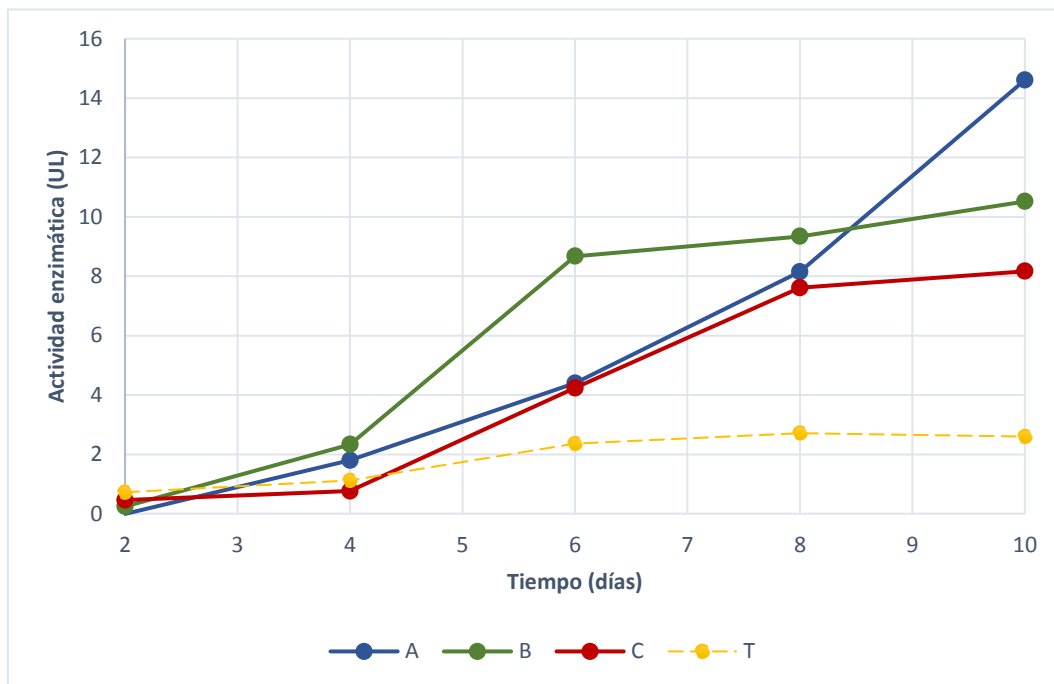


Figura 5.5 Actividad promedio por fuente de carbono

Como se aprecia en la Figura 5.5, el testigo presentó una pequeña actividad enzimática, la cual llegó a su máximo valor en el día de producción número ocho. Por otra parte, los biorreactores que sí contenían una fuente de carbono presentaron una actividad creciente a lo largo de la producción. El comportamiento de los biorreactores A,B y C fue sumamente similar a lo largo de los días de producción. El biorreactor B fue aquel que presentó la mayor producción de lipasa a comparación de los otros dos biorreactores desde el día cuatro de producción, sin embargo, al término de la producción su valor de actividad decreció quedando por debajo de la actividad del biorreactor A.

### 5.3.2 Medición por titulación

En esta parte de la metodología la actividad enzimática se expresa como Unidades de Lipasa (UL) las cuales se obtuvieron de acuerdo con el cálculo empleado por Camacho y Carvajal (2014). Debido a que aquellos biorreactores que tienen la misma fuente de carbono poseían las mismas características y condiciones de producción se agruparon entre ellos como en el método espectrométrico. Al igual que en la Figura 5.5, se promediaron los valores obtenidos de los biorreactores TA1, TB1 y TC1 como un único testigo conocido como T. A continuación, la Figura 5.6 presentan los resultados promedio obtenidos durante la producción.

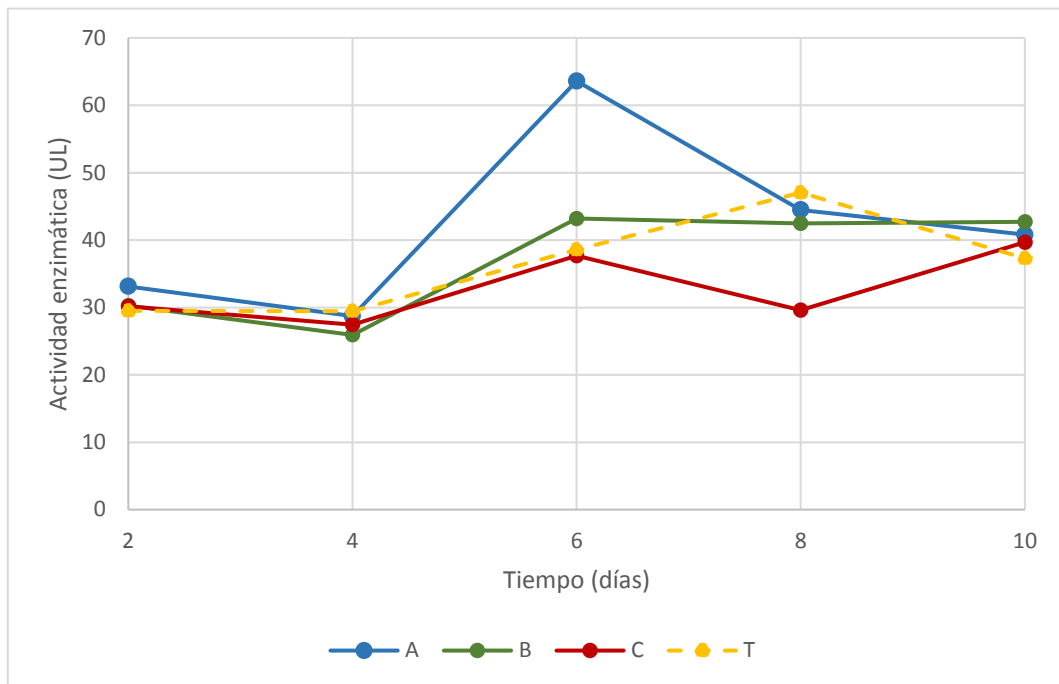


Figura 5.6 Actividad promedio por fuente de carbono

Los valores de actividad obtenidos mediante este método fueron muy similares en los biorreactores con fuente carbono y el testigo. Cabe señalar que no fue notable una diferencia entre los valores de actividad obtenidos de los biorreactores que contenían un aceite y el testigo. Al final de la producción no se presentó un valor de actividad mucho mayor al obtenido en el día dos a excepción del biorreactor A que presentó un valor máximo en el día seis de producción.

#### 5.4 Extracción de lipasa y su actividad

El proceso de extracción fue dividido en dos partes: La saturación del medio de cultivo y su centrifugación, y la resuspensión del sedimento obtenido. Los extractos A y B fueron sometidos a una centrifugación de 5000 rpm por lo que no se logró obtener un sedimento aglomerado, por el contrario, éste se adhirió a las paredes del contenedor como se puede observar en la Figura 5.7. Debido a esto, el volumen empleado para la resuspensión del sedimento fue mayor.



Figura 5.7 Sedimento adherido a las paredes el contenedor

Por otro lado, la centrifugación del extracto C se realizó de acuerdo con lo establecido en la metodología, centrifugándolo a 6000 rpm. Gracias a esto, el sedimento se presentó de forma aglomerada (Figura 5.8) y se pudo resuspender en su totalidad empleando una menor cantidad de solución buffer.



Figura 5.8 Sedimento aglomerado del extracto C

Después de la centrifugación y separación del extracto fue posible notar que el medio enzimático presentaba una mayor claridad a diferencia de la turbidez presente al inicio del proceso de extracción. La Figura 5.9 presenta la comparación del extracto C antes y después del proceso de extracción.

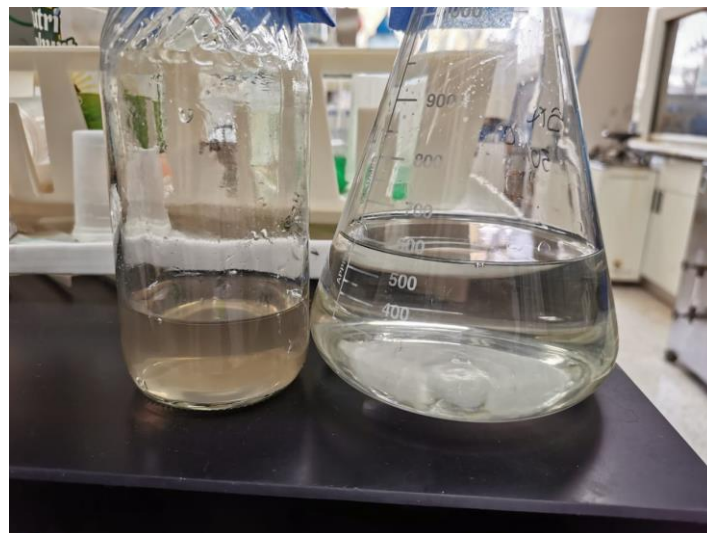


Figura 5.9 Medio enzimático antes (izquierda) y después (derecha) del proceso de extracción

Una vez que los sedimentos fueron resuspendidos, fueron llevados a la medición de su actividad enzimática. Finalmente fueron almacenados bajo refrigeración a 4°C en tubos de ensayo como se muestra en la Figura 5.10.



Figura 5.10 Extractos enzimáticos

La actividad de los extractos se midió mediante el método espectrométrico y se expresa en UL. A continuación, la Tabla 5.1 presenta la cantidad de extracto obtenida de cada tipo de biorreactor después del proceso de resuspensión y la actividad enzimática leída en cada uno.

Tabla 5.1 Volumen de extracto enzimático obtenido

Origen de sedimento	Volumen obtenido (mL)	Actividad enzimática (UL)	Cantidad enzima
<b>A</b>	10	99	990
<b>B</b>	12	79	948
<b>C</b>	5	442	2210

A continuación, la Tabla 5.2 presenta los valores de actividad leídos en los sobrenadantes SN20 y SN50 de las muestras A y B.

Tabla 5.2 Actividad enzimática en los sobrenadantes

Muestra	Actividad enzimática en SN20 (UL)	Actividad enzimática en SN50 (UL)
<b>A</b>	9	7
<b>B</b>	14	13

No se reportan datos de actividad en sobrenadantes de la muestra C debido a que estos fueron desechados accidentalmente antes de poder realizarse alguna prueba.

## 6. Análisis y discusión de resultados

Los biorreactores inoculados presentaron crecimiento a lo largo del proceso de producción independientemente si contaban con una fuente de lípidos. El crecimiento de biomasa en los testigos identificados como TA1, TB1 y TC1 se le atribuye a la presencia de Tween 80 en el medio de cultivo, si bien existió un desarrollo de biomasa, el medio de cultivo no presentaba la misma turbidez presente en los biorreactores que contaban con una fuente de carbono. Los tres aceites que se emplearon como fuente de carbono favorecieron la secreción de enzimas, lo cual se puede confirmar al observar la turbidez presente en los medios de los biorreactores. Esta turbidez se interpreta como enzima disuelta en el medio.

### 6.1 Medición de actividad enzimática

#### 6.1.1 Medición por espectrometría

La medición de actividad enzimática empleando el método espectrométrico presentó una mayor cantidad de datos por lectura, los cuales ayudan a la determinación de la actividad enzimática con mayor precisión. Debido a la presencia de un crecimiento en los biorreactores testigos gracias a la presencia de Tween 80, fue posible obtener un valor de actividad enzimática de ellos. En el empleo de este método fue posible detectar una diferencia notable entre las distintas actividades reportadas por los distintos biorreactores. Los valores de actividad fueron crecientes a lo largo de la producción, a pesar de que la producción duró diez días no es posible decir que la actividad decrece en algún momento por lo que posiblemente la actividad siguiera en aumento en días posteriores. En estudios anteriores (Canseco, 2013) la actividad enzimática de lipasa extraída de hongos filamentosos presentó valores máximos en el último día de incubación para posteriormente decrecer. El hongo perteneciente a la familia *Mucor sp.* presentó un comportamiento distinto ya que presentó una mayor actividad enzimática en el primer día.

Como se pudo observar en la Figura 5.5 el biorreactor que presentó el mayor valor de actividad enzimática durante la producción fue el biorreactor B, pero al finalizar la producción el biorreactor identificado como A presentó un valor de  $14 \pm 0.085$  UL, mientras que el biorreactor A terminó la producción con un valor de actividad de  $11 \pm 2.54$  UL y al final se encontró el biorreactor C con un valor de actividad de  $8 \pm 1.03$  UL.

Como se mencionó anteriormente, los testigos presentaron crecimiento de biomasa en una menor cantidad que aquellos que contenían una fuente de carbono. La presencia de valores de actividad enzimática en los testigos confirma la producción de lipasa independientemente si en el medio de cultivo se cuenta con la presencia de un lípido; si bien *Aspergillus niger* produce lipasa por naturaleza, la presencia de un lípido en el medio favorece a una mayor producción de esta.

De acuerdo con los resultados reportados en la Figura 5.5 se puede decir que el aceite que favoreció una mayor producción de lipasa fue el aceite de oliva por

encima del aceite de canola usado. La actividad reportada por el biorreactor C es menor en un 43% que la actividad reportada en el biorreactor A y un 28% menor que la actividad reportada en el biorreactor B, lo que es considerablemente notable que el hongo aumenta la producción de lipasa en presencia de aceite de oliva sin importar la calidad de este.

### **6.1.2 Medición por titulación**

Los tres biorreactores (A, B y C) reportaron valores de actividad muy similares entre ellos, con un valor máximo en el día de producción número seis para los biorreactores A y B mientras que el valor máximo del biorreactor C se presentó en el día diez. Por otra parte, el testigo no presentó un comportamiento distinto al que se obtuvo de los biorreactores que contenían una fuente de carbono, incluso su valor de actividad reportado en el día ocho de producción fue el más alto de los valores de actividad reportados. Este comportamiento hace creer que no existió una mayor producción de lipasa en aquellos biorreactores que contenían una fuente de carbono, hecho que se contradice con los datos obtenidos en el método espectrométrico.

A diferencia del método espectrométrico, los valores de actividad no representan un aumento en la producción de lipasa, de hecho, presentan la mayor concentración de lipasa en el día seis para después disminuir y presentar valores por debajo del máximo.

Este método de determinación no presentó resultados que indicaran una producción de lipasa favorecida por la presencia de un lípido como fuente de carbono, dado que no existe una diferencia notable entre aquellos biorreactores que poseen un aceite y aquellos que no. Si este método fuese empleado como único en la determinación de actividad enzimática para reportar la presencia de lipasa en un medio de cultivo no sería representativo ni lo ideal dado que la actividad enzimática reportada al inicio y al final del ensayo fueron similares entre ellas.

Por otra parte, el método espectrométrico presentó valores sumamente distintos entre la actividad en los testigos y los biorreactores con fuente de carbono, por lo que se asume que este método presenta una mayor sensibilidad a la detección de actividad enzimática y es considerado el método más confiable para la determinación de actividad enzimática.

Los dos métodos empleados en la determinación de la actividad enzimática presentaron resultados de actividad a lo largo de la producción. Si bien mediante el método por titulación se obtuvieron valores de actividad, no se presentó una diferencia notable entre el testigo y los biorreactores con una fuente de carbono, lo que indicaría que no existe una producción de lipasa en los biorreactores que cuentan con un lípido. Es por esto por lo que el método por titulación no se considera confiable para la determinación de actividad enzimática de lipasa.

## 6.2. Extracción de lipasa y su actividad

La extracción de enzima no fue eficiente al 100% debido a que los métodos aplicados no fueron los mismos en las tres muestras. De los biorreactores A y B se obtuvo una mayor cantidad de extracto con una actividad menor a lo obtenido en el biorreactor C ya que la fuerza de centrifugación empleada en las muestras A y B fue menor a la que se empleó en la muestra C. Se asume que de los extractos A y B obtenidos se puede concentrar la enzima en un volumen aún más pequeño y también es posible sedimentar todavía más la enzima diluida ya que el medio de cultivo presentaba turbidez remanente y sus sobrenadantes SN50 presentaban actividad enzimática. El sobrenadante SN50 de la muestra B presentó un valor de actividad mayor al obtenido en la muestra A, esto indicaría que existe una mayor cantidad de enzima disuelta en el SN50 de la muestra B, el cual puede ser extraído si se somete nuevamente la muestra al mismo proceso de extracción. Esto también es aplicable al sobrenadante SN50 de la muestra A. Al someter los extractos a la fuerza de centrifugación planteada en la metodología es posible obtener valores de actividad enzimática mayores a los reportados debido a que la lipasa se concentrará aún más en los extractos ya obtenidos.

Los valores reportados en trabajos de investigación previos señalan una actividad enzimática por gramo de extracto, como es el caso del trabajo de Cujilema y colaboradores (2018), donde la mayor actividad reportada fue de 210 UL/gMS. En el caso de los extractos obtenidos no es posible darle un valor en masa ya que por haber sido muy poco el sedimento obtenido había agua en el contenedor lo que haría difícil obtener su valor en peso y si se hubiese sometido a un proceso calorífico para la eliminación de humedad, éste habría desactivado la lipasa. Por lo que hacer una comparación entre ambos valores de actividad no es posible, ya que no se encuentran en las mismas unidades. Los valores de actividad obtenidos en la experimentación pueden ser presentados por mililitro de extracto dando así valores de actividad de 10 UL/mL para el biorreactor A, 7 UL/mL para el biorreactor B y 88 UL/mL para el biorreactor C.

En el caso de los biorreactores A y B el proceso de extracción no fue óptimo por lo que se considera necesario seguir nuevamente la metodología y así obtener un extracto con mayor actividad enzimática por mililitro.

## 7. Conclusiones

Durante la etapa de producción se presentó un aumento gradual en la actividad enzimática registrado en el método espectrométrico. Este creciente de actividad es atribuido al aumento de la concentración de lipasa disuelta en el medio de cultivo. A diferencia de los biorreactores con aceite, los testigos que no poseían una fuente de carbono presentaron una actividad enzimática muy por debajo de la obtenida en los biorreactores con lípidos; este comportamiento se debe a la ausencia de un lípido que favorezca el aumento de la producción de lipasa.

Por otra parte, el método por titulación no presentó resultados significativos que indicaran el incremento en la producción de lipasa en el medio de cultivo. El método presentó valores finales de actividad enzimática mayores a los iniciales dando por hecho que sí existió una producción más no una que se viera favorecida por la presencia de un lípido. Para este tipo de investigaciones donde la medición de la actividad enzimática es esencial para determinar si una variante en la producción puede favorecer o no la producción de una enzima se recomienda el empleo de un método de cuantificación que posea una mayor precisión como es el caso del método espectrométrico.

Los valores obtenidos mediante el método espectrométrico para los distintos tipos de biorreactores son los siguientes: el biorreactor con aceite de oliva extra virgen presentó un valor final de 15 UL, el biorreactor con aceite de oliva usado presentó un valor de 11 UL y el biorreactor con aceite de canola presentó un valor de 8 UL. A partir de estos datos se puede afirmar que la fuente de carbono que presentó el mayor valor de actividad enzimática durante la producción fue el aceite de oliva extra virgen, seguido muy de cerca por el aceite de oliva usado, dejando al final al aceite de canola usado. La diferencia de actividad entre los aceites de oliva no resultó mayor a cuatro unidades por lo que se puede decir que ambos tienen la misma eficiencia en cuanto al favorecimiento en la producción de lipasa. Por otra parte, el aceite de canola usado presentó valores de actividad tres unidades debajo de los obtenidos de los aceites de oliva. El aceite de canola usado no se descarta como inductor de lipasa ya que los valores no son lo suficientemente bajos como para asegurar que no favorece la producción de lipasa.

El proceso de extracción de lipasas se llevó a cabo de manera exitosa en los tres biorreactores distintos ya que se obtuvo un extracto de los tres. Del biorreactor identificado como A fue posible obtener 10 mL de extracto con una actividad de 99 UL, del biorreactor B se obtuvieron 12 mL de extracto con una actividad de 79 UL y del biorreactor C se obtuvieron 5 mL de extracto con una actividad de 442 UL. Si bien no se obtuvo el mismo volumen en los tres extractos, los tres presentaron valores de actividad; lo que confirma la concentración de lipasas en ellos haciéndolos aptos para su empleo como biocatalizador sin embargo, la actividad reportada en los extractos A y B fue menor a la obtenida en el extracto C, por lo que se recomienda realizar nuevamente el proceso de extracción al medio de cultivo remanente del proceso ya que puede encontrarse lipasas

disuelta en el medio la cual de ser extraída aumentaría la actividad enzimática de sus extractos.

De acuerdo con los resultados obtenidos es posible decir que la producción de lipasas se llevó a cabo en los tres distintos tipos de biorreactores, lo que indica que la presencia de lípidos, en este caso aceites de grado alimenticio, en el medio de cultivo inducen a los microorganismos a aumentar la producción de lipasas para así garantizar la viabilidad del microorganismo en el medio independientemente si la fuente de carbono es residuo de un proceso.

## 8. Bibliografía

- Aceves, A.E y Castañeda, L.M. (2012). Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. *Revista Vitae*.19(3):244-247.
- Bart, J.C., Palmeri, N. y Cavallaro, S. (2010). *Biodiesel Science and Technology: From Soil to Oil*. Oxford: Woodhead; CRC Press.
- Betanzos, L.I. y Garcés, I.D. (2011). Estudio de la obtención de biodiésel por catálisis enzimática a partir de aceites comestibles usados. Proyecto de Integración de la Licenciatura de Ingeniería Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Azcapotzalco. Pág: 38-54.
- BRENDA The Comprehensive Enzyme Information System (2020) Consultado el 3 de octubre de 2020, BRENDA, página web base de datos : <https://brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.1.1.3&Suchword=&reference=&UniProtAcc=&organism%5B%5D=Aspergillus+niger>
- Camacho, T. y Carvajal, C. (2014). Diferentes métodos para cuantificar la actividad enzimática de hidrolasas de importancia comercial. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Ecuador.
- Castañeda Briones, M.T. (2004). Manual de Laboratorio de Microbiología Aplicada. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco. Pág: 104-109.
- Cervantes, E., Salazar, L. M. y Diaz, P. E. (2013) Lipasas inducidas por hidrocarburos del petróleo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 29(2): 9-15.
- Coca, J., Hernández, O., Berrio, R., Martínez, S., Diaz, E. y Dustet S. (2001). Producción y caracterización de las lipasas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus*. *Biotecnología Aplicada*. 18(4):216–20.
- Cruz Miguel, D. (2015). Obtención de biodiésel a partir de la microalga *Neochloris oleabundans*. Proyecto de Integración en Ingeniería Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco. México.
- Cuevas, M.C., Espinosa, G., Ilizaliturri, C.A. y Mendoza, A. (2012). Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). México.
- Cujilema, M.C., León, G., Rizo, M., Taramona, L., y Ramos, L.B. (2018). Producción de lipasas por fermentación sólida con *Aspergillus niger*: influencia del pH. *Centro azúcar*. 45(4):1-9.
- Enciclopedia colaborativa en la red cubana “EcuRed” (2020) *Aspergillus*. Consultado el 6 de octubre de 2020. <https://www.ecured.cu/Aspergillus>
- Encyclopedia Britannica. (2019). “Lipase.” Consultado el 16 de junio de 2019.

<https://bidi.uam.mx:6402/levels/collegiate/article/lipase/48438>

- Gómez, C., Nieto, S., Nicolás, A., Sánchez, G. y Lozano, P. (2011) Síntesis enzimática de biodiésel en líquidos iónicos con comportamiento de esponja. Facultad de Química. Universidad de Murcia. España
- González, J., Rodríguez, J. y Del Monte, A. (2010) Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Revista Colombiana de Biotecnología* XII(1) 124-140.
- Hernández, G.E., Reyes, A. L, Garrido, R.E.R., Solís, BJ L. y Nájera, D.W. (2017). Hongos productores de lipasas, una alternativa amigable para la producción de biodiesel en México. *AGROProductividad*.10(10):10-15.
- Moreira Santos, E. (2012). Las materias primas utilizadas en la producción. *INGENIUM. Revista de la Facultad de Ingeniería*. 13(25): 53-61.
- Paz Francis P.L. y García Pibaque E.P. (2017). Obtención de lipasas fúngicas, para complemento en la producción de jabones y detergentes usado en la hidrólisis de lípidos. Trabajo de investigación para obtener el grado de ingeniero químico. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química. Pág.: 45-47
- Periche Fiestas D. y Robles Castillo H. (2016) Efecto de la concentración de surfactante Polioxietileno (20) Monooleato de sorbitán “Tween 80” en la biodegradación de petróleo Diesel II en suelo por *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*. 36(1): 10-18.
- Prescott, L.M., Harley, N.N. y Klein, N.N. (2003). Microbiología. McGraw-Hill. Pág. 211.
- Procuraduría Federal del Consumidor (2010) Estudio de calidad: Aceites vegetales comestibles. El laboratorio PROFECO reporta. Octubre 10
- Qingchun, J., Sujing, X., Bingfang, H. y Xiaoning, L. (2010). Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 66(3-4):264-269.
- Ramírez, C.M., Gómez, B.D., Martínez, J.P. y Cardona, L.M.(2014) Perfil de ácidos grasos en aceites de cocina de mayor venta. Perspectivas en nutrición humana. Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad de Antioquía. Medellín. Colombia 16(2) 175-185
- Ramírez, J., Medina, J. y Martínez, J.M. (2011). Obtención de biodiésel con aceites de maíz usado en frituras y metacaolinita como catalizador. *Revista Acta Universitaria*. 21(1801):19–26.
- San Miguel, G., Gutiérrez, F. y Aracil, J. (2015). Tecnologías para el uso y transformación de biomasa energética. Ediciones Paraninfo.

- Sánchez Ferrer, A. (2003) Recuperación, purificación y caracterización de olixietilenolipasas producidas por *Candida rugosa*. Aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático. Tesis Doctoral en Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Barcelona. España. Pág: 43–49.
- Sistema de Gestión de aceites industriales usados en España (2020) ¿Qué se hace con el aceite usado?. Consultado el 7 de noviembre de 2020. <https://www.sigaus.es/-que-se-hace-con-el-aceite-usado->
- Trejo Prado, E. (2017). Cultivo de levaduras en agua residual pretratada para la obtención de biodiésel. Proyecto de Integración en Ingeniería Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco. México.
- Wanionok, Nahuel (2017). Prospección biotecnológica de lipasas y peptidasas provenientes de látex de plantas. Trabajo para optar al Título de Licenciado en Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata. Argentina
- Wong, P. y Farrés A. (1999). Lipasa termoestable de *Bacillus pumilus* GMA1: Producción fermentativa y algunas propiedades. Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México . México.
- Yildirim, D. y Tükel, S. (2013). Immobilized *Pseudomonas sp* lipase: A powerful biocatalyst for asymmetric acylation of ( $\pm$ )-2-amino-1-phenylethanol with vinyl acetate. *Process Biochemistry*. 48(5-6):819-830.