

**EVALUACIÓN DE UN BIOCATALIZADOR INMOVILIZADO EN UN PROCESO  
DE HIDRÓLISIS DE ACEITE DE OLIVA QUE GENERE UNA ALTERNATIVA  
CATALÍTICA ECO AMIGABLE EN PROCESOS DE ESTERIFICACIÓN**

**KELLY JOHANNA PRADA CAÑAS**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍA FÍSICO-QUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2017**

**EVALUACIÓN DE UN BIOCATALIZADOR INMOVILIZADO EN UN PROCESO  
DE HIDRÓLISIS DE ACEITE DE OLIVA QUE GENERE UNA ALTERNATIVA  
CATALÍTICA ECO AMIGABLE EN PROCESOS DE ESTERIFICACIÓN**

**KELLY JOHANNA PRADA CAÑAS**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniería  
Química**

**Director**

**PhD. Fredy Augusto Avellaneda Vargas**

**Codirectores**

**PhD. Ángela Adriana Ruiz Colorado**

**Ing. John Henry Castro Posada**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍA FÍSICO-QUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2017**

## DEDICATORIA

A Dios por ser el motor de mi vida, por acompañarme y permitirme llegar donde estoy, porque no soy nada si Él no está conmigo.

A mis padres, Danneris Cañas Badillo e Israel Suarez Vega por el apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, por brindarme siempre el sustento económico y moral en todo el transcurso de esta alma máter y lo más importante por enseñarme el significado del amor verdadero y a toda mi familia en general.

A Matilde Blanco por ser esa segunda mamá, por ser esa persona única e integral, que siempre estuvo en momentos difíciles ya que cada vez que necesité de su apoyo y de su ayuda ella la brindaba desinteresadamente.

A mis amigos ingenieros mecánicos de la Universidad Industrial de Santander por brindarme una amistad verdadera y porque con ellos disfrute momentos especiales de mi vida en la universidad.

Al grupo de Bioprocesos y Flujos Reactivos de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, facultad de Minas por ser esa entidad que permitió generar un aprendizaje colaborativo además de prestar sus instalaciones y equipos para la realización de la pasantía de investigación.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander, por transmitir de forma integral todos los conocimientos en el área de ingeniería química a través de su personal docente y administrativo.

A la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, especialmente al grupo de Bioprosos y Flujos Reactivos por permitir espacios de intercambio cultural y académico con el fin de generar conocimiento.

Agradecimientos especiales al doctor Fredy Avellaneda Vargas, a la doctora Adriana Ruiz Colorado y al magister John Henry Castro Posada por ser esas personas que me brindaron una constante motivación, apoyo y guía.

Agradecimientos al profesor Crisóstomo Barajas Ferreira por darme la oportunidad de realizar una pasantía de investigación.

## CONTENIDO

|   | pág. |
|---|------|
| INTRODUCCIÓN .....  | 15   |
| 1. METODOLOGÍA.....   | 21   |
| 1.1 FASE 1: ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN UN PROCESO DE ESTERIFICACIÓN. ....        | 22   |
| 1.1.1 Condiciones Generales.....  | 22   |
| 1.1.2 Condiciones Específicas .....   | 23   |
| 1.2 FASE 2: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR DOS MÉTODOS: ESTERIFICACIÓN E HIDRÓLISIS DE ACEITE VEGETAL (OLIVA). .... | 23   |
| 1.3 FASE 3: INMOVILIZACIÓN DE LA LIPASA .....   | 24   |
| 2. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....   | 25   |
| 2.1 ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN UN PROCESO DE ESTERIFICACIÓN .....                | 25   |

|   |    |
|---|----|
| 2.1.1 Descripción de la reacción.....                     | 25 |
| 2.1.2 Preparación de reactivos. ....                      | 25 |
| 2.1.3 Condiciones sistema de reacción .....               | 26 |
| 2.1.4 Pruebas experimentales. ....                        | 26 |
| 2.1.5 Prueba cualitativa con fenolftaleína. ....          | 30 |
| 2.2 MEDICIÓN DE ACTIVIDAD.....                            | 31 |
| 2.2.1 Esterificación.....                                 | 31 |
| 2.2.2 Hidrólisis de aceite de Oliva.....                  | 31 |
| 2.3 INMOVILIZACIÓN DE LA LIPASA 20 DE CANDIDA RUGOSA..... | 32 |
| 2.3.1 Factores de la inmovilización. ....                 | 32 |
| 2.3.2 Resultados factores de la inmovilización. ....      | 34 |
| 3. CONCLUSIONES.....                                      | 38 |
| 4. RECOMENDACIONES .....                                  | 39 |

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....40

BIBLIOGRAFÍA.....46

ANEXOS.....49

## LISTA DE TABLAS

|   | pág. |
|---|------|
| Tabla 1. Tipos de enzimas utilizadas en procesos de transesterificación y esterificación.....   | 19   |
| Tabla 2. Condiciones de operación de la reacción de esterificación.....   | 26   |
| Tabla 3. Coeficientes de variación para cada una de las pruebas por triplicado con una concentración de NaOH de 0.4 M.....                                  | 27   |
| Tabla 4. Coeficientes de variación para cada una de las pruebas por triplicado con una concentración de NaOH de 0.1 M.....                                  | 29   |
| Tabla 5. Valores de actividad enzimática por el método de esterificación .....  | 31   |
| Tabla 6. Valores de actividad enzimática medidos por el método de emulsión de aceite de oliva (hidrólisis).....   | 31   |
| Tabla 7. Actividad catalítica de la enzima inmovilizada vs enzima libre en U/g-enzima .....   | 34   |
| Tabla 8. Comparación entre los factores de inmovilización obtenidos en este trabajo y los reportados en literatura con un sistema de alginato de sodio..... | 35   |
| Tabla 9: Datos para la curva de calibración de la prueba de Bradford de medición de proteína.....   | 53   |

## LISTA DE FIGURAS

|   | pág. |
|---|------|
| Figura 1. Técnicas de inmovilización de enzimas.....  | 18   |
| Figura 2. Diagrama metodológico para el desarrollo del presente trabajo de investigación .....  | 21   |
| Figura 3. Comparación entre el valor promedio de actividad enzimática y su desviación estándar utilizando diferentes volúmenes de inhibidor con una concentración de NaOH de 0.4 M..... | 27   |
| Figura 4. Comparación entre el valor promedio de actividad enzimática y su desviación estándar utilizando diferentes volúmenes de inhibidor con una concentración de NaOH de 0.1 M..... | 29   |
| Figura 5. Factores de inmovilización, calculados para la lipasa 20 de <i>Cándida rugosa</i> inmovilizada en perlas de alginato de calcio .....  | 35   |
| Figura 6. Formación de geles de alginato, “Egg Box” .....   | 36   |

## LISTA DE ANEXOS

|  | pág. |
|--|------|
| Anexo A. Materiales insumos y equipos.....   | 49   |
| Anexo B. Método clásico de emulsión de aceite de oliva.....  | 49   |
| Anexo C. Protocolo inmovilización de la lipasa 20 de <i>Cándida rugosa</i> en alginato de sodio..... | 50   |
| Anexo D. Protocolo medición de proteína por el método de Bradford.....                               | 51   |
| Anexo E. Protocolo de medición de actividad enzimática por la esterificación de ácido láurico.....   | 54   |

## RESUMEN

**TITULO:** EVALUACIÓN DE UN BIOCATALIZADOR INMOVILIZADO EN UN PROCESO DE HIDRÓLISIS DE ACEITE DE OLIVA PARA GENERAR UNA ALTERNATIVA EN LA CATÁLISIS DE LOS PROCESOS DE ESTERIFICACIÓN Y TRANSESTERIFICACIÓN \*

**AUTOR(A):** Kelly Johanna Prada Cañas \*\*

**PALABRAS CLAVES:** Inmovilización, Actividad enzimática, Titulación, Protocolo.

### DESCRIPCIÓN

El proyecto titulado “Evaluación de un biocatalizador inmovilizado en un proceso de hidrólisis de aceite de oliva que genere una alternativa catalítica eco-amigable en procesos de esterificación”, fue realizado con el grupo de Bioprocesos y Flujos Reactivos de la Universidad Nacional sede Medellín como parte de un trabajo de maestría vinculado a COLCIENCIAS. El alcance del proyecto se realiza mediante la aplicación de tres fases, la primera es el establecimiento de un protocolo para la medición de actividad enzimática en un proceso de esterificación con el fin de especificar, el volumen de inhibidor de la reacción, la concentración de titulación y el pH. La segunda fase consiste en la medición de actividad por dos métodos: esterificación de ácido láurico e hidrólisis de aceite de oliva. Finalmente, la inmovilización de la lipasa 20 de *Cándida rugosa* en perlas de alginato de sodio permite la evaluación del biocatalizador.

Se obtuvo que 5 mL de inhibidor, 0.1 M de hidróxido de sodio para la solución tituladora y 9.65 de pH, fueron las condiciones que presentaron un coeficiente de variación de menos del 1%. La actividad enzimática medida por los dos métodos propuestos estuvo dentro del rango que propone la literatura (1100-2100 U/g) y en la evaluación del biotacalizador se obtuvo el 96.7% de la proteína retenida, el 30% de actividad recuperada y el 47% de actividad retenida.

Los resultados obtenidos llevaron a recomendar mejoras en la técnica de inmovilización, aunque, con el sistema propuesto, se obtienen factores de inmovilización acordes con los de literatura.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director Fredy Avellaneda Vargas, Ingeniero Químico.

## ABSTRACT

**TITLE:** EVALUATION OF AN IMMOBILIZED BIOCATALYST IN A PROCESS OF HYDROLYSIS OLIVE OIL GENERATES AN ECOFRIENDLY CATALYTIC ALTERNATIVE IN ESTERIFICATION PROCESSES \*

**AUTHOR (s):** Kelly Johanna Prada Cañas \*\*

**KEYWORDS:** Immobilization, Enzyme activity, Titration, Protocol.

### DESCRIPTION

The project titled "Evaluation of an immobilized biocatalyst in a process of hydrolysis of olive oil that generates an ecofriendly catalytic alternative in esterification processes" was carried out with the Bioprocesses and Reactive Flows group of the National University of Medellín as part of a Master's work linked to COLCIENCIAS. The scope of the project is carried out by applying three phases, the first is the establishment of a protocol for the measurement of enzymatic activity in an esterification process in order to specify the volume of inhibitor of the reaction, titration concentration And pH. The second phase consists of the measurement of activity by two methods: esterification of lauric acid and hydrolysis of olive oil. Finally, the immobilization of the *Cándida rugosa* lipase 20 in sodium alginate beads allows evaluation of the biocatalyst.

It was obtained that 5 mL of inhibitor, 0.1 M sodium hydroxide for the titrant solution and 9.65 pH were the conditions that presented a coefficient of variation of less than 1%. The enzymatic activity measured by the two proposed methods was within the range proposed by the literature (1100-2100 U / g) and in the biotacalizer evaluation, 96.7% of the retained protein, 30% of recovered activity and 47% of retained activity were obtained.

The results obtained led to recommend improvements in the immobilization technique, although, with the proposed system, immobilization factors are obtained according to literature.

---

\* Bachelor Thesis

\*\* Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Fredy Avellaneda Vargas, Ingeniero Químico.

## INTRODUCCIÓN

Los catalizadores son ampliamente utilizados en una variedad de reacciones químicas industriales debido a su capacidad para aumentar las velocidades de las reacciones químicas sin requerir un aumento de temperatura [1]. Diferentes metales como el cobre, la plata y el platino, actúan como catalizadores en distintas reacciones de oxidación, las zeolitas en reacciones de isomerización, las sílices en reacciones de alquilación y un compendio de componentes químicos hacen más sencillo el transcurso de las reacciones; sin embargo, no siempre los catalizadores son elementos químicos, muchas veces son componentes orgánicos que contienen proteínas plegadas, tal es el caso de las enzimas.

Las enzimas son catalizadores biológicos que permiten que las reacciones sean un millón de veces más rápidas que las no catalizadas, ya que reducen la energía de activación; por lo cual actualmente su uso en aplicaciones industriales está creciendo significativamente [2,3]. Existen diferentes tipos de enzimas cada una de ellas con una forma y tamaño específico, pero comparten ciertas características en común: cada enzima tiene un sitio activo, este sitio representa el lugar donde los sustratos son capturados y llevados a participar en una reacción específica para formar productos, además estas proteínas especiales pueden unirse a un solo tipo de sustratos. Finalmente, las enzimas son reciclables, debido a que éstas no se alteran durante las reacciones, salvo que las condiciones de proceso sean tan agresivas que desnaturalicen la proteína. Por lo tanto, se necesita solo de una pequeña cantidad de enzimas para catalizar miles de reacciones [4].

El uso de la catálisis enzimática como medio de aplicación a diversos procesos de transesterificación y esterificación para la producción de biodiesel es uno de los

principales temas de estudio por la comunidad científica en los últimos diez años. Pocas plantas químicas han empleado procesos enzimáticos en sus producciones industriales, debido principalmente a que los catalizadores químicos convencionales usados en este tipo de procesos, tales como hidróxido de sodio y ácido sulfúrico, son más rentables económicamente que los catalizadores enzimáticos. Sin embargo, se hace necesario investigar sobre la aplicación de este tipo de catálisis, con el fin de proponer mejoras a los procesos tradicionales, ya que éstos generan agentes contaminantes que afectan la atmósfera y dificultan la etapa de separación y purificación de los productos. También se pretende realizar aportes investigativos en cuanto al uso de biocatalizadores, con el fin de que éstos sean una alternativa viable a la hora de ser implementados en procesos de mayor escala.

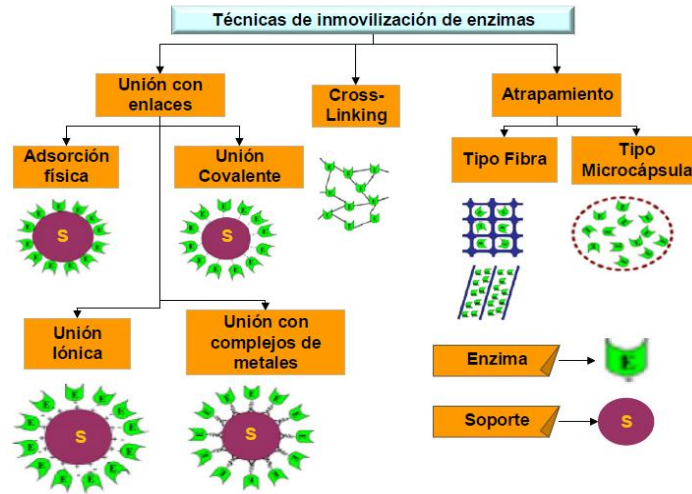
La catálisis enzimática puede ser aplicada a diversos procesos; la esterificación y la transesterificación son algunos de ellos. Las lipasas se utilizan específicamente para catalizar la hidrólisis de triglicéridos a ácidos grasos y glicerol, y bajo ciertas condiciones de proceso, catalizan la reacción inversa. Estas enzimas hidrolíticas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y están presentes en los procesos metabólicos degradables de algunas plantas y animales. Las lipasas son producidas por un gran número de microorganismos (animales, humanos, levaduras, bacterias, hongos, plantas) y una considerable cantidad se encuentra comercialmente disponible [5]. Para el proceso catalítico de esterificación y transesterificación, se pueden utilizar tanto las enzimas en forma libre como inmovilizadas; las enzimas en forma libre se agregan directamente al medio reactivo. Sin embargo, a pesar de que se puede llegar a tener altas conversiones en un proceso específico, el sitio activo de la enzima se ve altamente afectado por los cambios abruptos de temperatura, pH, efecto de cizalla y presencia de inhibidores. Por otro lado, una enzima inmovilizada está definida como aquella enzima física o químicamente confinada en una determinada región (soporte), mediante la cual se pueda retener su actividad catalítica y además obtener mayores

ciclos de reutilización de la misma, haciendo que el proceso de aplicación industrial pueda ser más rentable en cuanto a costos y amigable con el medio ambiente [6]. Por lo tanto, para realizar una inmovilización enzimática se necesita tener un sistema coordinado, definiéndose como el conjunto enzima-soporte en el cuál se aplica una técnica para su unión. Como muestra la Figura 1, existen diversas técnicas para realizar la inmovilización de enzimas. Estas pueden ser clasificadas en cuatro tipos: Adsorción, Cross-linking, Atrapamiento y unión covalente.

La adsorción es una de las técnicas más usadas para inmovilización por su bajo costo y efectividad [7]. La ventaja de la inmovilización de las enzimas mediante el proceso de adsorción es la versatilidad, ya que el método puede ser aplicado para enzimas de diferentes tipos. Otras ventajas con respecto a las demás técnicas es la facilidad para realizar la síntesis de la inmovilización, bajo condiciones sencillas de preparación, con bajo costo del soporte y del proceso. En esta técnica, la interacción enzima-soporte se da por fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas [8].

El cross-linking es una técnica que consiste en la inmovilización de la enzima mediante entrecruzamientos intermoleculares entre el soporte y la enzima, de tal forma que se forme una estructura tridimensional. La enzima adquiere estabilidad debido a su fuerte interacción con el soporte. Sin embargo, las condiciones de proceso son rigurosas y puede llegarse a producir pérdida de la actividad enzimática en la síntesis del proceso [9]. Esta pérdida de actividad se asocia a que en el cross-linking se hace necesario el uso de reactivos tóxicos que pueden cambiar la conformación de las enzimas [8].

**Figura 1.** Técnicas de inmovilización de enzimas



Fuente: ZHAO, Xuebing, et al. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015, Vol 44, p. 184.

Por otra parte, el atrapamiento consiste en la captura de la enzima dentro de una red polimérica o micro-cápsulas de polímeros, permitiendo que los productos y los sustratos pasen a través de la red. En este caso, las enzimas no quedan unidas a la red polimérica y, la difusión se ve muy limitada [8]. Ésta técnica ha demostrado ser muy sencilla, sin embargo, estudios muestran que a pesar de ello los costos de proceso son altos. Una de las grandes ventajas de ésta técnica es que ofrece una mayor estabilidad frente a las demás técnicas de inmovilización y buena retención de la actividad catalítica [7]. Las condiciones de proceso son moderadas y puede ser aplicable a un diverso rango de lipasas. La desventaja de esta técnica de inmovilización es la restricción de la transferencia de masa, pues la enzima queda muy aislada, ocasionando el difícil acceso del sustrato al sitio activo de la misma [9].

La unión covalente es un proceso que implica reacción química, haciendo que las uniones de la enzima con el soporte sean fuertes, permitiendo que la enzima adquiera gran estabilidad. Sin embargo, al momento de realizar la inmovilización, la enzima puede perder toda su actividad catalítica debido al uso de agentes tóxicos que hacen parte del proceso, además es una técnica altamente costosa comparada con las demás mencionadas.

Además de las técnicas de inmovilización, las lipasas representan una gran influencia en la efectividad de los procesos, es por esto que se debe seleccionar un sistema enzima-soporte apropiado. En la Tabla 1 se resumen algunos estudios representativos de las lipasas disponibles en el laboratorio de Bioprocesos y Flujos Reactivos de la Universidad Nacional sede Medellín.

**Tabla 1.** Tipos de enzimas utilizadas en procesos de transesterificación y esterificación.

| Lipasa                                 | Soporte                                   | Técnica   | % inmovilización | Proceso enzimático  | Conversión % | Ciclos |
|--|---|-----------|------------------|---------------------|--------------|--------|
| De <i>Cándida rugosa</i> [10]          | Sílice modificada con grupos Octil        | Adsorción | 75.00            | Esterificación      | 95.00        | 7      |
| De <i>Cándida antártica</i> [11]       | Perlas de Estireno-Divinilbenceno         | Adsorción | 80.00            | Transesterificación | 93.40        | 8      |
| De <i>Thermomyces lanuginosus</i> [12] | Estireno-Divinilbenceno-Poliglutaraldeido | Covalente | 76.00            | Transesterificación | 97.00        | 10     |
| De <i>Porcina pancreática</i> [13]     | Poli-Hidroxibutirato                      | Adsorción | 100.00           | Esterificación      | 93.00        | 6      |
| De <i>Rhizopus oryzae</i> [14]         | Carbonato de Calcio                       | Adsorción | 93.73            | Esterificación      | 73.00        | 6      |

De acuerdo a los estudios reportados en la Tabla 1, se puede concluir que la adsorción, según la literatura, es una de las técnicas más utilizadas por la simplicidad en su procedimiento experimental y porque evita el uso de agentes tóxicos que en cierta forma pueden afectar el sitio activo de la enzima. Un estudio relevante en donde se aplicó esta técnica fue la "*Immobilization of Candida rugosa lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia*", se obtuvieron conversiones hasta de 95%, porcentajes de inmovilización mayores al 70% y capacidad de ser reutilizado hasta 7 veces [10].

En la presente investigación se propone utilizar la catálisis enzimática con inmovilización por la técnica de atrapamiento, para aplicarlo a un proceso de esterificación y de hidrólisis. Esta técnica no requiere de agentes tóxicos y ha reportado ser de bajo costo. De acuerdo a la literatura este sistema de inmovilización presenta altas limitaciones difusionales para la transferencia de masa, pero permite evaluar los diferentes aspectos a tener en cuenta en cualquier tipo de sistema de inmovilización tales como actividad retenida, proteína retenida y actividad recuperada propuestos por Lima y colaboradores.

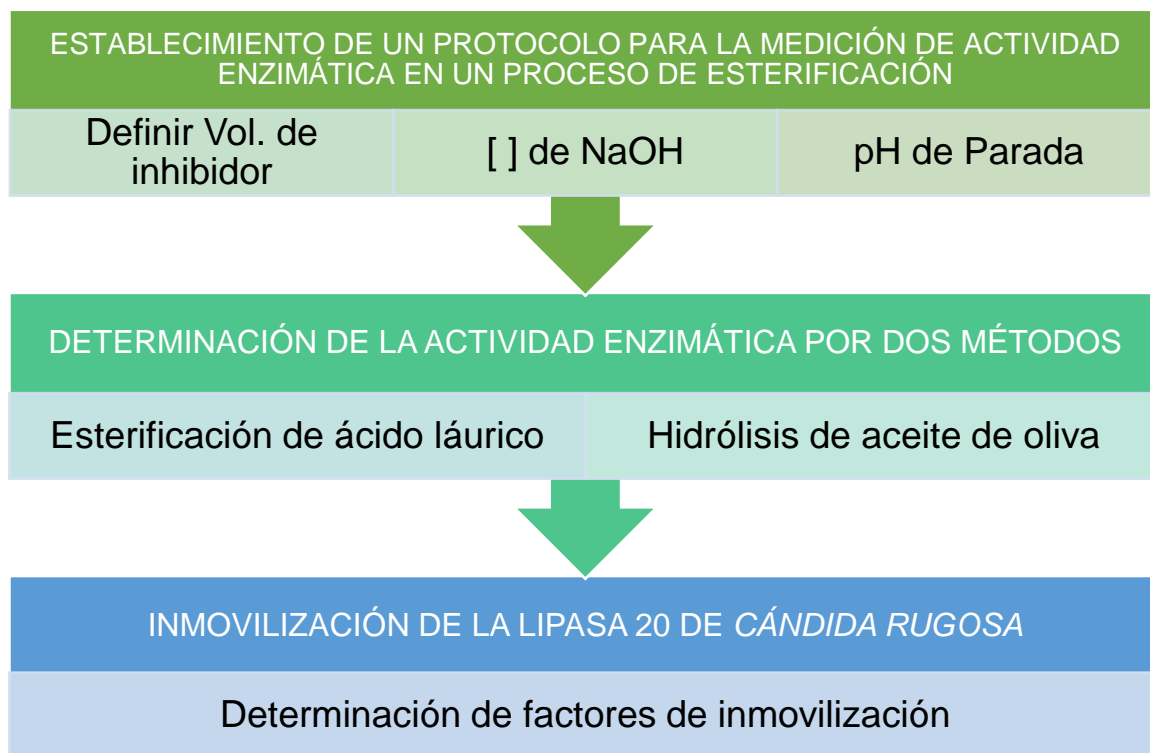
El objetivo principal de esta investigación fue evaluar el desempeño de un biocatalizador inmovilizado en un proceso de hidrólisis de aceite vegetal (oliva). Para esto se midió la actividad catalítica de la enzima por dos métodos, esterificación e hidrólisis de aceite vegetal. El primero se estandarizó pues no existía un protocolo definido y en el segundo se aplicaron los lineamientos del método clásico de emulsión de aceite de oliva de acuerdo con la metodología propuesta en la literatura. Finalmente, se inmovilizó la lipasa con el fin de determinar los factores que permitirán evaluar el catalizador y definir una alternativa en los procesos de esterificación.

## 1. METODOLOGÍA

La enzima que se utilizó es la lipasa 20 *Candida rugosa*. Esta es una lipasa no específica, lo que significa que puede hidrolizar enlaces ésteres en cualquier posición molecular. La lipasa 20 es un producto recomendado para la modificación de lípidos y se suministra como un polvo de color blanco tostado que es fácilmente miscible en agua. La mayor actividad relativa la presenta a pH 7.0 [15].

Los materiales, insumos y equipos se evidencian en el ANEXO A.

**Figura 2.** Diagrama metodológico para el desarrollo del presente trabajo de investigación



## 1.1 FASE 1: ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN UN PROCESO DE ESTERIFICACIÓN.

1.1.1 Condiciones Generales: Se estableció un protocolo donde se definieron las condiciones generales, específicas y el procedimiento para llevar a cabo un método experimental, en este caso la medición de actividad catalítica de una lipasa sobre ácidos grasos libres.

La actividad enzimática se determinó midiendo la cantidad de sustrato que desaparece o la cantidad de producto formado por unidad de tiempo. Es por tanto una medida de la velocidad de reacción, útil en el estudio de la cinética enzimática [16]. La actividad enzimática de las lipasas mediante esta reacción fue dada en Unidades de propil laureato (PLU/g). Una unidad de propil laureato (PLU) se define como la cantidad de enzima necesaria para consumir  $1\mu\text{mol}$  de ácido láurico después de 15 minutos a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  a presión atmosférica y a 150 rpm [17,18].

El método para la determinación de la actividad enzimática de la lipasa se basó en la cuantificación de la cantidad de ácido que no fue consumido por la reacción. El ácido remanente se determinó por la titulación con NaOH. Las moles de ácido consumido se calcularon de los valores obtenidos del control (sin adicionar enzima). La producción de laurato de isopropilo se expresó como equivalentes de la conversión de ácido [18-20]. Como esta reacción se realizó en un sistema libre de solvente, uno de los sustratos se usó en exceso con respecto al otro con el objetivo de actuar como solvente. Para este caso, el alcohol estuvo en exceso en una relación molar de 3:1 con respecto al ácido láurico (AL) [20]. La reacción enzimática de esterificación se detuvo con la adición de etanol-acetona (50:50, v/v), que actuó como inhibidor de la enzima [19,20].

1.1.2 Condiciones Específicas: Las especificaciones que se planearon definir son la concentración de hidróxido de sodio que se utiliza en la titulación, la condición de parada de pH y la cantidad de inhibidor que se debe utilizar.

Cada una de estas variables tiene un rango de trabajo. La literatura reporta que la concentración de NaOH varía en 0.4 M y 0.1 [20]. La condición de pH es posible definirla por la coloración específica en el sistema con fenolftaleína y la cantidad de inhibidor varía de 5 a 10 mL de etanol-acetona [21]. Es por esto, que se planteó evaluar las dos concentraciones de NaOH de referencia (0.1 y 0.4 M) con volúmenes de inhibidor de 3, 4, 5, 7 y 10 mL usando en todos los sistemas fenolftaleína como indicador de color al 1% w/v, de tal forma que se pudo observar de forma cualitativa el momento exacto de la coloración y establecer ese valor de pH como la condición de parada. Cada uno de estos ensayos se realizó con adición de un blanco (sin enzima) y cada prueba por triplicado con enzima de 5 %p/p (enzima/sustrato) [20]. Se compararon los resultados obtenidos de la medición de actividad con valores presentes en la literatura y se evaluó que la desviación estándar no tuviera un valor cercano al promedio de actividad con el fin de afirmar la coherencia de los valores obtenidos.

## 1.2 FASE 2: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR DOS MÉTODOS: ESTERIFICACIÓN E HIDRÓLISIS DE ACEITE VEGETAL (OLIVA)

Para la medición de actividad por esterificación, se aplicó el método definido en la ...Fase 1... y para la medición por hidrólisis se utilizó el método clásico de emulsión de aceite de oliva.

En la aplicación del método de emulsión de aceite de oliva, se preparó un agente emulsificante y un buffer fosfato de pH 7. Para el agente emulsificante se adicionó cloruro de sodio, potasio di-hidrogeno fosfato, glicerol, goma arábica y se aforó con

agua destilada hasta un volumen de 1 L. En cuanto al buffer fosfato de pH 7, de diluyó di-potasio hidrógeno fosfato con potasio di-hidrogeno fosfato, la solución resultante se afora hasta un litro con agua des-ionizada.

Posteriormente, se adicionó aceite de oliva y el agente emulsificante preparado previamente; de la solución resultante de la mezcla, se apartó 5 mL, adicionando a su vez buffer fosfato pH 7 y solución de lipasa (5 mg/ml). El volumen de reacción fue de 10 mL. La reacción se llevó a baño termostático durante 30 minutos a 200 rpm y 40 °C [22], se detuvo la reacción adicionando 10 ml de solución de acetona-etanol 1:1 [21]. Finalmente, se realizó la titulación para poder realizar la cuantificación de la actividad catalítica de las enzimas en forma libre y el cálculo la actividad enzimática. La titulación para el método de hidrólisis fue con hidróxido de sodio 0.05 M. Ver ANEXO B para el método de hidrólisis.

### 1.3 FASE 3: INMOVILIZACIÓN DE LA LIPASA

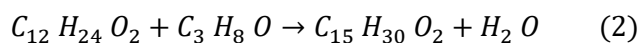
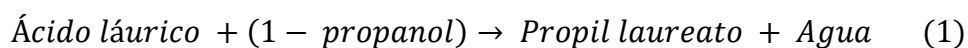
Se realizó la inmovilización de la lipasa 20 de *Candida rugosa*, por la técnica de atrapamiento. Para la inmovilización se utilizó el protocolo establecido en la literatura con alginato de sodio que se describe en el ANEXO C. Seguidamente, se realizó el cálculo de la actividad catalítica de la lipasa inmovilizada por el protocolo clásico de emulsión de aceite de oliva. Finalmente, se midieron los factores tales como porcentaje de actividad retenida, porcentaje de actividad recuperada y el porcentaje de proteína retenida, éste último calculado por el método de Bradford y todo con base a lo propuesto por Lima y colaboradores en el artículo "*Immobilization of Pseudomonas fluorescens lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems*" comparando los resultados con la literatura.

El método de Bradford se describe en el ANEXO D.

## 2. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 2.1 ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN UN PROCESO DE ESTERIFICACIÓN

2.1.1 Descripción de la reacción: El laurato de isopropilo es un éster formado a partir del ácido láurico y el propanol mediante una reacción de esterificación que se describe en la Ecuación (1) y (2).



2.1.2 Preparación de reactivos: La medición de cada una de las pruebas se realizó por triplicado con adición de un blanco (sin enzima) y cada volumen de reacción contiene 10 mL de mezcla de reactivos (ácido láurico y 1-propanol) es por esto que se aseguran 40 mL de solución reactiva con un 7% de incertidumbre.

Por lo tanto, se mezclaron 20.41 gramos de ácido láurico y 23.25 mililitros de 1-propanol con agitador magnético y se almacenaron en frascos tapa azul para adecuar los sistemas a las condiciones de reacción. Esta adecuación se realizó en el baño termostático Julabo SW22 durante 10 minutos. Al cumplirse el tiempo de adecuación se agregó la cantidad de enzima definida como el 5% enzima/sustrato, este porcentaje corresponde a 0.375 gramos de lipasa.

### 2.1.3 Condiciones sistema de reacción

**Tabla 2.** Condiciones de operación de la reacción de esterificación

|                               |                   |
|-------------------------------|-------------------|
| Tiempo de reacción [min]      | 15                |
| Temperatura [°C]              | 50                |
| Velocidad de agitación [rpm]  | 150               |
| Relación molar ácido: alcohol | 1:3               |
| Cantidad de enzima (% p/p)    | 5 enzima/sustrato |

2.1.4 Pruebas experimentales: Se evaluaron 5 volúmenes de inhibidor (3, 4, 5,7 y 10 mL) de acetona-etanol 50% V/V, para los diferentes sistemas de reacción con una concentración de titulación de 0.4 y 0.1 M de hidróxido de sodio utilizando como indicador fenolftaleína al 1%.

Se midió la actividad catalítica ( $A_e$ ) como valor comparable del método aplicando la Ecuación 3. Esta fórmula es consistente debido a que se calcularon las moles de ácido láurico (AL) consumidas en la reacción, lo que significa, la diferencia entre las moles iniciales y finales de AL, multiplicadas por el factor  $10^6$  para convertir los moles a micro-moles como lo indica la definición. En el denominador se tiene el tiempo y los gramos de enzima para que la unidad sea  $[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{g}}]$ .

$$A_e = \frac{(N_{ALi} - N_{ALf}) * 10^6}{\theta * m} \quad (3)$$

Donde:

$A_e$  = Es la actividad enzimática de la enzima

$N_{ALi}$  = Moles iniciales de AL, corresponde al obtenido con el blanco

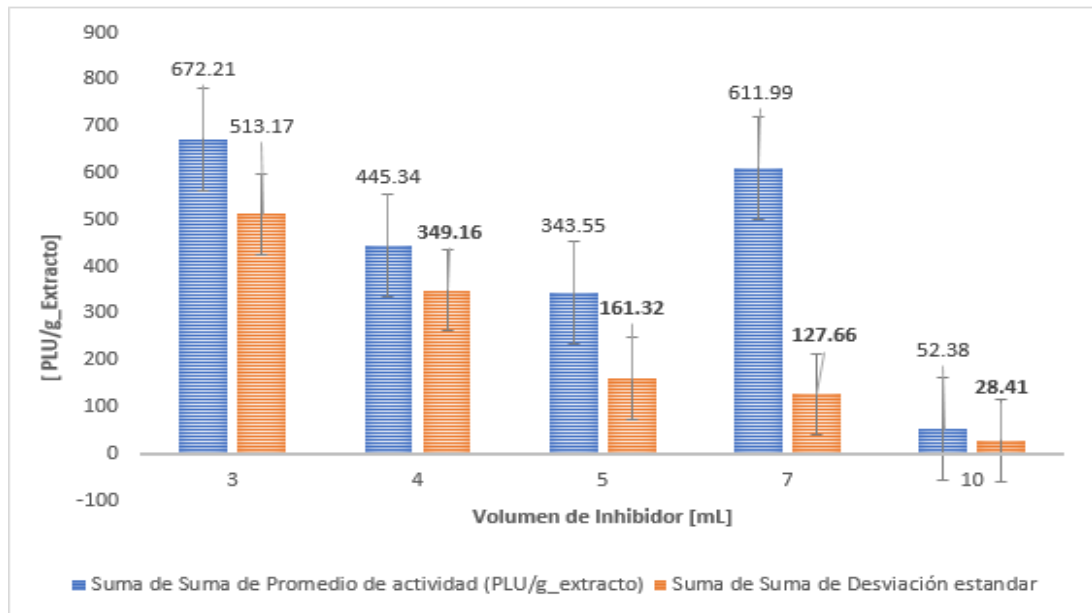
$N_{ALf}$  = Moles finales de AL, corresponde al obtenido después de la rxn

$\theta$  = tiempo de reacción en minutos

$m$  = Cantidad en masa de enzima agregada a una reacción en gramos

Las moles finales de AL son calculados por titulación También se calculó el coeficiente de variación de los datos, definido como el cociente de la desviación estándar y la media expresado en porcentaje [23].

**Figura 3.** Comparación entre el valor promedio de actividad enzimática y su desviación estándar utilizando diferentes volúmenes de inhibidor con una concentración de NaOH de 0.4 M.



**Tabla 3.** Coeficientes de variación para cada una de las pruebas por triplicado con una concentración de NaOH de 0.4 M

| Volumen inhibidor (mL) | Coefficiente de variación (%) |
|------------------------|-------------------------------|
| 3.0                    | 76.34                         |
| 4.0                    | 78.40                         |
| 5.0                    | 46.96                         |
| 7.0                    | 20.88                         |
| 10.0                   | 54.23                         |

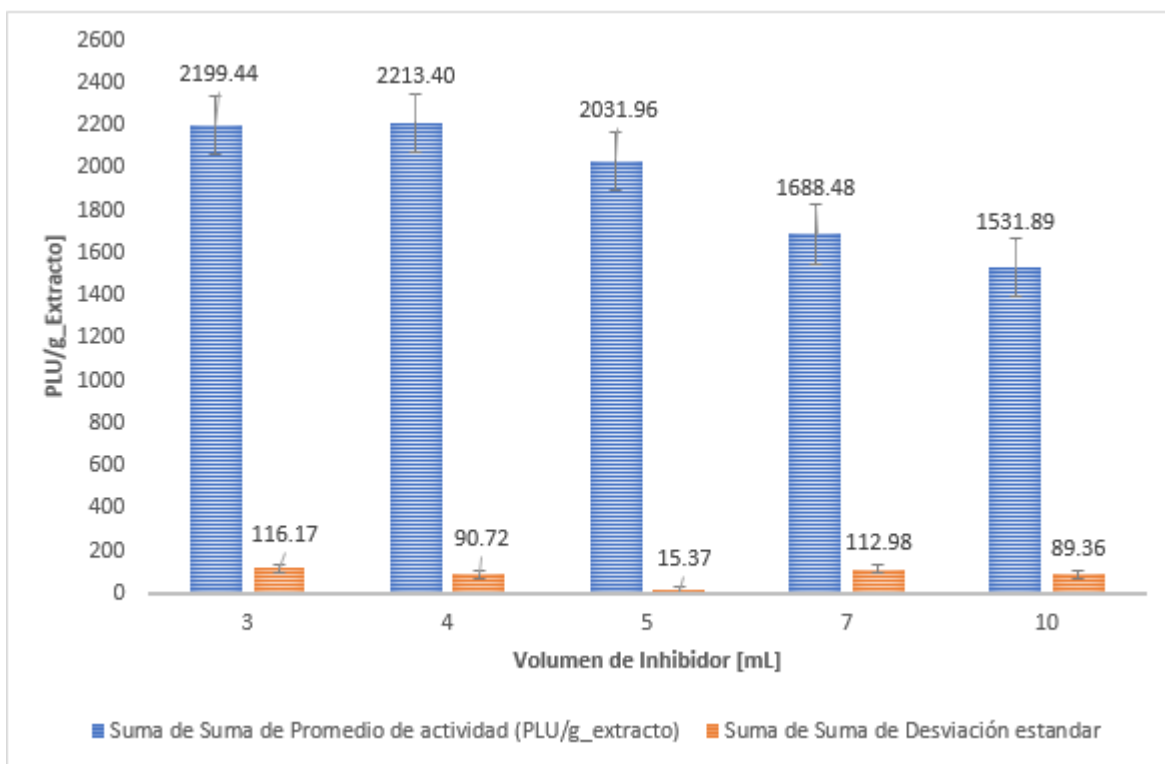
Las unidades obtenidas del protocolo evaluado son unidades de propil laureato o PLU/g y las encontradas en literatura, para la misma lipasa proveniente de *Candida rugosa*, son unidades de actividad enzimática o U/g, sin embargo, los valores PLU/g y U/g son comparables porque la unidad PLU/g solo se deriva del hecho de que el sistema de reacción aplicado sea producción de laurato de propilo, en contraposición a U/g, que designa un término general sin especificar el sistema de reacción aplicado.

Como se puede observar en la Figura 4, los valores de medición de actividad enzimática no fueron confiables ni consistentes, debido a que las desviaciones estándar sobrepasan el 50% de la cantidad medida. Esto significa que no existe diferencia significativa entre la medición y la incertidumbre, por lo que los datos pueden ser imprecisos e inexactos.

Este error en la medición puede haberse causado por la alta concentración de hidróxido de sodio (NaOH) utilizada en la titulación, ya que solo una gota representa un cambio considerable en la medición indirecta de ácidos grasos libres presentes en el medio, lo que significa que el cambio es muy sensible a la titulación. Por lo tanto, aún sin comparar el valor obtenido del promedio de actividad catalítica con el reportado en literatura, se puede descartar el uso de hidróxido de sodio a 0.4 M pues resulta elevado para este tipo de sistema.

En la Figura 5 se puede observar que los valores de desviación estándar son menores en comparación con los calculados en el sistema anterior. Esto significa que el coeficiente de variación es de 0.75% para la menor desviación (5 mL de inhibidor) y 6.7 % para la mayor (7 mL de inhibidor), mientras que en el sistema anterior el menor coeficiente de variación se registra hasta en un 20% como lo refleja las Tablas 3 y 4.

**Figura 4.** Comparación entre el valor promedio de actividad enzimática y su desviación estándar utilizando diferentes volúmenes de inhibidor con una concentración de NaOH de 0.1 M



**Tabla 4.** Coeficientes de variación para cada una de las pruebas por triplicado con una concentración de NaOH de 0.1 M

| Volumen inhibidor (mL) | Coefficiente de variación (%) |
|------------------------|-------------------------------|
| 3.0                    | 5.28                          |
| 4.0                    | 4.10                          |
| 5.0                    | 0.75                          |
| 7.0                    | 6.67                          |
| 10.0                   | 5.83                          |

Por lo tanto, una concentración de 0.1 M de NaOH como solución tituladora, favorece la medición y hace que los resultados sean precisos puesto que todos

varían entre 1500 a 2600 PLU/g, es decir no se alejan entre sí en cantidades considerables. Sin embargo, la exactitud de los datos se ve reflejada solamente en la medición donde se usó 5, 7 y 10 mL de inhibidor ya que los valores de actividad enzimática para la lipasa proveniente de *Cándida rugosa* reportados en literatura, varían entre 1100-2100 U/g, y los valores obtenidos con esos volúmenes de acetona-etanol oscilan dentro de ese rango.

Es por esto, que se debe elegir un volumen de inhibidor entre 5, 7 y 10 mL. Esta elección será efectiva con la desviación estándar, como se puede observar en la figura 5 la menor desviación de los datos se evidencia en la prueba donde se usó 5 mL de inhibidor, esta fue de 15.37 PLU/g y representa menos del 1% de incertidumbre (0.75%).

El efecto de la solución de hidróxido de sodio podría generar pérdida de actividad de la enzima porque desestabiliza el medio circundante de la misma, sin embargo, el uso de esta solución alcalina está destinado para la neutralización de ácido que no fue consumido en la reacción y así poder calcular la actividad enzimática. Si el interés fuera la producción del éster a mayor escala, el efecto del pH afectaría la reutilización del catalizador.

2.1.5 Prueba cualitativa con fenolftaleína: La fenolftaleína es una especie química que permite, a través del cambio de coloración, la medición de pH. El cambio de color se debe a la protonación o desprotonación de la especie y para el caso de la fenolftaleína ese cambio de color está dado en el rango de pH de 8.2 a 12 [24]. Se analizaron todas las titulaciones realizadas en las pruebas experimentales y se observó un cambio de color violeta claro a un valor de pH de 9.57. El desarrollo del protocolo completo de medición de actividad por esterificación se encuentra en el ANEXO E.

## 2.2 MEDICIÓN DE ACTIVIDAD

2.2.1 Esterificación: Aplicando el protocolo definido en el ANEXO E se realizó la medición de actividad enzimática por esterificación de la lipasa 20 de *Candida rugosa*. A continuación, se presenta la Tabla 5 con los valores de actividad obtenidos con un sistema por triplicado, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

**Tabla 5.** Valores de actividad enzimática por el método de esterificación

| Actividad PLU/g | Promedio PLU/g | Desviación estándar | Coef. Variación |
|-----------------|----------------|---------------------|-----------------|
| 1193.07         | 1120.16        | 69.83               | 5.99 %          |
| 1113.54         |                |                     |                 |
| 1053.88         |                |                     |                 |

2.2.2 Hidrólisis de aceite de Oliva: Se aplicó el protocolo de medición de actividad por el método de emulsión de aceite de oliva. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Valores de actividad enzimática medidos por el método de emulsión de aceite de oliva (hidrólisis)

| Actividad U/g | Promedio U/g | Desviación estándar | Coef. Variación |
|---------------|--------------|---------------------|-----------------|
| 1293.33       | 1345.56      | 46.71               | 3.47 %          |
| 1383.33       |              |                     |                 |
| 1360.00       |              |                     |                 |

Los valores de actividad obtenidos son consistentes con la literatura ya que los rangos reportados son 1100-2100 U/g.

La desviación estándar del método de esterificación es 69.83 PLU/g correspondiente al 5.99% del valor medio de actividad informado, y la desviación estándar del método de hidrólisis es 46.71 U/g que corresponde a 3.47% del valor medio de actividad informado.

Por lo tanto, el método de hidrólisis es menos variable que el método de esterificación. Esta afirmación es lógica puesto que el método de hidrólisis de aceite de oliva tiene mayor trayectoria investigativa y es utilizado por muchos autores en comparación con el de esterificación, sin embargo, ambas mediciones pueden ser consideradas como exactas y precisas.

### 2.3 INMOVILIZACIÓN DE LA LIPASA 20 DE CANDIDA RUGOSA

Las ecuaciones propuestas para la evaluación del biocatalizador son las propuestas por Lima y colaboradores en su artículo *Immobilization of Pseudomonas fluorescens lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems*.

2.3.1 Factores de la inmovilización: Uno de los parámetros que se midió para evaluar la inmovilización de la enzima fue la retención de actividad hidrolítica del sobrenadante en la suspensión de inmovilización. Esta se calculó como lo define la Ecuación 4.

$$YI = \left( \frac{A_{im}}{A_{Libre}} \right) * 100 \quad (4)$$

Donde:

$A_{im}$ : Es la actividad de la enzima en forma inmovilizada.

$A_{Libre}$ : Es la actividad de la enzima en forma libre.

Otro parámetro evaluado fue el porcentaje de actividad recuperada, calculado como lo indica la Ecuación 5.

$$AR(\%) = \frac{U_{EI}}{U_I * YI} * 100 \quad (5)$$

Siendo:

$U_{EI}$ : Actividad aparente de enzima inmovilizada (IU/g\_soporte)

$U_I$ : Actividad suministrada para la inmovilización

$$U_I = \frac{U_{ES} * V_{ES}}{M_s} \quad (6)$$

La actividad suministrada para la inmovilización se define en la Ecuación 6, donde:

$U_{ES}$ : Actividad de la enzima soluble (IU/ml)

$V_{ES}$ : Volumen de la solución enzimática usada (ml)

$M_s$ : Masa de soporte usado en la inmovilización

Finalmente, el último parámetro calculado fue la retención de proteína retenida, definida en la Ecuación 7 como:

$$\text{Proteína retenida } \% = \left( \frac{C_i V_i - C_f V_f}{C_i V_i} \right) * 100 \quad (7)$$

Donde:

$C_i$ : Concentración de la proteína inicial (enzima en forma libre).

$V_i$ : Volumen de la solución de enzima inicial.

$C_f$ : Concentración de la proteína final (enzima en forma inmovilizada).

$V_f$ : Volumen de la solución de enzima final.

2.3.2 Resultados factores de la inmovilización: Se aplicó el protocolo de inmovilización en alginato de calcio por la técnica de atrapamiento y calcularon los factores de inmovilización.

Además de los factores se midió la actividad del inmovilizado, con el fin de compararlo con el valor de actividad de enzima libre. La actividad del inmovilizado se midió con base en el método de emulsión de aceite de oliva debido a que tuvo menor variabilidad de datos. El resultado obtenido de la medición de actividad del inmovilizado se encuentra en la tabla 7.

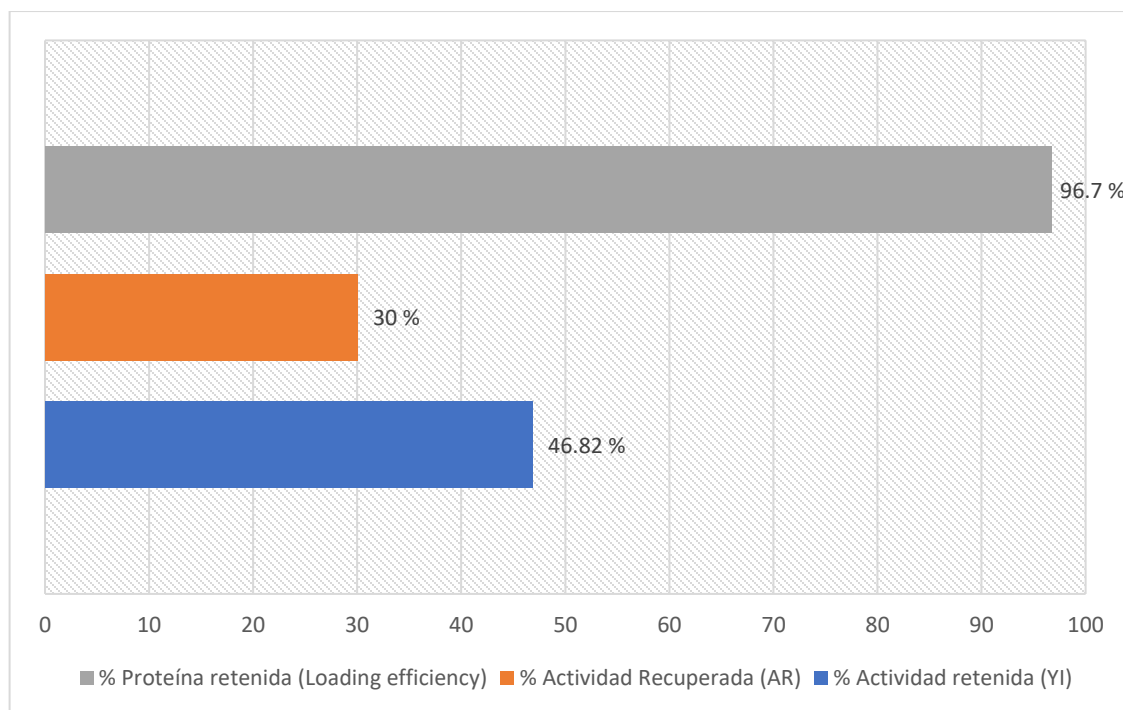
**Tabla 7.** Actividad catalítica de la enzima inmovilizada vs enzima libre en U/g-enzima

| <b>Actividad inmovilizada<br/>U/g_soporte</b> | <b>Actividad inmovilizada<br/>U/g_enzima</b> | <b>Actividad libre<br/>U/g_enzima</b> |
|---|--|---------------------------------------|
| 1.47  | 630.11                                       | 1345.55                               |

Autores como Liese y Hilterhaus en su artículo “*Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications*” afirman que la inmovilización puede prevenir interacciones intermoleculares, por ejemplo, promover la partición de algunos compuestos nocivos, burbujas de gas u otras moléculas proteicas. Sin embargo, no se puede generalizar que la inmovilización enzimática asegurará un biocatalizador estable, es decir, no existe un enfoque universal para inmovilizar una enzima dada y lograr mantener su máxima actividad y estabilidad [25].

Los factores de la inmovilización se presentan en la Figura 5.

**Figura 5.** Factores de inmovilización, calculados para la lipasa 20 de *Cándida rugosa* inmovilizada en perlas de alginato de calcio



Aunque no existen premisas generales con la inmovilización, este trabajo mostró buenos resultados, en la Tabla 8 se observan los factores de inmovilización obtenidos en comparación con un trabajo en el 2013 que también utilizó perlas de alginato como soporte.

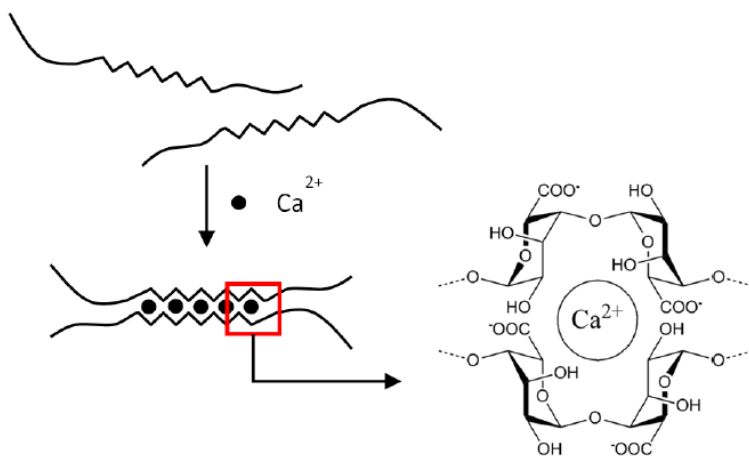
**Tabla 8.** Comparación entre los factores de inmovilización obtenidos en este trabajo y los reportados en literatura con un sistema de alginato de sodio

|                                    | Literatura | En este trabajo |
|------------------------------------|------------|-----------------|
| Actividad específica<br>U/g_enzima | 303.34     | 603.11          |
| Actividad recuperada<br>(RA) %     | 30.22      | 30              |
| Proteína retenida %                | 87         | 96.73           |

En este caso, el valor de actividad recuperada está de acuerdo con la literatura, 30% en este trabajo y 30.22% para Bashari y colaboradores. La actividad específica resulto ser aproximadamente el doble que la reportada y el porcentaje de proteína retenida fue mayor en un 11%, este valor de actividad es significativo puesto que, a la hora de aplicar el catalizador en un sistema reactivo a mayor escala, las conversiones del producto deseado serían mayores. Sin embargo, los valores de actividad del inmovilizado comparados con los de la enzima libre están muy por debajo, 603.11 U/g para el inmovilizado y 1345.55 U/g con la enzima libre, como lo refleja la Tabla 7. Dos efectos principales son los que se destacan cuando se trata de alterar la actividad catalítica: Las propiedades fisicoquímicas del soporte y las limitaciones de transferencia de masa.

La gelificación del alginato de sodio se produce por un intercambio de iones de sodio de los bloques de ácido gulurónico (G) con cationes multivalentes (generalmente calcio), y un apilamiento de estos bloques G, para formar una estructura característica "egg-box". Cada cadena puede estar vinculada con muchas otras cadenas, dando como resultado la formación de una red de gel tridimensional.

**Figura 6.** Formación de geles de alginato, "Egg Box"



Fuente: PAQUES, Jerome et al. Preparation methods of alginate nanoparticles.

En: Advances in Colloid and Interface Science. 2014, Vol 209, p. 163-171.

Por lo tanto, un mayor contenido de ácido gulurónico proporciona geles más rígidos y fuertes. Ésta es la razón por la que se justifica la pérdida de actividad, porque la cantidad de ácido gulurónico no fue una variable que se controló y es posible que se hayan formado geles rígidos que generaban altas limitaciones de transferencia de masa.

### 3. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el desarrollo del protocolo para la medición de actividad enzimática mediante la esterificación de ácido láurico con propanol, se concluye que se debe detener la reacción con 5 mL de inhibidor acetona-etanol 50% V/V y realizar la titulación automática con hidróxido de sodio 0.1 M con una condición de parada de 9.57 de pH.

En la medición de actividad por dos métodos: esterificación e hidrólisis, se concluye que el método de hidrólisis de aceite de oliva resulto ser menos variable en comparación con el método de esterificación de ácido láurico con propanol. Esto se ve reflejado en los coeficientes de variación de cada procedimiento 5,9 % vs 3,5 % respectivamente. Sin embargo, ambos métodos pueden considerarse exactos y precisos

A partir de los resultados de la inmovilización de la lipasa, se concluye que los factores medibles fueron coherentes con la literatura. Al compararlos se afirma que la actividad recuperada fue menor en un 0.73%, mientras que la proteína retenida fue mayor en un 11%. La diferencia se refleja en la actividad específica, debido a que la obtenida con la enzima inmovilizada fue menor en un 47% (630.22 U/g para la inmovilizada y 1345 U/g para la libre). Esta pérdida de actividad catalítica es debida a las limitaciones de transferencia de masa que ocasiona el soporte en el camino del sustrato al sitio activo de la enzima.

#### 4. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar la evaluación de la inmovilización con la lipasa 20 de *Cándida rugosa* por la técnica de adsorción utilizando como soporte sílice modificada con grupos octil, como lo recomienda Lima y colaboradores en su artículo "*Immobilization of Pseudomonas fluorescens lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems*", debido a que la adsorción según la literatura es una técnica muy utilizada, por la simplicidad en su procedimiento experimental y porque evita el uso de agentes tóxicos que en cierta forma pueden afectar el sitio activo de la enzima, además el cambio de soporte radica en que las sílices se consideran materiales porosos y por lo tanto permiten aumentar el área de la inmovilización de enzimas, disminuyendo la pérdida de actividad catalítica.

Para el mejoramiento del trabajo presente, se recomienda considerar con mayor rigor el estudio de la transferencia de masa que ocurre desde la superficie del soporte hacia el sitio activo de la lipasa, debido a que la cantidad de los componentes químicos que conforman el alginato de sodio pueden afectar considerablemente el rendimiento catalítico de la enzima.

Debido a que, la naturaleza física del portador y su morfología, influye en la estabilidad mecánica del biocatalizador final, se recomienda para estudios posteriores el uso de los nano-portadores, ya que, en este tipo de portadores, la enzima se une a una superficie accesible y abierta, llegando con mayor facilidad al sitio activo, mientras que en los portadores porosos la mayor cantidad de enzima se encuentra en la superficie interna del portador.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] HOWLAND, John. Catálisis. En: Salem Press Encyclopedia Of Science [En línea] (enero del 2016). Disponible en Research Starters <<https://goo.gl/on5gr0>> [Citado el 22 de diciembre del 2016]

[2] NARWAL, Sunil & GUPTA, Reena. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. *Biotechnology Letters*. 2013, Vol 35, nro.4, p. 479-490. ISSN 01415492

[3] CHOI, Jung; HAN, San & KIM, Hak. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*. 2015, Vol 33, nro.7, p. 1443-1454. DOI 10.1016/j.biotechadv.2015.02.014

[4] MARSH, Sheila. Enzymes- a fun introduction [En línea]. Disponible en <<https://goo.gl/7H8hRE>> [Citado el 26 de diciembre del 2016]

[5] DOMÍNGUEZ DE MARIA, P, et al. Unexpected reaction profile observed in the synthesis of propyl laurate when using *Candida rugosa* lipases immobilized in microemulsions based organogels. *Biotechnology Letters*. 2004, Vol 26, nro.19, p. 1517-1520. ISSN 01415492

[6] HWANG, Hyun Tae, et al. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Protein engineering and lipase production. *Biotechnology and Bioengineering*. 2014, Vol 111, nro. 4, p. 639-653. ISSN 00063592

[7] GULDHE, Abhishek, et al. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015, Vol 41, p. 1447-1464. DOI 10.1016/j.rser.2014.09.035

[8] ZHAO, Xuebing, et al. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015, Vol 44, p. 182-197. DOI 10.1016/j.rser.2014.12.021

[9] TAN, Tianwei, et al. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*. 2010, Vol 28, nro.5, p. 628-634. ISSN 07349750

[10] ŽIVKOVIĆ, Izrael, et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia. *Biochemical Engineering Journal*. 2015, Vol 93, p.73-83. ISSN 1873295X

[11] POPPE, Jakeline, et al. Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2013, Vol 94, p. 51-56. DOI 10.1016/j.molcatb.2013.05.010

[12] DIZGE, Nadir, et al. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Bioresource Technology*. 2009, Vol 100, nro.6, p. 1983-1991. ISSN 09608524

[13] SILVA, Natália, et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. *Biochemical Engineering Journal*. 2014, Vol 82, p. 1139-1149. ISSN 1873295X

[14] GHAMGUI, Hanen; KARRA-CHAÂBOUNI, Maha & GARGOURI, Youssef. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: A comparative study between n-hexane and solvent-free system. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004, Vol 35, nro.4, p. 355-363. ISSN 01410229

[15] MERQUIAND. Información acerca de las características de la lipasa 20 de *Cándida rugosa* [correo electrónico]. Mensaje enviado a: John Henry Castro Posada. Junio del 2015. [Citado el 26 de diciembre del 2016] Comunicación personal.

[16] GRAJALES, Ofelia. Apuntes de bioquímica vegetal. Universidad Autónoma de Mexico. [en línea] 2005. Disponible en < <https://goo.gl/uDODWq>>. [Citado el 4 de enero del 2017]

[17] LERIN, L, et al. Successive cycles of utilization of novozym 435 in three different reaction systems. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2011, Vol 28, nro.2, p. 181-188. ISSN 0104-6632

[18] NEMESTOTHY, Nandor, et al. Biotechnological Utilisation of Fusel Oil for Biolubricant Production. *Food Industrial Processes - Methods and Equipment*. Dr. Benjamin Valdez (Ed.), InTech. 2012. [En línea] Disponible en < <https://goo.gl/0dg3ox>> [citado el 4 de enero del 2017] DOI:10.5772/31301.

[19] NAZ CHAIBAKHSH, Mohd, et al. Optimization of Operational Conditions for Adipate Ester Synthesis in a Stirred Tank Reactor. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* [En línea] 2010. Disponible en < <https://goo.gl/uZQ7yu>>. [Citado el 4 de enero del 2017] DOI 10.1007/s12257-010-0001-7

[20] LEE, Alice, et al. Optimized enzymatic synthesis of levulinate ester in solvent-free system. *Industrial Crops and Products*. 2010, Vol 32, nro.3, p. 246-251. ISSN 09266690

[21] SUN, Jiangna, et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption in organic médium. *New Biotechnology*. 2010, Vol 27, nro.1, p. 53-58. ISSN 18716784

[22] RAMOS, Elisa Z., et al. Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the

catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2015, Vol 118, p. 43-51. ISSN 18733158

[23] BIBLIOTECA DE VENEZUELA. Coeficientes de variación. [En línea] Disponible en <<https://goo.gl/xm1gQJ>> [Citado el 4 de enero del 2017]

[24] SOSA, Gustavo. Indicadores de pH, química analítica [En línea] 2010. Disponible en <<https://goo.gl/cQoc9D>> [Citado el 5 de enero del 2017]

[25] LIESE, Andreas & HILTERHAUS, Lutz. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chemical Society reviews*. 2013, Vol 42, nro.15, p. 6236-49. ISSN 1460-4744

[26] MUSTRANTA, A; FORSSELL, P & POUTANEN, K. Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. *Enzyme and Microbial Technology*. 1993, Vol 15, nro.2, p. 133-139. ISSN 01410229

[27] TIETZ, N W; SINAI, Mouni & FIERECK, A. specific method for serum lipase \* determination. 1996, Vol 7, p. 352-358.

[28] SOARES, Cleide, et al. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied biochemistry and biotechnology*. 1999, Vol 77-79, p. 745-757. ISSN 0273-2289

[29] WALKER, John M. The protein protocols Handbook. Totowa, New Jersey:  
humana press, 2002.15-23. p ISBN 0896039404

## BIBLIOGRAFÍA

BARBOSA, Oveimar, et al Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. *Biotechnology Advances*. 2015, Vol 33, nro.5, p. 435-456. DOI 10.1016/j.biotechadv.2015.03.006

BASHARI, Mohanad, et al. Ultrasound-assisted dextranase entrapment onto Calcium alginate gel beads. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013, Vol 20, nro.4, p. 1008-1016. ISSN 13504177

COCA, Janny, et al. Producción y caracterización de las lipasas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*. *Seccion de biotecnología aplicada: Centro de ingeniería de Bioprocesos*.2001, Vol 18, p.216-220.

DIZGE, Nadir, et al. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Bioresource Technology*. 2009, Vol 100, nro.6, p. 1983-1991. ISSN 09608524

FOGLER, H. Scott. Elements of chemical reaction engineering. Chemical Engineering Science. 3 ed. Prentice-Hall of India. [En línea] 1999 Disponible en <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0009250987801306>> [Citado el 5 de enero del 2017] ISBN 81-203-2234-7

FUENTES, Sergio y DÍAZ, Gabriela. Catalizadores ¿La piedra filosofal del siglo XX? FCE - Fondo de Cultura Económica. [En línea] 2016. Disponible en <<https://goo.gl/mmEgM3>> [Citado el 5 de enero del 2017] ISBN: 607163850X

GHAMGUI, Hanen; KARRA-CHAÂBOUNI, Maha & GARGOURI, Youssef. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: A comparative study between n-hexane and solvent-free system. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004, Vol 35, nro.4, p. 355-363. ISSN 01410229

JESIONOWSKI, Teofil; ZDARTA, Jakub & KRAJEWSKA, Barbara. Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption*. 2014, Vol 20, nro.5-6, p. 801-821. DOI 10.1007/s10450-014-9623-y

LIESE, Andreas & HILTERHAUS, Lutz. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chemical Society reviews*. 2013, Vol 42, nro.15, p. 6236-49. ISSN 1460-4744

LIMA, Lionete N, et al. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2015, Vol 42, nro.4, p. 523-535. ISSN 14765535

PAQUES, Jerome et al. Preparation methods of alginate nanoparticles. En: *Advances in Colloid and Interface Science*. 2014, Vol 209, p. 163-171. ISSN 00018686.

PEREIRA, Ernandes, et al. Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2001, Vol 91-93, p. 739-752. ISSN 0273-2289

POPPE, Jakeline, et al. Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 2013, Vol 94, p. 51-56. DOI 10.1016/j.molcatb.2013.05.010

RAMOS, Elisa Z., et al. Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 2015, Vol 118, p. 43-51. ISSN 18733158

SILVA, Natália, et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. *Biochemical Engineering Journal.* 2014, Vol 82, p. 1139-1149. ISSN 1873295X

SOSA, Gustavo. Indicadores de pH, química analítica [En línea] 2010. Disponible en <https://goo.gl/cQoc9D> [Citado el 5 de enero del 2017]

ZHAO, Xuebing, et al. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 2015, Vol 44, p. 182-197. DOI 10.1016/j.rser.2014.12.021

## ANEXOS

### ANEXO A: MATERIALES INSUMOS Y EQUIPOS

Ácido láurico 98%, 1-propanol 99,5%, hidróxido de sodio 99%, fenolftaleína, acetona 99.5%, etanol 96%, goma arábica, cloruro de sodio 98%, potasio di-hidrogeno fosfato, di-potasio hidrógeno fosfato, glicerol, ácido fosfórico 85%, azul de coomassie G250, estándar de proteína (Albúmina) 1mg/mL, alginato de sodio, cloruro de calcio grado reactivo, aceite de oliva, extracto enzimático liofilizado de *Cándida rugosa*, micro-pipetas de 5 mL, 1000  $\mu$ L y 100  $\mu$ L, balanza analítica, baño termostático Julabo SW22, Titulador automático Metrhom 848 Tritrino Plus, Espectrofotómetro UV visible Thermo Evolutions 60S, celdas de cuarzo, bomba de vacío, plancha de agitación, papel Whatman N°1 y Tubos de ensayo.

### ANEXO B: MÉTODO CLÁSICO DE EMULSIÓN DE ACEITE DE OLIVA

**Preparación de agente emulsificante:** Adicionar 17.9 gramos de NaCl, 0.41 gramos de potasio di-hidrógeno fosfato, 540 ml de glicerol, 10 gramos de goma arábica y aforar con agua destilada hasta un volumen de 1 L [26].

**Preparación del Buffer fosfato pH 7:** Se diluyen 61.5 mL de di-potasio hidrógeno fosfato con 38.5 mL de potasio di-hidrogeno fosfato, la solución resultante se afora hasta un litro con agua des-ionizada de [27].

#### ***Procedimiento***

- Adicionar 50 mL de aceite de Oliva y 50 mL de agente emulsificante
- La solución de reacción se prepara con 5 ml de la emulsión anterior, 4 ml de buffer fosfato 100 mM con pH 7 y 1 ml de lipasa (5 mg/ml) [22,28].

- La reacción se lleva a baño termostático durante 30 minutos a 200 rpm y 40 °C [22].
- Se detiene la reacción adicionando 10 ml de solución de acetona-etanol 1:1 [21].
- Se realiza la titulación con hidróxido de sodio 0.05 M y se procede a calcular la actividad catalítica.

#### ANEXO C: PROTOCOLO INMOVILIZACIÓN DE LA LIPASA 20 DE CÁNDIDA RUGOSA EN ALGINATO DE SODIO

- Disolver 2 gramos de alginato de sodio en 100 mL de agua destilada a 80 °C para preparar una solución al 2% p/v.
- Disolver 1 gramo de la lipasa 20 de *Cándida rugosa* de la casa comercial Genecor en 2 mL de buffer fosfato de pH 7,0.
- Adicionar 100 µL de solución enzimática por cada 2 mL de solución de alginato de sodio a preparar.
- Agitar magnéticamente a temperatura ambiente para asegurar mezcla completa.
- Agregar 10 mL de la solución de alginato/enzima a una jeringa hipodérmica.
- La formación de las perlas de alginato (2-5 mm) se realiza dejando caer gota a gota la solución enzimática a 20 cm de altura sobre 40 mL de una solución 0,3 M de cloruro de calcio. El diámetro de la esfera puede ser controlado mediante la presión ejercida al pistón de la jeringa.
- Dejar la solución por una hora para promover el endurecimiento de las perlas de alginato.
- Separar las perlas obtenidas de la solución de cloruro de calcio por filtración al vacío utilizando el papel filtro de 8-11 µm.
- Lavar dos veces las perlas con 2.5 mL de agua destilada filtrando al vacío continuamente

- Pasar el líquido obtenido de la filtración a una probeta y medir su volumen exacto.
- Dejar secar las perlas de alginato de calcio a temperatura ambiente. Almacenar las perlas en botellas atornilladas en 4 – 8 °C y usarlas antes de una semana.

#### ANEXO D: PROTOCOLO MEDICIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD [29].

**Curva de calibración:** Se trata de una curva de referencia construida con cantidades conocidas de una sustancia, que se utiliza para determinar la cantidad de esta sustancia (proteínas) presente en una muestra incógnita.

**Estándar:** Es una disolución que contiene una concentración conocida de un elemento o sustancia específica, llamada patrón primario que, por su especial estabilidad, se emplea para valorar la concentración de otras soluciones, como las disoluciones valoradas.

**Fundamento:** Consiste en un método seguro y rápido para la estimación de la concentración de proteína, la cual es esencial en muchos campos de estudio. El método de Bradford consiste en la unión del colorante azul de coomassie G250 a los residuos arginil y lisil de las proteínas y es usualmente medido a 595nm.

#### ***Procedimiento***

- Adicionar en el matraz aforado de 50mL el etanol y en el matraz de 100mL adicionar el ácido fosfórico.
- Pesar en beaker 100mg de azul de Coomassie G250 (no confundir con R250).

- En un matraz de 1 L adicionar los 50mL de etanol, los 100 mL de ácido fosfórico y 100 mg de azul de Coomassie (al momento de traspasar el azul jugar con agua destilada para evitar dejar residuos en el recipiente). Aforar a 1L con agua destilada.
- Agitar en la plancha magnética por 5 minutos
- Filtrar en montaje de vacío con papel Whatman N°1 y depositar en frasco oscuro o ámbar (conservar en la nevera luego de su uso), éste es estable por máximo dos semanas, sin embargo, el colorante tiende a sedimentar, así que antes de su uso debe ser filtrado.
- Las celdas de cuarzo o las de vidrio pueden ser usadas para este método y deben estar limpias y libres de detergentes. Las celdas plásticas no deben ser usadas ya que el colorante se une a este material. Las celdas usadas se lavan con etanol.

**Nota:** Este estándar es poco estable y se degrada con facilidad con la luz, por lo tanto, debe ser usado inmediatamente

- Agregar en un beaker 15mg de proteína en 15 ml de agua destilada para preparar una solución de concentración 1mg/mL.
- Medir la absorbancia a 258 nm con celda de cuarzo y debería estar cercana a 0.66 si es albúmina y si es ovoalbúmina debería ser 0.75.
- La curva del estándar no es lineal, y los valores de absorbancia dependen de la edad del reactivo, por consiguiente, es esencial hacer la curva de calibración para cada ensayo.
- Para el blanco, pipetear 100µL de agua destilada más 5 mL de reactivo de Bradford en un tubo de ensayo tapar y agitar en el vortex y dejar reaccionar durante 5 minutos. Luego de la reacción pasar a una celda de cuarzo y leer a 595nm, ajustar a cero.

- Para la calibración se utiliza el estándar de proteína 1mg/mL. Adicionar en un tubo de ensayo de tamaño adecuado, el estándar para diferentes concentraciones entre (0,1  $\mu$ L - 1 $\mu$ L) como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 9: Datos para la curva de calibración de la prueba de Bradford de medición de proteína

| <b>Concentración (mg/mL)</b> | <b>Estándar de proteína (<math>\mu</math>L)</b> | <b>Agua destilada (<math>\mu</math>L)</b> |
|------------------------------|---|---|
| 0,1                          | 100   | 900                                       |
| 0,2                          | 200   | 800                                       |
| 0,4                          | 400   | 600                                       |
| 0,6                          | 600   | 400                                       |
| 0,8                          | 800   | 200                                       |
| 1                            | 1000  | 0   |

- Pipetear 100 $\mu$ L de las concentraciones de la tabla con 5 mL de reactivo de Bradford en un tubo de ensayo, tapar y agitar en el vortex y dejar reaccionar durante 5 minutos.
- Medir con el espectrofotómetro en una celda de cuarzo a 595nm.
- Con la ecuación de la recta generada, hallar la concentración de la proteína (mg/mL) del analito.
- Disponer los residuos en un recipiente marcado. (No desechar en el lavado).

## ANEXO E: PROTOCOLO DE MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR LA ESTERIFICACIÓN DE ÁCIDO LÁURICO

### Preparación de soluciones

- Para la solución de reacción, mezclar 20.41 g de AL y 23.25 ml de 1-propanol en un recipiente tapa azul. Se homogeniza la solución en baño termostático con agitador orbital a 50°C y 150 rpm por 10 min.
- La solución inhibidora de 50% v/v se prepara con 20 mL de cada sustancia en un recipiente tapa azul de 100 ml. Ya que en la inhibición de la reacción solo se utiliza la mitad del contenido, se recomienda almacenar en refrigerador para mantener la concentración constante, debido a que los compuestos son volátiles.
- Se prepara un litro de solución tituladora, 0.1 M de hidróxido de sodio, para ello se agregan 4.04 gramos de NaOH sólido en un recipiente tapa azul de 1000 mL, se agita manualmente con el fin de homogenizar, tener presente que esta solución se calienta levemente.
- Para la solución a 1% de fenolftaleína se agrega 1 mg de fenolftaleína por cada 100 ml de etanol, se adicionan en un frasco tapa azul y se agita. Esta solución puede almacenarse a temperatura ambiente.

### Procedimiento de reacción

- Extraer de la solución de reacción 10 mL y adicionarlos en frascos tapa azul de tamaño adecuado (4 en total, contabilizando la muestra de control).
- Antes de agregar la enzima, verificar las condiciones de trabajo de la misma. Para ello, se calienta la solución a reaccionar en baño termostático hasta alcanzar una temperatura de 50°C.

- Para la reacción de esterificación se agrega enzima al 5 %p/p (enzima/sustrato), excepto el blanco. Se deja en el baño termostático durante 15 minutos y 150 rpm. El tiempo de reacción se contabiliza desde el momento en que se adiciona la enzima.
- Finalizados los 15 minutos, se agrega 4 ml de inhibidor a cada reacción (solución Acetona-etanol al 50% v/v).

### Titulación

- Se agrega el volumen de reacción en un beaker de tamaño tal que el sensor de pH quede sumergido, también se agrega 100  $\mu$ L de solución de fenolftaleína al 1%.
- Calibrar el titulador automático y programar el método MET\_pH de titulación. Esta acción implica modificar en el quipo las condiciones de titulación, así como las condiciones de parada.
- La adición de NaOH 0.1 M se detiene, cuando automáticamente el titulador ha llegado a un pH de 9.65 con 0.1 de incertidumbre, esto se evidencia y confirma con un cambio de color semejante a un violeta pálido.
- La cantidad de NaOH 0.1 M utilizados en la titulación se reportan para los cálculos de la cantidad de ácidos grasos libres que no reaccionaron y de la actividad enzimática.

**NOTA:** La condición de parada de pH a 9,65 +- 0,1 se establece ya que, en la titulación de la muestra de control, se logra la neutralización de todos los ácidos grasos presentes a dicho pH. Matemáticamente se sabe la cantidad de ácidos grasos presentes en la solución antes de reaccionar. Esta consideración se confirmó a ensayo y error en el laboratorio.