

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

## Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología - Microbiología

“Biodegradación de aceites residuales por lipasas termoestables  
de bacterias termófilas”

### TESIS

Presentada por:

Bach. Sergio Enrique Samillán Fernandez

Para optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGO MICROBIÓLOGO**

TACNA - PERÚ

2017

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 287

En la ciudad de Tacna, en el auditorium de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; siendo las 11:30 horas del día 05 de diciembre del 2016, estando presente el jurado calificador nominado por Resolución de Facultad N° 8664-2016-FACI/UNJBG; conformado por los siguiente docente:

DR. DALADIER MIGUEL CASTILLO COTRINA	Presidente
DRA. ISABEL ANCCO OLIVA	Secretario
DR. VICENTE CHAMBILLA QUISPE	Miembro

Acto seguido, se dio lectura a la Resolución correspondiente, y del mismo modo se dio lectura al Artículo 22 del Reglamento de Grados y Título de la Facultad de Ciencias.

A continuación, el Presidente del Jurado instó al Bachiller: SERGIO ENRIQUE SAMILLÁN FERNANDEZ, a exponer la tesis titulada:

“Biodegradación de aceites residuales por lipasas termoestables de bacterias termófilas”.

Siendo las 13:15 hora, el tesista concluye su exposición, luego se procedió a la formulación de las preguntas por parte de los miembros del jurado calificador. Terminando este proceso, se invitó a que los miembros del jurado emitan su calificación de acuerdo a reglamento. El promedio de la calificación dio el siguiente resultado: Aprobado por UNANIMIDAD, con el calificativo de BUENO, de acuerdo al Reglamento de Grado y Títulos de la Facultad de Ciencias.

Siendo las 13:15 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los señores miembros del Jurado Calificador, en señal de conformidad.



DR. DALADIER M. CASTILLO COTRINA  
Presidente



DRA. ISABEL ANCCO OLIVA  
Secretario



DR. VICENTE CHAMBILLA QUISPE  
Miembro

## **DEDICATORIA**

Dedico este proyecto principalmente a Dios por haberme dado la oportunidad de llegar hasta este momento. Por nunca haberme dejado y por permitirme culminar mis estudios con este aporte a mi sociedad.

A mis padres Enrique Samillán G. y María Fernandez J. por su esfuerzo incondicional y por estar conmigo en cada momento y ser mi soporte.

A Dulce María Samillán H. mi pequeño tesoro, mi motor y motivo para ser lo que soy.

A mis hermanas Yessica Samillán F. y Jackelin Samillán F. por estar siempre conmigo y apoyarme en los buenos y malos momentos.

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero agradecer de manera especial al Mrs. Roberto Castellanos Cabrera por haberme permitido ser parte del grupo de investigación de los termófilos, proyecto por el cual pude participar y ganar el financiamiento de la presente tesis, por sus consejos tanto personales como profesionales.

A la profesora Yolanda Sosa por su apoyo incondicional en la parte de producción enzimática de mi tesis.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional, algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos, sin importar en dónde estén quiero darles las gracias por su amistad, consejos, ánimos y compañía en los momentos más difíciles, por hacer que este trabajo saliera delante de la mejor manera posible, por su aporte invaluable, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

## CONTENIDO

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTO .....	ii
CONTENIDO.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Planteamiento del problema.....	5
1.2 Hipótesis .....	6
1.3 Justificación.....	6
1.4 Objetivos .....	7
1.4.1 Objetivos generales .....	7
1.4.2 Objetivos específicos.....	7
1.5 Marco teórico .....	8
1.5.1 Lipasas .....	8
1.5.2 Degradación de la lipasa .....	9
1.5.3 Enzimas termoestables .....	10
1.5.4 Factores que determinan la producción microbiana de la lipasa .....	13
1.5.5 Cinética enzimática.....	14
1.5.6 Aplicaciones industriales de las lipasas.....	16
1.5.7 Métodos de detección de lipasas.....	17
1.5.8 Aceites residuales.....	18
1.5.9 Problemática mundial de los aceites residuales .....	19
1.5.10 Aceites residuales en el Perú .....	21

1.5.11 Leyes de aceites residuales .....	22
II. MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
2.1 Materiales .....	24
2.1.1 Material biológico .....	24
2.1.2 Reactivos .....	24
2.1.3 Equipos .....	25
2.2 Métodos.....	26
2.2.1 Ubicación y delimitación del área de estudio .....	26
2.2.2 Población y muestra.....	26
2.2.3 Diseño de la investigación .....	27
2.2.4 Producción de lipasas termoestables bacterianas.....	31
2.2.5 Caracterización enzimática.....	38
2.2.6 Identificación molecular de las dos cepas con mayor actividad enzimática .....	41
2.2.7 Caracterización físico química de los aceites residuales..	43
2.2.8 Evaluación de la actividad lipolítica de las enzimas termoestables de las bacterias termófilas seleccionadas sobre los aceites residuales. ....	47
III. RESULTADOS .....	49
3.1. Producción de lipasas termoestable bacterianas .....	49
3.1.1. Actividad cualitativa .....	49
3.1.2 Actividad cuantitativa .....	54
3.2. Caracterización Enzimática .....	73
3.2.1. Caracterización enzimática de la cepa GT5 .....	73
3.2.2 Caracterización enzimática de la cepa FT3.....	89
3.3. Identificación de las dos cepas seleccionadas con mayor actividad enzimática. ....	105
3.3.1 Caracterización microscópica .....	105

3.3.2 Pruebas bioquímicas .....	106
3.3.3 Identificación molecular .....	107
3.4 Caracterización físico química de los aceites residuales. ....	108
3.5 Evaluación de la actividad lipolítica de las enzimas termoestables de las bacterias termófilas seleccionadas sobre los aceites residuales vegetales.....	109
IV. DISCUSIÓN .....	116
V. CONCLUSIONES.....	124
VI. RECOMENDACIONES .....	126
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
VIII.ANEXOS .....	136

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Propiedades de algunas lipasas termoestables de origen bacteriano .....	11
<b>Tabla 2.</b> Bacterias productores de lipasas.....	12
<b>Tabla 3.</b> Parámetros cinéticos de diferentes lipasas en sus formas solubles .....	15
<b>Tabla 4.</b> Resumen del diseño experimental factorial multinivel para la optimización de la actividad lipolítica usando pH y temperatura.....	28
<b>Tabla 5.</b> Resumen del diseño experimental factorial multinivel para la determinación de la termoestabilidad enzimática.....	29
<b>Tabla 6.</b> Esquema del diseño experimental completamente aleatorizado factorial 2x4.....	30
<b>Tabla 7.</b> Método colorimétrico de cuantificación de lipasas usando p - nitrofenol palmitato.....	35
<b>Tabla 8.</b> Efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad de reacción .....	38
<b>Tabla 9.</b> Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción. ....	40
<b>Tabla 10.</b> Diámetro de los halos formados de las 16 cepas productoras de lipasas.....	50
<b>Tabla 11.</b> Análisis de varianza de los halos formados de las 16 cepas analizadas.....	51
<b>Tabla 12.</b> Promedio de significancia de Tukey para los diámetros de la zona de hidrolisis de la lipasa producidas de los cultivos bacterianos .....	52

<b>Tabla 13.</b> Actividad enzimática (UI/ml) de los tres métodos de producción de lipasas.....	54
<b>Tabla 14.</b> Análisis de varianza de los tres métodos de producción de lipasas.....	54
<b>Tabla 15.</b> Promedio de significancia de Tukey para los métodos de producción enzimática de lipasa.....	55
<b>Tabla 16.</b> Actividad enzimática (UI/ml) de las diferentes ubicaciones de la enzima de la GT5.....	57
<b>Tabla 17.</b> Análisis de varianza de las diferentes ubicaciones de la enzima de la GT5.....	57
<b>Tabla 18.</b> Promedio de significancia de Tukey para la ubicación de la enzima de la GT5.....	58
<b>Tabla 19.</b> Actividad enzimática (UI/ml) de las diferentes ubicaciones de la enzima de la FT3.....	60
<b>Tabla 20.</b> Análisis de varianza de la ubicación de la enzima de la FT 3..	60
<b>Tabla 21.</b> Promedio de significancia de Tukey para la ubicación de la enzima de la FT 3.....	61
<b>Tabla 22.</b> Actividad enzimática (UI/ml) de la producción de la GT5 en diferentes tiempos.....	63
<b>Tabla 23.</b> Análisis de varianza del tiempo de producción enzimática de la GT5.....	64
<b>Tabla 24.</b> Promedio de significancia de Tukey para actividad enzimática (UI/ml) del diferente tiempo de producción de la GT5.....	65
<b>Tabla 25.</b> Promedio de significancia de Tukey para Actividad específica (UI/mg) de los diferentes tiempo de producción de la GT5.....	66
<b>Tabla 26.</b> Actividad enzimática (UI/ml) de la producción de la FT3 en diferentes tiempos.....	68

<b>Tabla 27.</b> Análisis de varianza del tiempo de producción enzimática de la FT3.....	69
<b>Tabla 28.</b> Promedio de significancia de Tukey para Actividad enzimática (UI/ml) de los diferentes tiempos de producción de la FT 3....	70
<b>Tabla 29.</b> Promedio de significancia de Tukey para Actividad específica (UI/mg) de los diferentes tiempo de producción de la FT 3.....	71
<b>Tabla 30.</b> Efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad del producto formado.....	73
<b>Tabla 31.</b> Análisis de varianza del efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad del producto formado .....	74
<b>Tabla 32.</b> Efecto del tiempo de reacción en la aparición del producto (p-nitrofenol) cinética de la reacción.....	76
<b>Tabla 33.</b> Análisis de varianza del tiempo sobre la concentración de producto formado (pNP).....	77
<b>Tabla 34.</b> Análisis de varianza de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción. ....	80
<b>Tabla 35.</b> Análisis de varianza para la actividad enzimática de lipasas de la cepa GT 5. ....	83
<b>Tabla 36.</b> Análisis de varianza para la actividad residual de la termoestabilidad de las lipasas de la cepa GT 5.....	86
<b>Tabla 37.</b> Efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad del producto formado.....	89
<b>Tabla 38.</b> Análisis de varianza del efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad del producto formado .....	90
<b>Tabla 39.</b> Efecto del tiempo de reacción en la aparición del producto (p-nitrofenol) cinética de la reacción.....	92
<b>Tabla 40.</b> Análisis de varianza del tiempo sobre la concentración de producto formado (pNP).....	93

<b>Tabla 41.</b> Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción. ....	96
<b>Tabla 42.</b> Análisis de varianza para la actividad enzimática de lipasas de la cepa FT 3.....	99
<b>Tabla 43.</b> Análisis de varianza para la actividad residual de la termoestabilidad de las lipasas de la cepa FT 3 .....	102
<b>Tabla 44.</b> Tinción Gram de las cepas bacteriana seleccionada .....	105
<b>Tabla 45.</b> Caracterización macroscópica de las cepas bacterianas seleccionadas .....	104
<b>Tabla 46.</b> Pruebas bioquímicas de las cepas seleccionadas .....	106
<b>Tabla 47.</b> Identificación molecular de las cepas seleccionadas mediante su ARN 16 S.....	107
<b>Tabla 48.</b> Caracterización Físico Química de los aceites residuales a degradar.....	108
<b>Tabla 49.</b> Actividad enzimática por titulación de la degradación de los aceites residuales usando dos enzimas termoestables de las cepas GT 5 y FT 3. ....	109
<b>Tabla 50.</b> Análisis de Varianza de la degradación de los aceites residuales vegetales usando dos enzimas termoestables de las cepas GT 5 y FT 3.....	110
<b>Tabla 51.</b> Promedio de significancia de Tukey para actividad enzimática (UI/ml) de los diferentes aceites residuales degradados. ....	114

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Hidrólisis y síntesis, modo de acción de las lipasas.....	8
<b>Figura 2.</b>	Activación interfacial de lipasas con interfases hidrofóbicas.	10
<b>Figura 3.</b>	Izquierda, bolas de grasa; derecha, obstrucción de un colector con grasa en España .....	20
<b>Figura 4.</b>	Contaminación asociada a la inadecuada disposición de residuos aceitosos .....	20
<b>Figura 5 y 6.</b>	Aceites residuales de restaurantes Burger King de San Miguel (Lima) diariamente desechados.....	22
<b>Figura 7.</b>	Gráfico de medias del diámetro de hidrolisis de lipasas de las 16 cepas evaluadas. ....	53
<b>Figura 8.</b>	Gráfico de medias de las actividades enzimáticas obtenidas de los tres métodos de producción. ....	56
<b>Figura 9.</b>	Gráfico de medias de las actividades enzimáticas obtenidas de los medios intracelular, extracelular y membrana celular de la cepa GT5 .....	59
<b>Figura 10.</b>	Gráfico de medias de doble entrada de las actividades enzimáticas y específicas versus el tiempo de producción de lipasas de la cepa GT 5 .....	67
<b>Figura 11.</b>	Gráfico de medias de doble entrada de las actividades enzimáticas y específicas versus el tiempo de producción de lipasas de la cepa FT 3.....	72
<b>Figura 12.</b>	Efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad de producto formado.....	75
<b>Figura 13.</b>	Efecto del tiempo sobre la concentración de producto formado (pNP) .....	78

<b>Figura 14.</b> Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción. ....	81
<b>Figura 15.</b> Modelo ajustado de la regresión lineal de la inversa de la concentración de sustrato vs la inversa de la actividad enzimática. (Representación de Lineweaver Burk).....	82
<b>Figura 16.</b> Superficie de respuesta estimada de la optimización del rendimiento de la actividad enzimática de lipasas de la cepa GT5.....	85
<b>Figura 17.</b> Superficie de respuesta estimada del tiempo de exposición de la enzima sobre diferentes temperaturas de las lipasas de la cepa GT 5 .....	88
<b>Figura 18.</b> Efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad de producto formado.....	91
<b>Figura 19.</b> Efecto del tiempo sobre la concentración de producto formado (pNP) .....	94
<b>Figura 20.</b> Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción .....	97
<b>Figura 21.</b> Modelo ajustado de la regresión lineal de la inversa de la concentración de sustrato vs la inversa de la actividad enzimática. (Representación de Lineweaver Burk).....	98
<b>Figura 22.</b> Superficie de respuesta estimada de la optimización del rendimiento de la actividad enzimática de lipasas de la cepa FT3 .....	101
<b>Figura 23.</b> Superficie de respuesta estimada del tiempo se exposición de la enzima sobre diferentes temperaturas de las lipasas de la cepa FT3.....	104

**Figura 24.** Gráfico de medias de la actividad enzimática (UI/ml) de la biodegradación de los aceites residuales vegetales por las lipasas termoestables. .... 112

## RESUMEN

De todas las cepas aisladas de los géiseres de Calientes, solo los de código GT5 y FT3, identificadas molecularmente como *Anoxibacillus sp* y *Geobacillus kaustophilus* respectivamente, mostraron una mayor actividad extracelular, las cuales fueron escogidas para caracterizar enzimáticamente, obteniendo que su mayor producción a las 24 hora con un medio inducido por aceite de oliva y con trazas de iones de calcio, dando así una actividad de 12 UI/ml y 7 UI/ml respectivamente. Las cepas GT5 y FT 3 presentan una pH y temperatura óptima de 9,13; 10 respectivamente y 65,45 °C; 66 °C respectivamente, y según la termoestabilidad aguantan temperatura de 65,45 °C por 86 min y 61 °C por 30 min respectivamente dando actividad residual que asciendes a 171 % y 135 % respectivamente, A pesar que existe incrementos de los diversos índices de los aceites residuales estos no alteran la biodegradación por parte de las enzimas estadísticamente a diferencia del aceite de oliva que es mejor degradado, llegando a la conclusión que si es posible la biodegradación de los aceites residuales vegetales usando lipasas termoestables de bacterias termófilas.

## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los desechos de aceites vegetales se están convirtiendo en un problema a nivel mundial en donde grandes volúmenes se producen anualmente en todo el mundo ocasionando problemas en las plantas de tratamiento de agua residual, al medio ambiente y a las personas cuando estos son ingeridos indirectamente por animales.

En el Perú los principales emisores de estos residuos son de origen industrial seguido de los grandes restaurantes, chicharronerías, pollerías a la brasa, etc.

Un inadecuado manejo de estos aceites dispone la contaminación ambiental la cual está asociada a la toxicidad de este residuo en los ecosistemas receptores (mayormente en cuerpos de agua, ríos, mares y lagos) (Márquez-Riquel , Navas-Yamarte , Yegres , & Vivas-Espejo , 2015), formando una capa superficial la cual disminuye el paso de la luz e impide el intercambio de oxígeno entre el agua y el aire con la liberación de agentes contaminantes (Caballero Moreno, Lopez Vidal, Morgan Lopez, & Espinoza Ovaldo, 2012; IPES - Promoción del Desarrollo Sostenible, 2002; Balkanlioğlu, 2012) cuya acumulación de estas grasas hace que se endurezcan, reduciendo la capacidad de flujo de las tuberías (Balkanlioğlu, 2012), generando atoro y aniego en el desagüe y en el alcantarillado, especialmente en pendientes planas (IPES - Promoción del Desarrollo Sostenible, 2002).

Todo esto trae como consecuencia, el incremento de los costos de tratamiento de aguas servidas (Espinoza & Gutiérrez., Centro de recursos

para América Latina y el Caribe en Gestión de recursos, 2005; Caballero Moreno, Lopez Vidal, Morgan Lopez, & Espinoza Ovaldo, 2012; IPES - Promoción del Desarrollo Sostenible, 2002), pero si es arrojado al suelo elimina la productividad de la tierra, si es quemado sin control ambiental contamina el aire (IPES, 2006) si se mezcla con restos de comida y es utilizado en chancherías clandestinas atentan contra la salud de las personas (Espinoza & Gutiérrez., Centro de recursos para America Latina y el Caribe en Gestion de recursos, 2005) y si llega al mar ocasiona un incremento del número de medusas pudiendo afectar gravemente las regiones costeras que carezcan de instalaciones de refinamiento, afectando gravemente al turismo (Balkanlioğlu, 2012).

Un litro de aceite usado contamina 1 millón de litros de agua (IPES, 2006; Balkanlioğlu, 2012), formando una membrana de 4000 m<sup>2</sup>, cinco litros de aceite usado contaminan todo el aire que una persona respira en tres años, y cuyos gases pueden asfixiar provocando cáncer al pulmón (IPES, 2006) además de ser la razón de 25 por ciento de la contaminación del agua (Balkanlioğlu, 2012). Gladys Zarak representante de la Empresa Zyma Soluciones en el 2013 afirmó que el D.S. 021-2009-Vivienda (Decreto supremo creado para controlar el máximo valor admisible (VMA) de aceite y grasas a los desagües) y su reglamento resulta un tema más que preocupante, ya que podrían generar sobre costos a las empresas que no se adecúen a sus exigencias, donde restaurantes y hoteles podrían llegar a pagar multas de hasta de 2000 % mensuales sobre el costo habitual de sus recibos por alcantarillado (Infotur 2013).

Por otro lado, Sedapal ha tenido muchas acciones para difundir este Decreto Supremo, pero se sabe que es un mercado muy grande y que se

tienen que hacer enormes esfuerzos para que todos estén enterados al detalle de lo que les puede suceder si es que no adecúan. Se han propuesto medidas correctivas, implementando trampas de grasas eficientes para poder retener grasas y sólidos.

Hoy en día no todos los hoteles y restaurantes cuentan con dichas trampas, algunos tienen trampas de concreto, que son unos huecos de cemento en el piso con un sistema separador de la grasa del agua por diferencia de densidades, pero si no se le da un mantenimiento constante, el nivel de eficiencia baja y cae muy rápidamente por la acumulación de estas, arrastrando la grasa que ya estaba separada a la red de tuberías. (Infotur 2013).

Es por esto que Sedapal ha propuesto el uso de microorganismos benéficos producidos por la empresa Biodyne – Perú para poder llegar a los VMA, cuyo producto cuenta con 29 cepas de microorganismos vivos capaces de reducir la acumulación de grasa en las trampas y evitar los taponamientos de las tuberías. (Biodyne-Perú 2015) cuya eficacia de este producto radica en la actividad de las enzima (lipasas) que estos microorganismos benéficos producen, no obstante, esa enzima una vez producida ya no es reutilizada, puesto que al ser extracelular, se mezcla con el agua a tratar, degradando los lípidos y se va con el desagüe junto con parte de los microorganismos benéficos utilizados, sumado a esto la necesidad de estos seres vivos de tener una temperatura óptima, un pH adecuado así como una concentración del sustrato óptimo para inducir la cantidad de enzima necesaria para la realización de una biodegradación eficaz, hace buscar nuevas opciones más rentables y eficaces usando ya no microorganismos en sí, sino la enzima que estos producen.

La biorremediación enzimática consiste en el uso de una concentración determinada de lipasas (biocatalizador) que garantice la efectividad de la biodegradación, acelerando los cambios químicos e induciendo complejas reacciones de transformación química con un gasto energético mínimo y con una elevada velocidad de reacción (Mendoza Vera 2004) garantizando así su eficacia para la biodegradación de las grasas acumuladas en las trampas de grasa.

Otra de las ventajas es que las enzimas no son consumidas por las reacciones que ellas catalizan, por lo que a medida que ellas consumen los sustratos contaminantes pueden seguir actuando (son reutilizables). (Hidrotec s.f.)

También existen catalizadores químicos los cuales son usados para la degradar de lípidos, pero estos al ser de naturaleza química necesitan del uso de un equipo de protección especial además de que son corrosivos en las paredes de sus contenedores, es por esto que las lipasas son usadas comúnmente como biocatalizadores teniendo ciertas ventajas sobre los catalizadores químicos (Kinneya 2005 citada por Lew y otros 2014).

Por otro lado, en la actualidad las lipasas termoestables están cogiendo cierto interés debido a la ventaja de su estabilidad en temperaturas elevadas como elevada velocidad de difusión, incremento de la solubilidad de los lípidos y otros sustratos hidrófobos en agua, disminución de la viscosidad de sustrato, además el incremento de la velocidad de reacción, etc. Ventajas que pueden incrementar la eficiencia para degradar los lípidos de los aceites residuales producidos por los restaurantes.

Lew y otros (2014) menciona que las lipasas de bacterias termófilas han demostrado ser más útiles en el proceso de degradación que las enzimas similares (producido por mesófilos, incluso bacterias psicrófilos) debido a su estabilidad. Es por esto que se pretende con este trabajo encontrar enzimas termoestables producidas por bacterias termófilas las cuales puedan degradar los diferentes tipos de aceites residuales producidos por pollerías, chicharrearías, restaurantes, industria local etc.

### **1.1 Planteamiento del problema**

Para encontrar biocatalizadores bacterianos termófilos con mayor actividad enzimática es necesario obtener la optimización de los parámetros fundamentales que intervienen en dicha actividad, tales como el pH y la temperatura, a la vez conocer la resistencia que presentan estas enzimas cuando se someten a elevadas temperaturas (termoestabilidad) para así poder enfrentar a diferentes sustratos constituidos por aceites residuales producidos en nuestra localidad. Se plantea el problema de la siguiente manera. **¿Es posible la biodegradación de los aceites residuales vegetales usando lipasas termoestables de bacterias termófilas?**

## **1.1 Hipótesis**

Si es posible la biodegradación de aceites residuales vegetales usando las lipasas termoestables de bacterias termófilas

## **1.2 Justificación**

El presente estudio pretende conocer la capacidad biodegradadora de las enzimas lipasas termoestables de bacterias termófilas sobre los diferentes aceites residuales vegetales producidos en nuestra localidad, generando una alternativa para reducir el efecto de los aceites y grasas contaminantes emitidos, evitando así los riesgos de contaminación al medio ambiente, cumpliendo con los valores máximos admisibles dados por Decreto Supremo N° 021-2009-Vivienda.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivos generales**

- Biodegradar aceites residuales usando lipasas termoestables de bacterias termófilas.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Producir lipasas termoestables bacterianas
- Caracterizar enzimáticamente las lipasas termoestables.
- Identificar molecularmente las bacterias termófilas seleccionadas.
- Caracterizar fisicoquímicamente los aceites residuales vegetales.
- Evaluar la actividad enzimática de las lipasas termoestables producida sobre los aceites residuales vegetales.



### **1.5.1.1 Clasificación EC**

Las lipasas se clasifican de la siguiente manera EC 3. 1. 1. 3, donde la clase 3 denota que pertenece al grupo de las hidrolasas, y la formación de productos de un sustrato por hidrólisis, la subclase 1 que actúa sobre enlaces éster, la sub-sub-clase 1 que es una hidrolasa de éster-carboxílico. El último dígito denota que se trata de una triacilglicerol lipasa. (Radich, 2015).

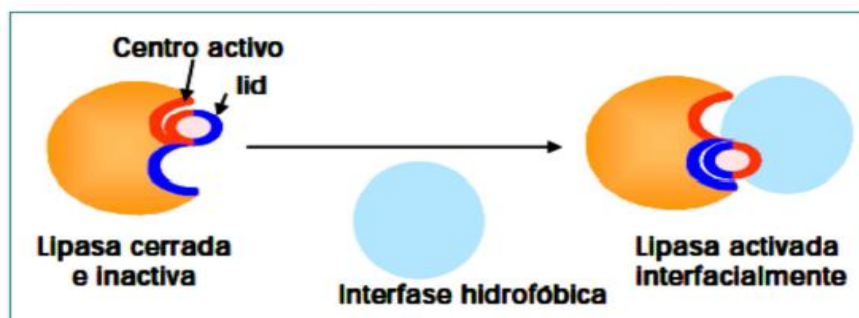
### **1.5.1.2 Mecanismo de reacción**

Por otra parte las lipasas pueden presentarse en dos formas, la cerrada o inactiva y la abierta o activa, en la forma cerrada o forma inactivada el centro activo de la enzima es escondido por una cadena de polipéptidos en forma de una tapa llamada "lid" debido a causas de la polaridad del medio acuoso, caso contrario pasa en la forma abierta, donde la cadena de polipéptidos se mueve cambiando su conformación y haciendo que el centro activo de la enzima este expuesto al medio de reacción (lo que ocurre en fase agua aceite) por el cual el mecanismo se le conoce como activación interfacial. (Rivera-Pérez, & García-Carreñ, 2007).

## **1.5.2 Degradación de la lipasa**

El mecanismo de acción de las lipasas consiste en la hidrólisis de un ácido graso en presencia de alcohol obteniendo un éster liberando agua. Así mismo, el mecanismo catalítico de las lipasas se basa en un sistema de intercambio de carga que consta de cuatro etapas. Tras la unión del sustrato, se produce el ataque nucleofílico por parte del grupo hidroxilo de

la serina catalítica sobre enlace éster del lípido, lo que lleva a la rotura del enlace y a la formación de un intercambio entre el ácido graso y la serina nucleofílica, posteriormente se libera el alcohol y se produce un segundo ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua que ataca el enlace éster del intermediario transitorio, lo que produce la liberación del ácido graso y la regeneración del centro catalítico, Bornscheuer, 2002 citado por Cepeda (2007).



**Figura 2.** Activación interfacial de lipasas con interfases hidrofóbicas

**Fuente:** Radich, 2015

### 1.5.3 Enzimas termoestables

Las lipasas que son termoestables tienen mayor tensión puesto que son utilizadas en la producción de biocombustibles, compuestos orgánicos sintéticos, detergentes, perfumes, cosméticos, cuero, productos farmacéuticos, diagnósticos médicos, alimentos y comidas. Por lo tanto, la especificidad de la lipasa y la estabilidad bajo diferentes condiciones son la clave para su selección en una aplicación particular. Fuentes microbianas

de hongos, bacterias y arqueas producen lipasas con propiedades únicas que se pueden utilizar para aplicaciones biotecnológicas.

Las lipasas microbianas no pueden ser comparables con las plantas y los animales debido a su mejor rendimiento, facilidad de purificación y modificaciones moleculares, producción continua que es independiente de temporada, etc.

**Tabla 1.** Propiedades de algunas lipasas termoestables de origen bacteriano

<b>BACTERIA</b>	<b>T máx. (°C)</b>	<b>pH óptimo</b>	<b>Estabilidad</b>
<i>Bacillus sp.</i>	50° C	8 – 9	45 min a 60° C, 65° C
<i>Pseudomonas sp</i>	90° C	11	t1/2 = 13 h a 90° C
<i>B thermoleovorans</i> ID-1	70–75°C	7.5	t1/2 = 30 min a 70°C
<i>Bacillus strain</i> A30-1	60° C	6 – 9	t1/2 = 8 h a 75° C
<i>Aneurinibacillus</i>	65° C	7	t1/2 = 3 h a 60 °C
<i>Burkholderia multivorans</i>	50° C	8	t1/2 = 50 °C en 10 min
<i>Burkholderia sp.</i>	60° C	8.5	t1/2 = 2.5 h 60 °C
<i>B. subtilis</i> NS 8	60° C	7	t1/2 = 4 h min a 60°
<i>B. coagulans</i> MTCC	45° C	8.5	t1/2 = 20 min a 55°C

**Fuente:** Salihu & Alam, 2015

**Tabla 2.** Bacterias productoras de lipasas.

<b>Fuente microbiana</b>	<b>Refs.</b>
<i>Achromobacter lipolyticum</i>	Jaeger y otros(1998)
<i>Acinetobacter</i>	Chen y otros(1999)
<i>Acinetobacter</i>	Sztajer & Maliszewska, (1998)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Anguita & Aparicio, (1999)
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Manco y otros(1998)
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	Jaeger y otros(1999)
<i>Bacillus megaterium</i>	Ghosh y otros(1996)
<i>Bacillus pumilus</i>	Jaeger y otros(1999)
<i>Bacillus sp.</i>	Jaeger y otros(1998)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Kim y otros(1998)
<i>Bacillus subtilis</i>	Kennedy y otros(1979)
<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	Vakhlu y otros(2006)
<i>Bacillus thermoleovorans</i>	Lee y otros(1999)
<i>Glumae Burkholderia</i>	Jaeger y otros(1998)
<i>Chromobacterium</i>	Jaeger y otros(1998)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Kar y otros(1996)
<i>Micrococcus freudenreichii</i>	Hou y otros(1994)
<i>Moraxella sp.</i>	Sellappan y otros(2005)
<i>Mycobacterium chelonae</i>	Pandey y otros(1999)
<i>Pasteurella multocida</i>	Pratt y otros(2000)
<i>Cepacia Pseudomonas</i>	Lang y otros(2001)

**Fuente:** Elaboración propia

## **1.5.4 Factores que determinan la producción microbiana de la lipasa**

### **1.5.4.1 Fuente de carbono**

Diferentes autores han descrito una variedad de fuente de carbono las cuales van desde aceite de oliva al 1 %, el cual tuvo poca actividad en *Bacillus sp.* Otros autores afirman que el aceite de palma es la mejor fuente de carbohidrato, siendo probada en *Rhodotorula glutinis*. En la producción de una lipasa extracelular, en dicho trabajo se compararon dos fuentes de carbono, aceite de palma y fructuosa donde el aceite de palma al 2 % tuvo un incremento en 12 veces más lipasas que el medio fructosa (Papaparaskevas et al., 1992) citado por Sharma (2001).

En otros trabajos, se observaron una actividad específica de 7,395 U/mg de proteína para la lipasa alcalina (pH 8,5) producida por *P. fluorescens* S1K WI en un medio que contenía aceite oliva emulsionado. Del mismo modo, una lipasa alcalina de *Penicillium expansum* produjo actividad máxima en un medio que contenía aceite (0,1 % de aceite de oliva) a pH 8,3. (Gupta et al., 2005)

### **1.5.4.2 Fuente de nitrógeno**

Las fuentes de nitrógeno que se han probado varían desde peptona, extracto de levadura, licor de maíz, harina de soja, sulfato de amonio entre otros. De los cuales la peptona siempre ha tenido mayor rendimiento tanto para bacterias como para hongos, tal es así, que indujeron a *Penicillium citricum* al 5 % de peptona y tuvo mayor actividad que cuando lo indujeron con licor de maíz y harina de soja, y cuando se le probó con sulfato de amonio este inhibió la inducción. En otro trabajo usando el 2 % de peptona

y 0,1 % de extracto de levadura, obtuvieron una actividad de 1120 U/L en *Pseudomonas sp* (Sharma, 2001)

#### **1.5.4.3 Efecto de iones metálicos**

Los iones metálicos influyen de manera directa sobre la producción enzimática, siendo los más indispensables los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  a pesar que algunos autores han afirmado que obtuvieron mayor producción cuando añadieron a parte de estos dos iones la  $\text{Fe}^{2+}$  y al  $\text{Cu}^{2+}$  tal como lo afirma Kok et al., (1995).

En una de sus publicaciones para producción de lipasas de *Aci. calcoaceticus* a la vez Pokorny et al. (1994) afirmó que *A. niger* obtuvo mayor producción solo con iones de  $\text{Mg}^{2+}$

Por otro lado, *Bacillus sp.* (ATCC 53841) requiere que un medio complejo que contenía  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (Wang et al., 1995). Otros trabajos usaron a *P. pseudoalcaligenes* con  $\text{Mg}^{2+}$  0.8 M, pero cuando ausentaban en el medio de producción hacían que se redujera en un 50 % los medios de producción.

#### **1.5.5 Cinética enzimática**

En la Tabla 3 se muestran los valores de  $K_m$  y  $V_{\text{máx}}$ . De algunas lipasas, obtenidas de diferentes fuentes. Cabe aclarar que se utilizan diferentes sustratos para medir dichos parámetros, por lo que no se pueden comparar por completo los valores, ya que las lipasas muestran mayor afinidad a ciertos sustratos.

**Tabla 3.** Parámetros cinéticos de diferentes lipasas en sus formas solubles

FUENTE	SUSTRATO	KM	VMAX	REFERENCIA
Páncreas porcino	p nitrofenil acetato	0,20 mmol/L	ND	De Caro y col. 1986
<i>Thermus</i> sp.	Trioleína	70 % (treoleína)	825 mmol / (ml * min)	Silva y col. 1991
<i>Candida rugosa</i> A	p- nitrofenil butirato	0,0392 mmol/L	ND	Rúa y col, 1993
<i>C. rugosa</i> B	p- nitrofenil butirato	> 0,4 mmol/L	ND	Rúa y col, 1993
<i>C rugosa</i>	Aceite de oliva	703 mmol/L	6,032 mmol / (ml * min)	Prazeres y col, 1996
Salvado de arroz	Trioleína	6,71 mmol/L	ND	Bhardwa y col. 2001
<i>Bacillus</i> sp.	p- nitrofenil laurato	3,73 mmol/L	0,2625 mmol / (ml * min)	Dosanjh y Kaur. 2002
<i>Burkholderia</i>	p- nitrofenil	136 mmol/L	5,62 mmol / (mg)* min)	Dandavate y col, 2009
<i>multivorans</i> V2	palmitato			

ND No determinado.

KM Constante de Michaelis - Menten para el par enzima-sustrato.V máx. Velocidad máxima de la reacción catalizada por la lipasa

**Fuente:** Lew, Kumar, & Zambare, 2014

### **1.5.6 Aplicaciones industriales de las lipasas**

Las lipasas han encontrado amplias aplicaciones en la industria alimentaria moderna en lugar de procesos químicos tradicionales. Hoy en día, las lipasas se utilizan comúnmente en la producción de una variedad de productos como zumos de frutas, alimentos horneados, verduras fermentadas, quesos, mantequilla, aderezos, sopas y salsas.

La modificación de los lípidos (aceites y grasas) es uno de los procesos importantes en los alimentos industria. Las lipasas también se utilizan para dar sabor especial a los alimentos mediante la síntesis de ácidos y alcoholes grasos, que son aceptadas como compuestos de sabor y de fragancia Gandhi (1997) citado por (Adan, 2009) En este caso, las lipasas se emplean comúnmente en la industria láctea para la hidrólisis de la grasa de la leche. Mejora de sabor en los quesos, la aceleración de queso la maduración, la producción de queso como productos y la lipólisis de la grasa de mantequilla y crema se consigue mediante la ayuda de las enzimas lipasa.

La adición de lipasas para este tipo de productos libera principalmente de cadena corta de ácidos grasos (C4 y C6) que forman sabor fuerte pero la liberación de cadena media (C12 y C14) ácidos grasos conduce a la formación de un sabor suave Saxena, et al. (1999) citado por (Adan, 2009)

Las lipasas se han utilizado para la producción de carne como carne de pescado sin cantidad en exceso de grasa. La grasa se elimina durante el procesamiento de la carne de pescado mediante la adición de lipasas y este procedimiento se llama biolipolysis (Adan, 2009).

### **1.5.7 Métodos de detección de lipasas**

Lipasas de un gran número de fuentes bacterianas, fúngicas y algunos vegetales y animales se han purificado hasta la homogeneidad. Y debido a esto, se han propuesto diversas formas de cuantificación tales como nefelometría y turbidimetría, lanzamiento de glicerol a partir de triglicéridos, conductividad eléctrica, el método de la placa de Wilhelmy, conductancia de la onda acústica, los métodos colorimétricos, métodos fluorométricos, métodos volumétricos por titulación y colorimétricos ( Hasan, Ali Shah , & Hameed, 2009) siendo estos últimos los que han tenido mayor acogida.

#### **1.5.7.1 Métodos volumétricos**

La reacción lipolítica libera un ácido que puede ser por titulación el ensayo. El método consiste en neutralizar los ácidos grasos liberados mediante la adición de un álcali (NaOH o KOH) a una concentración de 0,1 M por lo general y usando un indicador que mayormente es la fenolftaleína 1 % diluido en etanol al 96 %, en esta técnica se resta el blanco el cual es la acidez de los ácidos libres del medio Es un método cuantitativo sensible para 1 mol de ácido graso liberado por minuto ( Hasan, Ali Shah , & Hameed, 2009).

#### **1.5.7.2 Los métodos colorimétricos**

La velocidad y la sensibilidad de los ensayos de ácidos grasos libres han aumentar el uso de métodos colorimétricos. Estos métodos implican la

formación de complejos de ácidos grasos libres en un disolvente orgánico con un metal bivalente (generalmente cobre) seguido del análisis espectrofotométrico del metal en la fase orgánica.

Este método fue desarrollado por primera vez por Duncombe (1963). El complejo de cobre fue posteriormente estimado espectrofotométricamente a  $\lambda$  440 nm. Varios métodos emplean un sustrato especial diseñado para dar un producto de color final después de la hidrólisis, o uno que se puede convertir fácilmente en un producto coloreado. La actividad de la lipasa en los sobrenadantes de cultivo bacteriano se determina mediante la hidrólisis de los ésteres de p-nitrofenilo de grasos ácidos con diversas longitudes de cadena (NC-10).

La actividad enzimática se expresa en moles de p-nitrophenol liberado por minuto, derivados de p-nitrofenil de ácido graso (ácidos láurico en general o palmítico) han sido populares Gupta et al (2005) encontró buenos resultados con palmitato de p-nitrofenilo que parece ser estable a elevadas temperaturas de hasta 100 °C.

### **1.5.8 Aceites residuales**

Los aceites residuales o usados es definido según la Norma Técnica Peruana NTP 900.050 "Gestión Ambiental/Manejo de Aceites Usados/Generalidades" como "todo aceite con base mineral o sintética que debido a su uso se encuentre contaminado con impurezas físicas o químicas y no puede ser utilizado para el fin con el que fue producido inicialmente" catalogados como residuos peligrosos (Corpac, 2008) cuyas fuentes se dividen en dos: Generadores de aceite usado mineral (principalmente

lubricantes, talleres mecánicos, empresas de transporte y grifos) y los generadores de aceite vegetal (principalmente pollerías, restaurantes, chicharronerías, industrias y de uso domésticos) (IPES - Promoción del Desarrollo Sostenible, 2002).

### **1.5.9 Problemática mundial de los aceites residuales**

La producción de aceites residuales de cocinas, restaurantes, etc. son un problema no solo a nivel nacional sino mundial (Lew, Kumar, & Zambare, 2014) En el 2009 los países de la unión europea producían aproximadamente 700 000 -1 000 000 toneladas por año (Patil & Gnaneswar Gude , 2009) y en la actualidad la cantidad de aceites usado es más de 15 millones de toneladas por año (Lopresto, Naccarato, Albo, De Paola, & Chakraborty, 2015), Según la administración de información de energía de los EEUU estimo que 138 millones de toneladas de aceites de cocina usado se produce por año en EEUU con una proporción per cápita de 9 libras por año. (Radich, 2015), mientras que el Reino Unido la producción era aprox. De 200 000 toneladas de residuos de aceites de cocina usado, (Chhetri, Watts, & Islam, 2008) en Canadá se produce aprox. 135 000 toneladas anuales de aceite de cocina usado (Martinez-Guerra & Gnaneswar Gude, 2014) y todo esto debido al desarrollo industrial y comercial (restaurante, chifas, etc.) el cual ha incrementado en los últimos años, así como al crecimiento demográfico acelerado (IPES - Promoción del Desarrollo Sostenible, 2002) planteando una amenaza ambiental si no se utiliza o desecha adecuadamente (Charpe & Rathod, 2011).



**Figura 3.** Izquierda, bolas de grasa; derecha, obstrucción de un colector con grasa en España

**Fuente:** Gonzales Cañal & Gonzales Hubierna, (1994)



**Figura 4.** Contaminación asociada a la inadecuada disposición de residuos aceitosos

**Fuente:** Salcedo (2012)

### **1.5.10 Aceites residuales en el Perú**

Según reportes de INEI (2015) en el Perú el subsector restaurantes creció en 4,2 %, de los cuales el 35,5 % se debe al rubro de preparación de comidas (por la evolución favorable de restaurantes, chicharronerías, chifas, comida rápida, heladerías, café, pizzerías cevicheras, picanterías, etc.) El 11,3 % pertenece a Servicios de bebidas (Bar restaurantes, café restaurantes, etc.). Todo este aceite residual generado se vierte regularmente por los desagües siendo un problema para la planta de tratamiento de aguas residuales, además que en algunos casos se introduce a la cadena alimentaria a través de la alimentación animal y por lo tanto se convierte en un potencial problema para la salud humana. (Felizardo, Neiva Correia, Raposo, & Mendes, 2006).

Diferentes países han apostado por el reciclado de este aceite residual considerándolo viable económicamente (Chisti, 2007) si se convirtiese en materia prima para la fabricación de biodiesel (Lew, Kumar, & Zambare, 2014; Chisti, 2007) o jabones (Espinoza, Gestión ambiental de residuos sólidos, una herramienta para la empresa, 2014).

En el Perú diversas empresas apostaron por esta opción, pero debido a la falta de conciencia por parte del personal de cocina y su personal administrativo de los diferentes restaurantes, pollerías, chifas, etc. (Infotur, 2013), la falta de colaboración por parte de las diferentes municipalidades en favor del medio ambiente, además del tedioso trámite de autorización que tienes que pedir a la Sunat cualquier empresa que desea producir biodiesel a partir de aceite residual (Málaga, 2010) es que

el problema del aceite residual desechado en el alcantarillado continua hasta la actualidad, agravándose este problema en provincia.



**Figura 5.** Aceites residuales de restaurantes Burger King de San Miguel (Lima) diariamente desechados.

**Fuente:** Salcedo, 2012

### **1.5.11 Leyes de aceites residuales**

En el 2002 la Sociedad Peruana de Derecho Ambiental (SPDA) publicó un proyecto denominado "Gestión Ambiental de Aceites Usados", ejecutado por el IPES y financiado por el convenio suscrito entre la Agencia para el Desarrollo Internacional de los Estados Unidos (USAID) y el Consejo Nacional del Ambiente (CONAM).

El proyecto constituyó un aporte significativo a la gestión ambiental de los aceites usados minerales y vegetales, promoviendo un adecuado manejo interno en el punto de generación, además de la elaboración de cuatro Normas Técnicas Peruanas para el manejo de aceites usados. (NTP 900.050:2001 Gestión Ambiental. Manejo de aceites usados. Generalidades; NTP 900.052:2002 Gestión Ambiental. Manejo de aceites

usados. Transporte; NTP 900.054:2004 Gestión Ambiental. Manejo de aceites usados. Aprovechamiento energético de aceites usados, previo tratamiento (Indecopi, 2006)); Dando lugar años después a la creación del DECRETO SUPREMO N° 021-2009-VIVIENDA donde aprueban los Valores Máximos Admisibles (VMA) de las descargas de aguas residuales no domésticas en el sistema de alcantarillado sanitario, cuyo Artículo 3°.- define los Valores Máximos Admisibles (VMA) como “aquel valor de la concentración de elementos, sustancias o parámetros físicos y/o químicos, que caracterizan a un efluente no doméstico que va a ser descargado a la red de alcantarillado sanitario, que al ser excedido causa daño inmediato o progresivo a las instalaciones, infraestructura sanitaria, maquinarias...” y que según el anexo N° 1 dispone un VMA para aceites y grasas (A y G) de 100 mg/L. la cual desde el momento en que entro en vigencia según la segunda Disposición Complementaria Final “los usuarios que se encontraron efectuando descargas de aguas residuales no domésticas en los sistemas de alcantarillado sanitario, debieron adecuar sus descargas a las disposiciones establecidas en la norma antes mencionada, en un plazo no mayor de cinco (5) años” plazo que ya se cumplió.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1 Material biológico

Las cepas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Escuela Profesional de Biología Microbiología de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, aisladas de los Géiseres de Calientes – Candarave que se encuentra a 4 300 msnm.

#### 2.1.2 Reactivos

- p-nitrofenil palmitato
- Isopropanol 99 %
- Goma arábica
- Tritón x100
- $\text{CaCO}_3$  0,01M
- Peptona
- Extracto de levadura
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Hidróxido de sodio 50 mM
- Hidróxido de potasio 50 mM
- Ácido clorhídrico 0,5 M
- Buffer fosfato 50 mM pH 6, 7
- Buffer Tris HCl 50 mM, pHs 7, 8 y 9
- Buffer glicina 50 mM, pH 10
- Buffer acetate 50 mM, pH 4, 5

- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol acetona
- Safranina
- Caldo nutritivo 0,325 % (w/v)
- $\text{CaCl}_2$  0,1 % (w/v)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1 %)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,05 %)
- $\text{NaNO}_3$  (0,3 %)
- Almidón (2,0 %)

### 2.1.3 Equipos

- Esterilizador GEMMY Modelo YCO-010
- Baño termostático Gemmy Modelo YCW -010E
- Incubadora GEMMY, Modelo IN – 010
- Espectrofotómetro GREETMED, Modelo NV-203
- Autoclave GEMMY
- Cámara de Neubauer
- Equipo de Filtración
- Microcentrífuga EPPENDORF 5418
- Vórtex Mixer LABNET
- Cocina eléctrica
- Balanza electrónica DAKOTA
- Micropipeta 5-50  $\mu\text{l}$  DRAGON LAB
- Micropipeta 100-1000  $\mu\text{l}$  BIOHIT, Germany
- Micropipeta 100  $\mu\text{l}$  BOECO- Germany

- Micropipeta 50 µl BOECO – Germany
- Incubador Shaker J-NSIO

## **2.2 Métodos**

### **2.2.1 Ubicación y delimitación del área de estudio**

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Escuela Profesional de Biología Microbiología de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

### **2.2.2 Población y muestra**

#### **2.2.2.1 Poblaciones**

Las poblaciones lo constituyen las 119 cepas bacterianas aisladas en los géiseres de Calientes, Candarave - Tacna muestreadas en los años 2014 y 2015.

#### **2.2.2.2 Muestra**

Se utilizó el muestreo no probabilístico por conveniencia debido a la selección presuntiva de 16 bacterias de todo el Cepario del Laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Ciencias.

### **2.2.3 Diseño de la investigación**

El tipo de investigación fue básica - experimental, cuyo diseño para la selección cualitativa fue el completamente aleatorizado (D.C.A.) usando 16 tratamientos (cepas preseleccionadas). Y cuya variable respuesta es el diámetro de los halos de cada cepa que estas forman en condiciones determinadas.

Para el caso de la determinación del método de producción, el diseño experimental fue el completamente aleatorizado con tres tratamientos (los tres métodos de producción); en la determinación de la ubicación de la enzima se usó un diseño experimental completamente aleatorizado con tres tratamientos (los tres lugares de la ubicación de la enzima, intracelular, membrana y extracelular) y en la determinación del tiempo de mayor producción enzimática para cada cepa seleccionada fue el diseño completamente aleatorizado con cuatro tratamientos (0, 24, 48 y 72 horas) todos los ensayos descritos con anterioridad fueron realizados por triplicado y cuyos análisis estadísticos de todos se llevaron a cabo mediante el análisis de varianza, y para comparar efectos principales e interacciones comparativas entre sus medias el métodos de Tukey.

Para la caracterización enzimática del pH y la temperatura óptima de las cepas seleccionadas se usó el diseño experimental factorial multinivel donde:

- Número de factores experimentales: 2 (pH y Temperatura)
- Número de variables respuesta: 1 (rendimiento de la actividad enzimática de lipasas expresadas %)

- Número de bloques: 3 repeticiones

**Tabla 4.** Resumen del diseño experimental factorial multinivel para la optimización de la actividad lipolítica usando pH y temperatura.

<b>Factores</b>	<b>Valor mínimo</b>	<b>Valor máximo</b>	<b>Niveles</b>	<b>Unidades</b>
<b>pH</b>	4,0	10,0	7	pH
<b>Temperatura</b>	40,0	90,0	6	°C

Número de corridas: 126  
Grados de libertad para el error: 118

**Fuente:** Elaboración propia usando el estadístico Statgraphics 16.1.15

Para la caracterización enzimática de la termoestabilidad se usó el diseño experimental factorial multinivel donde:

- Número de factores experimentales: 2 (tiempo y temperatura)
- Número de respuestas: 1 actividad residual %
- Número de bloques: 3 repeticiones

**Tabla 5.** Resumen del diseño experimental factorial multinivel para la determinación de la termoestabilidad enzimática.

<b>Factores</b>	<b>Valor mínimo</b>	<b>Valor máximo</b>	<b>Niveles</b>	<b>Unidades</b>
<b>Temperatura</b>	60	90	4	°C
<b>Tiempo</b>	0,5	4	4	horas

Número de corridas: 48  
Grados de libertad para el error: 40

**Fuente:** Elaboración propia usando el estadístico Statgraphics 16.1.15

Tanto para la determinación del pH y temperatura óptima al igual que para la termoestabilidad se usaron el análisis estadístico del análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente el análisis de regresión lineal múltiple.

En la biodegradación de las dos enzimas frente a los diferentes aceites residuales se usó un diseño experimental completamente aleatorizado factorial 2x4 (ver Tabla 6) la cual tendrá dos repeticiones por cada ensayo, el análisis estadístico se llevará a cabo mediante el análisis de varianza, y para comparar efectos principales e interacción comparativa entre media se usará los métodos de Tukey.

**Tabla 6.** Esquema del diseño experimental completamente aleatorizado factorial 2 x 4

N° de repeticiones	enzima 1				enzima 2			
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>
R I								
R II								

S<sub>1</sub>: Sustrato 1 (aceite residual de restaurantes)

S<sub>2</sub>: Sustrato 2 (aceite residual de chicharronerías)

S<sub>3</sub>: Sustrato 3 (aceite residual de cevicherías)

S<sub>4</sub>: Sustrato 4 (aceite de oliva como control)

R I y R II: Repeticiones de cada ensayo

**Fuente:** Elaboración propia

Todos los diseños analizados fueron usando el estadístico Statgraphics 16.1.15 y/o el SPSS 18

## **2.2.4 Producción de lipasas termoestables bacterianas**

### **2.2.4.1 Actividad cualitativa**

Para esta selección se procedió a reactivar las cepas en caldo Luria Bertani (LB) (1,0 % (w/v) de peptona bacteriológica; 0,5 % (w/v) de NaCl; 0,5 % (w/v) de extracto de levadura) incubándolas a 60 °C por 24 horas. Luego se procedió a la siembra por puntura en placas con agar base tributirina suplementado con tributirina (1,0 % (v/v) de tributirina; 0,5 % (w/v) de digerido péptico de tejido animal, 0,3 % (w/v) de extracto de levadura; 2,0 % (w/v) de agar; pH 7) (Sharma , Kumbhar , & Tewari, 2014) (Productos adquiridos de Laboratorios Himedia, India). Incubados a 60 °C por 48 horas, las colonias que mostraron la zona de hidrólisis alrededor de ellos fueron recogidas y seleccionadas cualitativamente en base a su diámetro según el diseño experimental antes mencionado. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. (ver anexo 1)

### **2.2.4.2 Actividad cuantitativa**

Para todos los medios de producción posteriormente descritos se usaron inóculos del 5 % de un volumen total de 20 ml en matraces de 100 ml. Inóculos reactivados en caldo LB (pH 7,0) a 60 °C hasta una absorbancia constante de 0,6 que alcanzó a 600 nm en un espectrofotómetro. (Sharma , Kumbhar , & Tewari, 2014) cuyo número de células ascendió a  $5,84 \times 10^9$  cél/ml en un conteo en cámara de Neubauer. (ver anexo 4)

Todos los medios de producción fueron incubados a 60 °C por ser esta la temperatura óptica de las cepas seleccionadas a una agitación constante de 160 rpm en una incubadora Shaker J-NSIO (ver Anexo 5) y se procedió al muestreo cada cierto tiempo según lo especificado a continuación:

#### **a. Elección del método de producción**

##### **Método 1**

El método usado fue descrito por Satyendra *et al* (2005) el cual consiste en peptona (0,5 %), extracto de levadura (0,5 %), NaCl (0,05 %), CaCl<sub>2</sub> (0,005 %), and aceite oliva (1,0 %, emulsificado con goma de acacia 0,5 % w/v), pH 7. Incubado por 24 horas

##### **Método 2**

Descrito por Castro-Ochoa *et al* (2005) que consistió en caldo nutritivo 0,325 % (w/v), CaCl<sub>2</sub> 0,1 % (w/v), aceite de oliva 1 %, and goma de acacia 1 %, pH 6,5 incubado por 24 horas.

##### **Método 3**

Descrito por Murillo *et al* (2012) que consistió en (% w/v): 0,5 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1), MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (0,05), NaNO<sub>3</sub> (0,3), extracto de levadura (0,6), peptona (0,13), almidón (2,0), Tritón-X 100 1 % y aceite de oliva 1 %, pH 7 (regulado con NaOH 0,1M). Incubado por 24 horas.

Todos los medios de producción se procedieron a centrifugar a 10 000 rpm por 10 minutos, separando la biomasa del extracto crudo en hielo, a la cual se le midió la actividad enzimática usando como sustrato el p-nitrofenil palmitato (Sigma-Aldrich).

#### **b. Determinación de la ubicación de la enzima.**

El método de producción usado fue el de Satyendra *et al* (2005). Usando un inóculo del 5 % y centrifugando la biomasa pasada las 24 horas a 10 000 rpm por 10 min. (Como se describe anteriormente), separando de ahí el sobrenadante (extracto crudo) de la biomasa, biomasa que fue lavada con solución buffer fosfato 0,1 M pH 7 tres veces, y posteriormente fue dividida en dos porciones, una de las cuales se guardó en buffer y la otra se le realizó el rompimiento celular según la metodología de Shan, Jin, & Lam (2008) donde se usó técnicas físico (lisis celular por shock térmico) y químicas (SDS).

De cada uno de estas tres porciones (extracto crudo, biomasa, y biomasa lisada) se procedió a medir la actividad enzimática usando el método espectrofotométrico descrito por Satyendra *et al* (2005) con el p-nitrofenil palmitato como sustrato. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **c. Tiempo de mayor producción enzimática**

El método de producción usado fue el de Satyendra *et al* (2005). Con todas las características antes mencionadas. Donde se evaluaron cuatro tiempos diferentes (0; 24; 48 y 72 horas) midiendo la actividad enzimática,

proteínas totales (actividad específica) y número de células (rendimiento).  
Según procedimientos descritos a continuación:

### **c.1 Determinación de la actividad enzimática**

El método usado fue el usado por Lopez, Fraga, & Fleuri, 2011; Castro-Ochoa, Rodriguez-Gomez, Valerio-Alfaro, & Oliart Ros, 2005; Satyendra, Khyodano, Ashutosh, & S., 2005, el cual consiste en la preparación de una solución madre compuesta de dos soluciones: Solución A (0,0018 gr de palmitato de para-nitrofenilo (p-NPP) (Sigma Aldrich) en 1 ml de isopropanol) y solución B (9 ml de buffer Tris HCl 50 mM, pH 7 con 100 µl de tritón x100 y 0,0125 gr de goma de acacia) bien mezclado.

La medición de la actividad enzimática de todo el presente trabajo de investigación se realizó por lectura en un espectrofotómetro a 410 nm y para determinar la absorbancia real se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Abs. real} = (\text{ES}-(\text{BR}+))-(\text{BE}-(\text{BR}-))$$

**ES:** Enzima sustrato

**BE:** Blanco de la enzima

**BR+:** Blanco de reactivo positivo

**BR-:** Blanco de reactivo negativo

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 7.** Método colorimétrico de cuantificación de lipasas usando p-nitrofenol palmitato.

<b>Reactivos</b>	<b>ES (µl)</b>	<b>BE (µl)</b>	<b>BR+ (µl)</b>	<b>BR- (µl)</b>
Agua destilada	0	0	300	300
Extracto enzimático	300	300	0	0
Buffer Tris HCl 50 mM pH7	200	200	200	200
Solución Madre con pNPP	500	0	500	0
Solución Madre sin pNPP	0	500	0	500
<b>Incubar a 60 °C por 20 min.</b>				
<b>Se detiene la reacción sometiéndola a hielo</b>				
<b>Se añadió CaCO<sub>2</sub> 10 mM</b>	300	300	300	300

**ES:** Enzima sustrato

**BE:** Blanco de la enzima

**BR+:** Blanco de reactivo positivo

**BR-:** Blanco de reactivo negativo

**Fuente:** Elaboración propia

Para la determinación de la actividad enzimática se usó la siguiente fórmula (Yapasan, 2008):

$$\frac{\text{units}}{\text{ml}} = \frac{(\text{Abs. real } 410\text{nm/ min}) * (\text{Vol. E.}) * (fd)}{(\text{Coef. Ex.}) * (\text{vol. Enz.})}$$

**Units/ml:** Unidades Internacionales por ml. (UI/ml)

**Vol. E.:** Volumen del ensayo en ml

**Fd.** Factor de dilución

**Coef. Ex.:** Coeficiente de extinción molar del p-nitrophenol a 410 nm  
(micromolar)

**Vol. Enz:** Volumen de la enzima usada en ml

### **c.2 Determinación de la actividad específica (U/mg).**

Esta se determina dividiendo la actividad enzimática de una muestra con sus proteínas totales:

$$\frac{\text{units}}{\text{mg. proteínas}} = \frac{\text{Units/ml de enzima}}{\text{mg proteína/ml de enzima}}$$

### **Cuantificación de las proteínas totales según el método de Bradford**

Este ensayo es un método de análisis espectroscópico que es utilizado para determinar la concentración de proteína total de la muestra determinada mediante la unión del colorante azul brillante de Coomassie G-250 con la arginina, lisina, y residuos de histidina en las muestras de proteína cambiando su color de verde hacia azul a una absorbancia máxima de 595 nm en el espectrofotómetro de UV-visible. A medida que la concentración de contenido de proteína aumenta, el color es cada vez más oscuro. (Yapasan, 2008).

Para determinar la concentración de dichas proteínas se usó la ecuación de la curva de calibración estándar. Para medir se tomó 100 µl de muestra problema y se añadió 1000 µl de reactivo de Bradford dejándolo actuar por un minuto, para el caso del blanco se usó la misma proporción de reactivo reemplazando la muestra con agua destilada, midiendo en el espectrofotómetro a 595 nm. En una cúbica de 1 ml.

### **c.3 Conteo de celular usando la cámara de Neubauer**

Para cada muestra a determinar el número de células se procedió al uso de esta cámara, a la cual se le añadió 10 µl de muestra, y como esta cámara tiene una profundidad de 0,1 mm y el área de cada cuadrado es de 0,0025 cm<sup>3</sup>, procediendo a contar cinco cuadrados (cuatro extremos y uno central), para luego contar el número de células por mililitro (cél/ml) según la siguiente ecuación:

$$\text{concentración de células } \left(\frac{\text{cel}}{\text{ml}}\right) = \frac{\text{total de células contadas} * 250000}{\text{numero de cuadrados contados}}$$

## 2.2.5 Caracterización enzimática

### 2.2.5.1 Determinación de los parámetros cinético enzimáticos

#### a. Efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad de la reacción

Se preparó una batería de 5 tubos, todos por triplicado con 5 concentraciones diferentes de enzima, cada tubo tenía su BE, BR+ y BR- como se describe anteriormente. Y para el caso de ES se aplica según la tabla 8

**Tabla 8.** Efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad de reacción

REACTIVOS	Tubo de ensayos				
	1	2	3	4	5
<b>Solution Madre con pNPP</b>	500	500	500	500	500
<b>Buffer Tris HCl 50 mM pH7</b>	0	100	200	300	400
<b>Extracto enzimático</b>	500	400	300	200	100
<b>Incubar a 60° C por 30 min</b>					
<b>Se detiene la reacción sometiéndolo a hielo</b>					

**Fuente:** Elaboración propia

**b. Efecto del Tiempo de reacción en la aparición del para-nitrofenol**

Se preparó una batería de 6 tubos, todos por triplicado según la tabla 8 con la diferencia de que cada muestreo por triplicado era a los 10; 15; 30; 45; 60 y 75 minutos).

**c. Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción**

Se preparó una batería de 8 tubos de ensayo, todos por triplicado según la tabla 9

**Tabla 9.** Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción.

REACTIVOS	Tubo de ensayos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Sol. de pNPP ( $\mu$ l)	5	10	30	50	70	90	110	130
Isopropanol 98 % ( $\mu$ l)	125	120	100	80	60	40	20	0
Buffer Tris y otros	500	500	500	500	500	500	500	500
Buffer Tris HCl 50 mM pH7	70	70	70	70	70	70	70	70
Extracto enzimático	300	300	300	300	300	300	300	300
<b>Incubar a 60° C por 15 min</b>								
<b>Se detiene la reacción sometiéndolo a hielo</b>								

**Sol. De pNPP:** Solución de 12,93 mM de para nitrofenil palmitato (pNPP) en isopropanol 98 % de pureza.

**Buffer Tris y otros:** Buffer Tris HCl 50 mM pH7 con tritón x100 y goma de acacia.

**Fuente:** Elaboración propia

### Determinación del $K_m$ y $V_{m\acute{a}x}$ . Según representación de Lineweaver Burk

Esta representación está dada por las inversas de velocidad  $1/V$  frente a los inversos de los sustratos  $1/S$ , y mediante una regresión lineal hallando la ecuación de esa recta se determinó la  $V_{m\acute{a}x}$  y el  $K_m$

### **2.2.5.2 Determinación de pH y temperatura optima**

Con los valores encontrados de concentración de la enzima, tiempo de reacción y concentración del sustrato, se procedió a evaluar la actividad variando los pH desde 4 hasta 10 (buffer acetato (pH 4, 5) buffer fosfato (pH 6, 7) y buffer Tris-HCl (pH 8, 9, 10)) a temperaturas que van desde los 40 °C hasta los 90 °C grados con intervalos de 10 °C, usando el diseño experimental antes mencionado.

### **2.2.5.3 Termoestabilidad**

Se procedido a someter diferentes tipos de temperatura (60; 70; 80 y 90) y durante tiempos prolongados que van desde la 0,5; 1; 2; 4 horas dando los resultados en porcentaje de actividad residual teniendo como 100 % la enzima sin exposición a alguna temperatura, cuya actividad enzimática fueron medidas con su temperatura y pH óptimo.

## **2.2.6 Identificación molecular de las dos cepas con mayor actividad enzimática**

Para la identificación de la cepa bacteriana se procedió previamente a caracterizarlas según MacFaddin (2003)

### **2.2.6.1 Caracterización microscópica**

Se hizo mediante la tinción Gram según el método de (Koneman & Allen, 2006) pudiéndose así observar su forma, disposición, carácter tutorial, formación de espora y ubicación de la espora de cada cepa.

### **2.2.6.2 Caracterización macroscópica**

Se reactivó las cepas en medio LB a 60 °C por 24 horas, se procedió a sembrarla por estría en Agar LB incubadoras a 60 °C por 24 horas. Detallando las formas, borde, elevación y color de cada colonia.

### **2.2.6.3 Prueba bioquímica**

#### **Prueba de la catalasa**

Se puso una gran cantidad de colonia de cada una de las cepas en una lámina porta objeto limpio se le añadió unas gotas de agua oxigenada y se consideró catalasa positiva a las colonias que en unos segundos produjeron burbujas y catalasa negativa a las que no produjeron burbujas.

### **2.2.6.4 Pruebas moleculares de las cepas**

Las cepas seleccionadas fueron masificadas en caldo LB, centrifugadas a 6000 rpm y lavadas con solución salina fisiológica tres veces, para luego guardarlas en glicerol 30 % (ver anexo 12) (Satyendra, Khyodano, Ashutosh, & S., 2005), para su posterior identificación las cepas fueron enviadas a la empresa Macrogen Inc. En Seúl. Corea del Sur.

Y para el análisis de la secuenciación del gen ARNr 16 S se usó el programa informático de alineamiento de secuencia de tipo local BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponible en internet a partir de NCBI (National Center for Biotechnology Information).

## 2.2.7 Caracterización físico química de los aceites residuales.

Los diferentes aceites residuales se recolectaron de los principales generadores de nuestra localidad restaurante, chicharronerías, cevicherías, etc. (IPES - Promoción del Desarrollo Sostenible, 2002)

Todas las muestras de aceites residuales recolectadas fueron primero tratadas colocándolas en un recipiente dentro de una estufa a 50 °C; se la mantuvo allí hasta que la muestra alcanzó tal temperatura, luego se las homogenizó hasta que presentaron un aspecto claro y sin sedimento, filtrándolas posteriormente dentro de la estufa a 50 °C. Y para las muestras que presentaron aun turbidez se le procedió a centrifugar por 6000 rpm por 15 minutos (ver anexo 13) Luego se las desecó con 1 a 2 gr de sulfato de sodio anhidro por cada 10 g de aceites residual agitándola enérgicamente y filtrándolas (Normas Tecnicas Ecuatorianas NTE INEN 0040, 1973) en donde se las procedió a caracterizar fisicoquímicamente según las siguientes pruebas:

### 2.2.7.1 Índice de acidez

Se pesó 10 g de muestra y se disolvió en 50 ml de etanol neutro caliente. Se tituló la muestra con NaOH 0,1N usando fenolftaleína como indicador, hasta color débilmente rosa que debe persistir durante 30 segundos. (Valdez Pantoja & Universo Bermudez, 2010)

$$\text{Indice de acidez} = \frac{(\text{volumen de NaOH})ml \times 0.1 \frac{eq}{L} \times \frac{1L}{10^3ml} \times 282 \frac{g}{eq} \times 100}{\text{peso de muestra}(g.)}$$

### 2.2.7.2 Índice de peróxidos

Se pesó 5 g de muestra en un erlenmeyer de 250 ml con tapa esmerilada. Se agregó 30 ml de cloroformo / ácido acético (1:3), 0,5 ml de solución KI saturada, se agitó, se agregaron 30 ml de agua y se tituló el yodo liberado con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 1N hasta decoloración; se agregaron 0,5 ml de solución de almidón y se terminó la titulación cuando desapareció el color azul. Según el Método de Análisis de la AOAC citada por NTE INEN 0277 (1978)

$$I = \frac{vN}{m} \times 1000$$

- I = índice del peróxido en meq de  $\text{O}_2$  por kilogramo del producto.  
V = volumen de la solución de tiosulfato de sodio empleado en la titulación de la muestra, en  $\text{cm}^3$  corregido del blanco.  
N = Normalidad de la solución de tiosulfato de sodio.  
m = Masa de la muestra analizada, en g.

### 2.2.7.3 Índice de saponificación

Se pesó 5 g de aceite en un matraz de 250 ml de capacidad. Se añadió 50 ml de la solución etanólica de KOH y se sometió a reflujo suavemente hasta que se completó la saponificación (unos 30 minutos).

Se enfrió y se tituló el exceso de álcali con HCl 0,5N; se hizo una determinación en blanco. Según el Método de Análisis de la AOAC citada por NTE INEN 0040 (1973)

$$i = \frac{56.1(V_1 - V_2)N}{m}$$

- i = índice de saponificación del producto, en mg/g.
- V<sub>2</sub> = Volumen de solución de ácido clorhídrico o sulfúrico empleado en la titulación de la muestra, en cm<sup>3</sup>.
- V<sub>1</sub> = Volumen de solución de ácido clorhídrico o sulfúrico empleado en la titulación del ensayo en blanco, en cm<sup>3</sup>.
- N = Normalidad de la solución de ácido clorhídrico o sulfúrico
- M = Masa de la muestra analizada, en g.

#### 2.2.7.4 Índice de humedad

Se determinó colocando la muestra de aceites residuales durante 1 hora en la estufa calentada a 103°± 2°C. A continuación, enfriarlos hasta temperatura ambiente en el desecador y pesarlos. Según el Método de Análisis de la AOAC citada por NTE INEN 0039 (1973). Y se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$p = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} \times 100$$

Siendo:

- P = pérdida por calentamiento, en porcentaje de masa.
- m = masa de la cápsula con el termómetro, o masa del cristalizador, en g.
- m<sub>1</sub> = masa de la cápsula con el termómetro y la muestra, o masa del cristalizador con la muestra, antes del calentamiento, en g.

$m_2$  = masa de la cápsula con el termómetro y la muestra, o masa del cristalizador con la muestra, después del calentamiento, en g.

#### **2.2.7.5 Índice de densidad**

Se determinó la densidad según el Método de Análisis de la AOAC citada por NTE INEN 0035 (1973) mediante la siguiente fórmula:

$$d_{25} = \frac{m_2 - m}{m_1 - m}$$

$d_{25}$  = Densidad relativa a 25/25 °C.

$m$  = Masa del picnómetro vacío, en g.

$m_1$  = Masa del picnómetro con agua destilada, en g.

$m_2$  = Masa del picnómetro con muestra, en g.

#### **2.2.7.6 Índice de yodo (método de Wijs)**

Se pesó 0,50 g de aceite en un erlenmeyer de 250 ml con tapa y se agregaron 10 ml de tetracloruro de carbono, 25 ml de solución de Wijs, se agitó suavemente y se dejó reposar en lugar oscuro durante 30 minutos. Se agregaron 10 ml de KI al 15 %, luego se agregó 100 ml de agua destilada. Se tituló lentamente con solución valorada  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1 N hasta casi decoloración de la solución; se añadió unas gotas de almidón al 1 % y se continuó la titulación hasta la desaparición del color azul; se hizo una determinación en blanco. (Valdez Pantoja & Universo Bermudez, 2010)

$$\text{Indice de yodo} = \frac{(\text{titulo blanco} - \text{titulo muestra}) \text{ml eq} \frac{127\text{g}}{\text{L}} \times \frac{\text{L}}{\text{eq}} \times \frac{100}{1000} \text{ml}}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

### **2.2.8 Evaluación de la actividad lipolítica de las enzimas termoestables de las bacterias termófilas seleccionadas sobre los aceites residuales.**

Primero se trató las muestras cómo se describe en la sección 2.2.6 según las Normas Tecnicas Ecuatorianas (1973), para luego proceder con la evaluación de la actividad lipolítica con la lipasa de las bacterias termófilas seleccionadas siguiendo el diseño experimental antes mencionado.

Las lipasas de cada bacteria fueron evaluadas con su pH y temperatura óptima sobre los aceites residuales mediante la cuantificación por titulación descrita a continuación:

#### **Actividad enzimática por titulación**

La actividad enzimática fue calculada según la ecuación: (Kumar & Mahajan, 2011) Donde una unidad de actividad lipolítica se define como la cantidad liberada de 1 micromol de ácido graso por min. (Ver anexo 14).

$$\text{Actividad enzimática} \frac{UI}{ml * min} = \frac{(\text{Volumen de } 0.1M \text{ de NaOH usado (ml)}) * 100 \left(\frac{\mu M}{ml}\right)}{\text{Tiempo de incubación (min)} * \text{Volumen de enzima usada (ml)}}$$

Donde: 100 indica la concentración de 0,1 M NaOH

### **III. RESULTADOS**

#### **3.1. Producción de lipasas termoestable bacterianas**

##### **3.1.1. Actividad cualitativa**

La actividad cualitativa de los 16 cultivos evaluados usando como sustrato el Agar base tributirina suplementado con tributirina (4C) al 1 % cuyo halo formado (Ver. Anexo 2 y 3) indica la hidrolisis de los enlaces esteres de este aceite por la acción de las lipasas liberando los ácidos butíricos del glicerol.

**Tabla 10.** Diámetro de los halos formados de las 16 cepas productoras de lipasas

código de la cepa	Desviación				
	RI	RII	RIII	Promedio	Estándar
<b>CB5</b>	0,7	0,55	0,7	0,65	0,09
<b>CB6</b>	1,75	1,95	1,75	1,82	0,12
<b>CB14</b>	0,75	0,675	0,75	0,73	0,04
<b>CB16</b>	0,65	1,15	0,65	0,82	0,29
<b>FT3</b>	2,8	2,4	2,8	2,67	0,23
<b>FT5</b>	1,35	1,5	1,5	1,45	0,09
<b>FT6</b>	2,4	1,6	2,2	2,07	0,42
<b>FT7</b>	0,7	0,6	0,6	0,63	0,06
<b>FT8</b>	2,4	2,2	1,3	1,97	0,59
<b>GT5</b>	3,2	2,8	3,2	3,07	0,23
<b>BT1</b>	<b>0,1</b>	0,2	0,1	0,13	0,06
<b>BT6</b>	<b>0,1</b>	0,1	0,2	0,13	0,06
<b>BT13</b>	<b>0,2</b>	0,1	0	0,10	0,10
<b>BT16</b>	<b>0,1</b>	0,1	0,15	0,12	0,03
<b>TM8</b>	<b>0,1</b>	0,2	0,15	0,15	0,05
<b>TM10</b>	0,75	1,2	0,75	0,90	0,26

**RI, II, III:** Repeticiones

**DE:** Desviación Estándar.

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 11.** Análisis de varianza de los halos formados por las 16 cepas analizadas.

	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>Inter-grupos</b>	42,182	15	2,812	54,36	0,00
<b>Intra-grupos</b>	1,655	32	0,052		
<b>Total</b>	43,837	47			

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 11 se observa la razón-F, que en este caso es igual a 54,360; es el cociente entre el estimado inter - grupos y el estimado intra-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05; existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre el diamantito del halo de una cepa analizada, con un nivel del 95,0 % de confianza. Es decir que la capacidad de producción de lipasas en la placa frente a esta fuente de carbono (tributirina 4C) difiere de una cepa a otra.

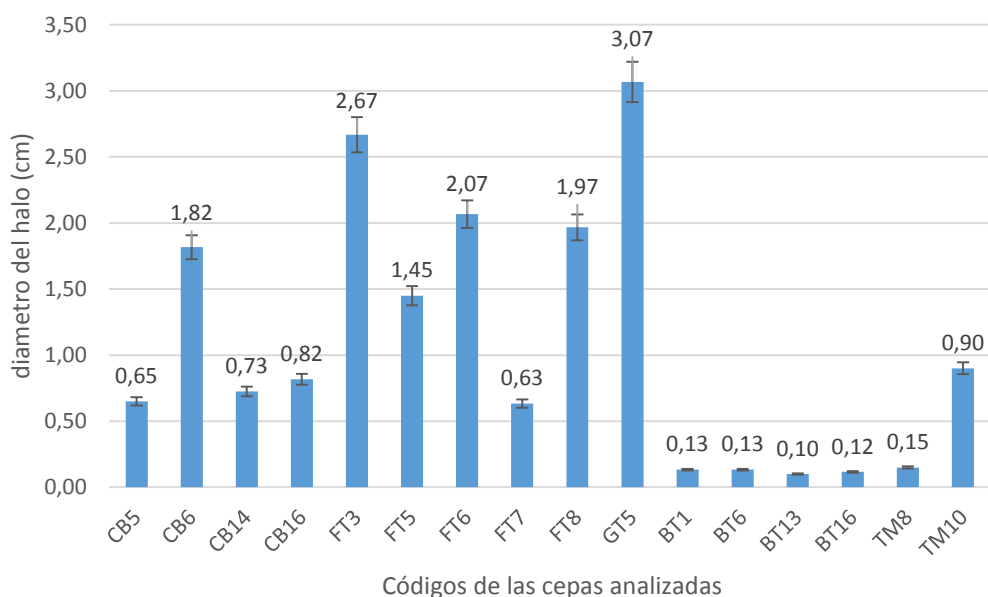
**Tabla 12.** Promedio de significancia de Tukey para los diámetros de la zona de hidrolisis de la lipasa producidas de los cultivos bacterianos

Cepas analizadas	N	Subconjunto para alfa = 0,05						
		1	2	3	4	5	6	7
BT13	3	0,10						
BT16	3	0,11						
BT1	3	0,13	0,13					
BT6	3	0,13	0,13					
TM8	3	0,15	0,15					
FT7	3	0,63	0,63	0,63				
CB5	3	0,65	0,65	0,65				
CB14	3	0,72	0,72	0,72				
CB16	3		0,81	0,81	0,816			
TM10	3			0,90	0,900			
FT5	3				1,45	1,45		
CB6	3					1,84		
FT8	3					1,94		
FT6	3					2,06	2,06	
FT3	3						2,66	2,66
GT5	3							3,06
<b>Sig.</b>		0,10	0,05	0,98	0,09	0,11	0,14	0,72

\*Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 12 se observa 7 grupos homogéneos los cuales difieren entre sí. No existiendo diferencia estadísticamente significativa entre aquellos niveles que comparten la misma columna. Donde los cultivos bacterianos GT5 y FT3 superaron estadísticamente en promedio al resto de las cepas analizadas pero que entre si no presentan diferencia estadísticamente significativa (sig. De 0,72). Y cuyos diámetros de halo de hidrolisis de lipasas fueron 3,06 y 2,6 cm respectivamente siendo estas las cepas seleccionadas para su posterior análisis y caracterización enzimática.



**Figura 6.** Gráfico de medias del diámetro de hidrolisis de lipasas de las 16 cepas evaluadas.

**Fuente** Elaboración propia

### 3.1.2 Actividad cuantitativa

#### 3.1.2.1 Elección del método de producción

**Tabla 13.** Actividad enzimática (UI/ml) de los tres métodos de producción de lipasas

	RI	RII	RIII	Promedio	DE
<b>Método 1</b>	10,54	11,81	11,48	11,28	0,66
<b>Método 2</b>	2,7	2,7	2,5	2,63	0,11
<b>Método 3</b>	3,8	3,2	3,2	3,40	0,34

RI, II, III: Repeticiones

DE: Desviación Estándar.

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 14.** Análisis de varianza de los tres métodos de producción de

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	137,007	2	68,503	344,430	0,000
<b>Intra-grupos</b>	1,193	6	0,199		
<b>Total</b>	138,200	8			

lipasas

Fuente: Elaboración propia

Del análisis de varianza (ANOVA), empleando la prueba F a un nivel de 0,05 de probabilidad, para la variable métodos de producción enzimática, se observa que el valor P de la prueba F es menor que 0,05; por tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la variable métodos de producción enzimática con un nivel de confianza del 95 %. Es decir que en al menos uno de los tres métodos de producción induce notablemente las enzimas lipolítica.

Para determinar cuál es el método más favorable para una mejor producción enzimática se procedió a realizar la prueba de significancia de Tukey al 95 % de confiabilidad.

**Tabla 15.** Promedio de significancia de Tukey para los métodos de producción enzimática de lipasas.

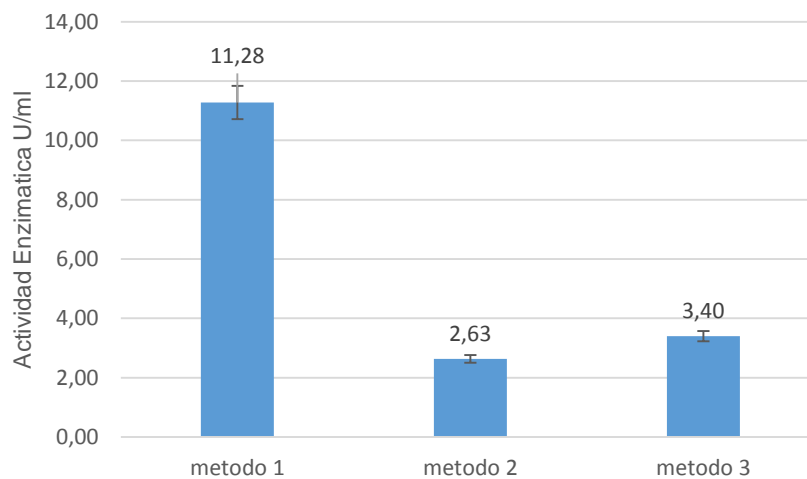
Métodos	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
Método 02	3	2,6333	
Método 03	3	3,4000	
Método 01	3		11,2667
<b>Sig.</b>		0,169	1,000

\*Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 15 se observa 2 grupos homogéneos los cuales difieren entre sí. No existiendo diferencia estadísticamente significativa entre aquellos niveles que comparten la misma columna. De todos los métodos de producción el método 01 usado por Satyendra *et al* (2005) indujo

notablemente la producción con mayor actividad enzimática, con un nivel de confianza del 95 % superando estadísticamente en promedio al resto de los métodos usados cuyos inductores no fueron tan eficaces para una mayor producción lipolítica, este método fue seleccionado para ser el método de producción de las enzimas lipolítica a evaluar.



**Figura 7.** Gráfico de medias de las actividades enzimáticas obtenidas de los tres métodos de producción.

**Fuente** Elaboración propia

### 3.1.2.2 Determinación de la ubicación de la enzima.

#### a. Determinación de la ubicación de la enzima de la GT5

**Tabla 16.** Actividad enzimática (UI/ml) de las diferentes ubicaciones de la enzima de la GT5

	<b>RI</b>	<b>RII</b>	<b>RIII</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>
<b>Extracelular</b>	18,7	12,6	14,2	15,2	3,17
<b>Membrana</b>	5,0	4,6	4,9	4,8	0,21
<b>Intracelular</b>	0,7	0,8	0,5	0,7	0,15

**RI, II, III:** Repeticiones

**DE:** Desviación Estándar.

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 17.** Análisis de varianza de las diferentes ubicaciones de la enzima de la GT5

	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>Inter-grupos</b>	334,389	2	167,194	49,810	0,000
<b>Intra-grupos</b>	20,140	6	3,357		
<b>Total</b>	354,529	8			

**Fuente:** Elaboración propia

Del análisis de varianza (ANOVA), empleando la prueba F a un nivel de 0,05 de probabilidad, para la variable ubicación de la enzima de la GT5, se observa que el valor P de la prueba F es menor que 0,05; por lo tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la variable ubicación de la enzima de la GT5 con un nivel de confianza del 95 %. Es decir que en al menos uno de los lugares de ubicación de la enzima de la GT5 se concentra mayor cantidad de enzima lipolítica.

**Tabla 18.** Promedio de significancia de Tukey para la ubicación de la enzima de la GT5.

Ubicación de la enzima	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
Intracelular	3	0,6667	
Membrana	3	4,8333	
Extracelular	3		15,1667
<b>Sig.</b>		0,071	1,000

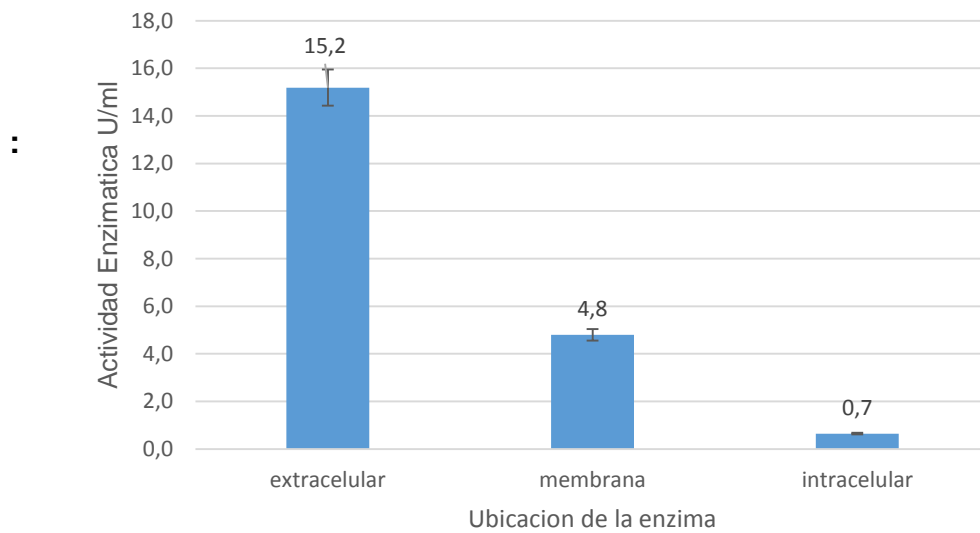
\*Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 18 se observa 2 grupos homogéneos, los cuales difieren entre sí. No existiendo diferencia estadísticamente significativa entre aquellos niveles que comparten la misma columna.

De todos los lugares de ubicación de la enzima, el medio extracelular presentó una mayor actividad enzimática cuyo promedio ascendió a 15 UI/ml, con un nivel de confianza del 95 % superando estadísticamente en

promedio al resto de los lugares donde se la puede encontrar (intracelular y membrana), siendo este escogido para los futuros ensayos de caracterización.



**Figura 8.** Gráfico de medias de las actividades enzimáticas obtenidas de los medios intracelular, extracelular y membrana celular de la cepa GT5

**Fuente** Elaboración propia

**b. Determinación de la ubicación de la enzima de la FT3**

**Tabla 19.** Actividad enzimática (UI/ml) de las diferentes ubicaciones de la enzima de la FT3

	<b>RI</b>	<b>RII</b>	<b>RIII</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>
<b>Extracelular</b>	8,6	6,9	7,5	7,6	0,84
<b>Membrana</b>	2,3	2,5	2,6	2,4	0,17
<b>Intracelular</b>	0,3	0,4	0,3	0,3	0,09

**RI, II, III:** Repeticiones

**DE:** Desviación Estándar.

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 20.** Análisis de varianza de la ubicación de la enzima de la FT 3

	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>Inter-grupos</b>	85,369	2	42,684	166,303	0,000
<b>Intra-grupos</b>	1,540	6	0,257		
<b>Total</b>	86,909	8			

**Fuente:** Elaboración propia

Del análisis de varianza (ANOVA), empleando la prueba F a un nivel de 0,05 de probabilidad, para la variable ubicación de la enzima de la FT3, se observa que el valor P de la prueba F es menor que 0,05; por lo tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la variable ubicación de la enzima de la FT 3 con un nivel de confianza del

95%. Es decir que en al menos uno de los lugares de ubicación de la enzima de la FT 3 se concentra mayor cantidad de enzima lipolítica.

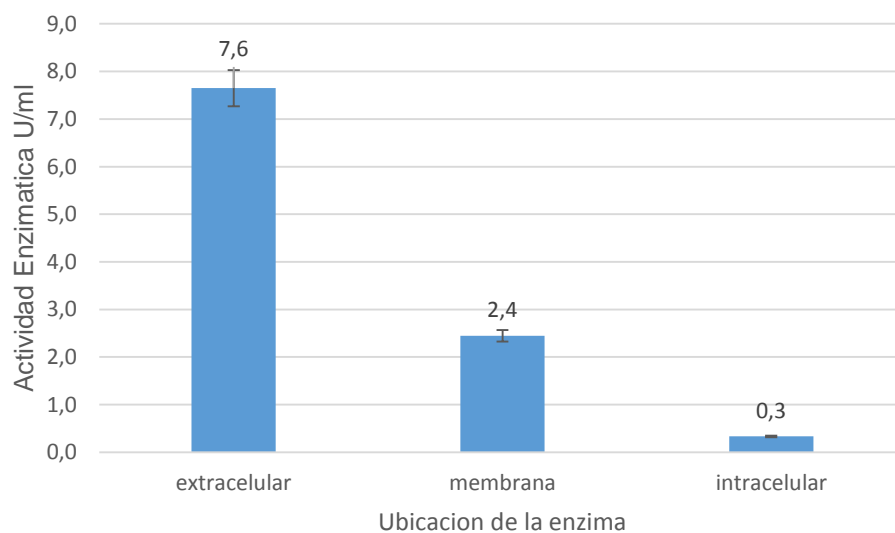
**Tabla 21.** Promedio de significancia de Tukey para la ubicación de la enzima de la FT 3.

Ubicación de la enzima	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
intracelular	3	0,3333		
membrana	3		2,4667	
Extracelular	3			7,6667
<b>Sig.</b>		1,000	1,000	1,000

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 21 se observa 3 grupos homogéneos los cuales difieren entre sí. No existiendo diferencia estadísticamente significativa entre aquellos niveles que comparten la misma columna.

De todos los lugares de ubicación de la enzima el medio extracelular presento una mayor actividad enzimática cuyo promedio ascendió a 7,6 UI/ml, con un nivel de confianza del 95 % superando estadísticamente en promedio al resto de los lugares donde se la puede encontrar (intracelular y membrana), siendo este escogido para los futuros ensayos de caracterización de la cepa FT 3.



**Figura 9.** Gráfico de medias de las actividades enzimáticas obtenidas de los medios intracelular, extracelular y membrana celular de la cepa FT3.

**Fuente** Elaboración propia

### 3.1.2.3 Tiempo de mayor producción enzimática

#### a. Tiempo de mayor producción enzimática de la cepa GT 5

**Tabla 22.** Actividad enzimática (UI/ml) de la producción de la GT5 en diferentes tiempos.

<b>Tiempo (Horas)</b>	<b>RI</b>	<b>RII</b>	<b>RIII</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>	<b>AE</b>
<b>0</b>	0,22	0,2	0,3	0,24	0,08	2,61
<b>24</b>	12,5	14,74	10,41	12,58	0,17	54,27
<b>48</b>	3,6	3,48	3,98	3,73	0,26	20,21
<b>72</b>	1,33	1,19	1,48	1,34	0,15	9,94

**RI, II, III:** Repeticiones

**DE:** Desviación Estándar.

**AE:** Actividad específica UI/mg

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 23.** Análisis de varianza del tiempo de producción enzimática de la GT5.

		<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>MC</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>Actividad enzimática (UI/ml)</b>	<b>Inter-grupos</b>	3992,5	3	1330,861	141,5	0,00
	<b>Intra-grupos</b>	37,601	4	9,400		
	<b>Total</b>	4030,1	7			
<b>Actividad específica (UI/mg)</b>	<b>Inter-grupos</b>	359,64	3	119,883	82,36	0,00
	<b>Intra-grupos</b>	5,822	4	1,455		
	<b>Total</b>	365,47	7			

SC= Suma de cuadrados

MC= Media cuadrática

**Fuente:** Elaboración propia

Del análisis de varianza (ANOVA), empleando la prueba F a un nivel de 0,05 de probabilidad, para la variable tiempo de producción enzimática de la GT5 y cuyas variables respuestas son la actividad enzimática y la actividad específica, se observa que el valor P de la prueba F en ambos casos es menor que 0,05; por lo tanto existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la variable tiempo de producción enzimática de la GT5 tanto para la actividad enzimática como para la actividad específica, con un nivel de confianza del 95 %. Es decir que en al menos uno de los tiempos (0 a 72 horas de producción) se concentra una mayor cantidad de enzima lipolítica tanto para su actividad enzimática como actividad específica.

**Tabla 24.** Promedio de significancia de Tukey para actividad enzimática (UI/ml) del diferente tiempo de producción de la GT5

Tiempo (horas)	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
0,00	2	0,2450	
72,00	2	1,3450	
48,00	2	3,7300	
24,00	2		12,58
<b>Sig.</b>		0,162	1,00

\*Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 24 se observa 2 grupos homogéneos los cuales difieren entre sí. No existiendo diferencia estadísticamente significativa entre aquellos niveles que comparten la misma columna. De todas las horas de producción solo a las 24 horas se obtuvo una mayor actividad enzimática cuyo promedio ascendió a 12,58 UI/ml, con un nivel de confianza del 95 % superando estadísticamente en promedio al resto de las horas evaluadas según actividad enzimática.

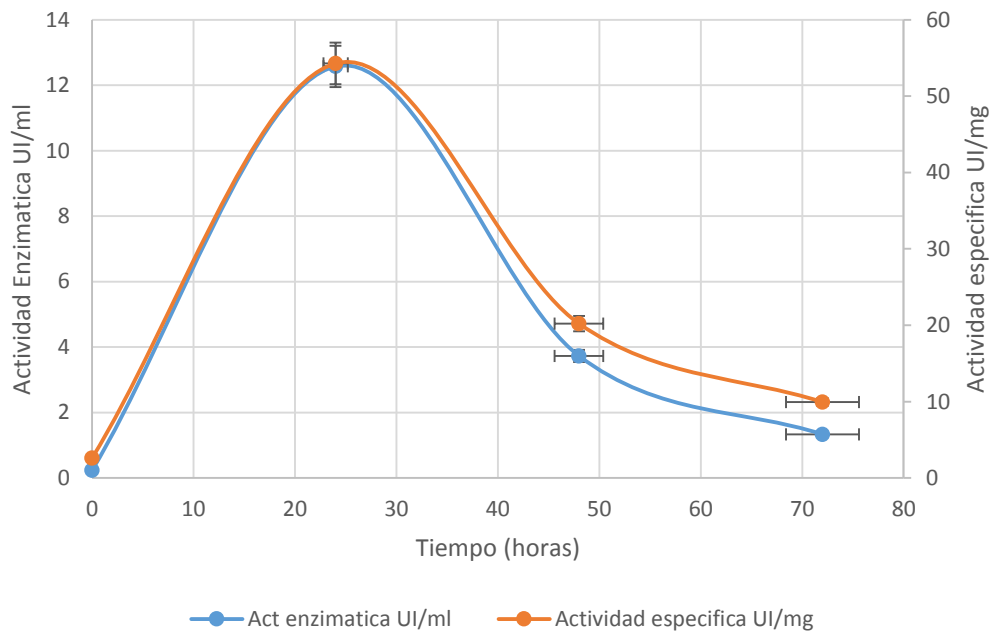
**Tabla 25.** Promedio de significancia de Tukey para Actividad específica (UI/mg) de los diferentes tiempos de producción de la GT5

Tiempo (horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
0,00	2	2,6140	
72,00	2	9,9400	
48,00	2	20,2100	
24,00	2		54,270
<b>Sig.</b>		0,057	1,000

\*Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 25 se observa 2 grupos homogéneos los cuales difieren entre sí. No existiendo diferencia estadísticamente significativa entre aquellos niveles que comparten la misma columna. De todas las horas de producción solo a las 24 horas se obtuvo una mayor actividad específica cuyo promedio ascendió a 54,270 UI/mg, con un nivel de confianza del 95 % superando estadísticamente en promedio al resto de las horas evaluadas según actividad específica. Por tal existe una mayor producción de enzima con una elevada actividad específica a las 24 horas, siendo este tiempo escogido para futuras producciones de caracterización enzimática de la cepa GT 5.



**Figura 10.** Gráfico de medias de doble entrada de las actividades enzimáticas y específicas versus el tiempo de producción de lipasas de la cepa GT 5

**Fuente** Elaboración propia

**b. Tiempo de mayor producción enzimática  
FT3**

**Tabla 26.** Actividad enzimática (UI/ml) de la producción de la FT3 en diferentes tiempos.

<b>Tiempo (Horas)</b>	<b>RI</b>	<b>RII</b>	<b>RIII</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE</b>	<b>AE</b>
<b>0</b>	0,08	0,56	0,08	0,2	0,28	3,20
<b>24</b>	8,56	6,89	6,89	7,4	0,96	51,36
<b>48</b>	2,11	2,63	2,63	2,5	0,30	19,40
<b>72</b>	1,19	1,52	1,19	1,3	0,19	12,74

**RI, II, III:** Repeticiones

**DE:** Desviación Estándar.

**AE:** Actividad específica UI/mg

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 27.** Análisis de varianza del tiempo de producción enzimática de la FT3

		SC	gl	MC	F	Sig.
<b>Actividad enzimática (UI/ml)</b>	<b>Inter-grupos</b>	65,19	3	21,72	51,15	0,00
	<b>Intra-grupos</b>	1,69	4	0,42		
	<b>Total</b>	66,89	7			
<b>Actividad específica (UI/mg)</b>	<b>Inter-grupos</b>	4244,84	3	1414,94	9,28	0,02
	<b>Intra-grupos</b>	609,51	4	152,37		
	<b>Total</b>	4854,35	7			

SC= Suma de cuadrados

MC= Media cuadrática

**Fuente:** Elaboración propia

Del análisis de varianza (ANOVA), empleando la prueba F a un nivel de 0,05 de probabilidad, para la variable tiempo de producción enzimática de la FT 3 y cuyas variables respuestas son la actividad enzimática y la actividad específica, se observa que el valor P de la prueba F en ambos casos es menor que 0,05; por lo tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la variable tiempo de producción enzimática de la GT5 tanto para la actividad enzimática como para la actividad específica, con un nivel de confianza del 95 %. Es decir que en al menos uno de los tiempos (0 a 72 horas de producción) se concentra una mayor cantidad de enzima lipolítica tanto para su actividad enzimática como actividad específica.

**Tabla 28.** Promedio de significancia de Tukey para Actividad enzimática (UI/ml) de los diferentes tiempos de producción de la FT 3

Tiempo (horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
0,00	3	0,2400		
72,00	3	1,3000	1,3000	
48,00	3		2,4567	
24,00	3			7,4467
<b>Sig.</b>		0,146	0,107	1,000

**Fuente:** Elaboración propia

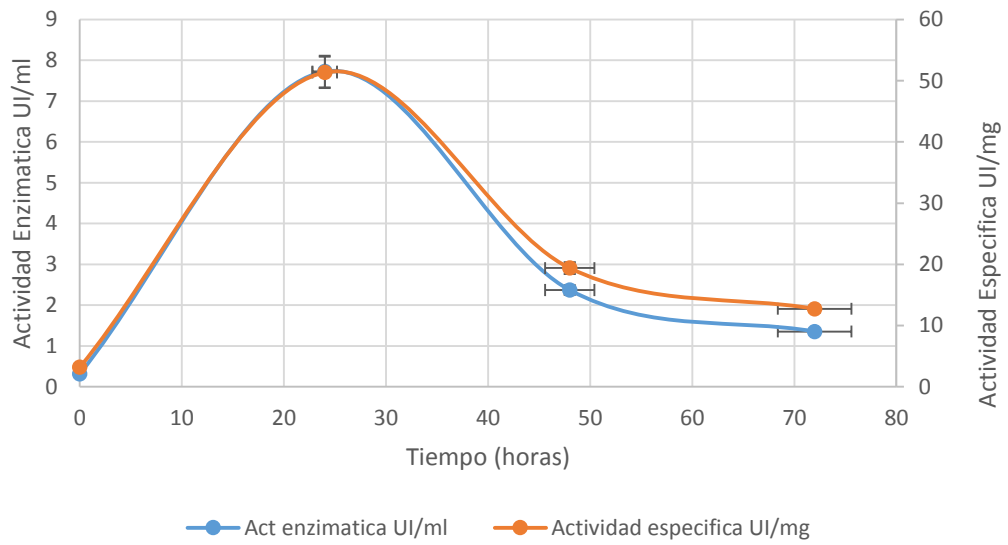
En la tabla 28 se observa 2 grupos homogéneos los cuales difieren entre sí. No existiendo diferencia estadísticamente significativa entre aquellos niveles que comparten la misma columna. De todas las horas de producción solo a las 24 horas se obtuvo una mayor actividad enzimática cuyo promedio ascendió a 7,40 UI/ml, con un nivel de confianza del 95 % superando estadísticamente en promedio al resto de las horas evaluadas según actividad enzimática.

**Tabla 29.** Promedio de significancia de Tukey para Actividad específica (UI/mg) de los diferentes tiempos de producción de la FT 3

Tiempo (horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
0,00	2	3,20	
72,00	2	12,74,5	
48,00	2	19,400	
24,00	2		51,360
<b>Sig.</b>		0,272	0,176

\*Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

**Fuente:** Elaboración propia



**Figura 11.** Gráfico de medias de doble entrada de las actividades enzimáticas y específicas versus el tiempo de producción de lipasas de la cepa FT 3.

**Fuente** Elaboración propia

## 3.2. Caracterización Enzimática

### 3.2.1. Caracterización enzimática de la cepa GT5

#### 3.2.1.1. Determinación de los parámetros cinéticos enzimáticos

##### a. Efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad del producto formado.

**Tabla 30.** Efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad del producto formado.

Concentración de enzima	VPF				DE
	RI	RII	RIII	Promedio	
500	1,86	1,9	2,29	2,02	0,24
400	1,99	1,89	2,05	1,98	0,08
300	1,75	1,80	1,70	1,75	0,05
200	1,10	1,04	0,98	1,04	0,06
100	0,44	0,50	0,38	0,44	0,06

**VPF:** Velocidad de producto formado ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )

**RI, II, III:** Repeticiones

**DE:** Desviación Estándar.

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 31.** Análisis de varianza del efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad del producto formado

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>Modelo</b>	1,85064	2	0,925321	86,58	0,0114
<b>Residual</b>	0,021374	2	0,010687		
<b>Total (Corr.)</b>	1,87202	4			

R-cuadrada = 98,8582 %

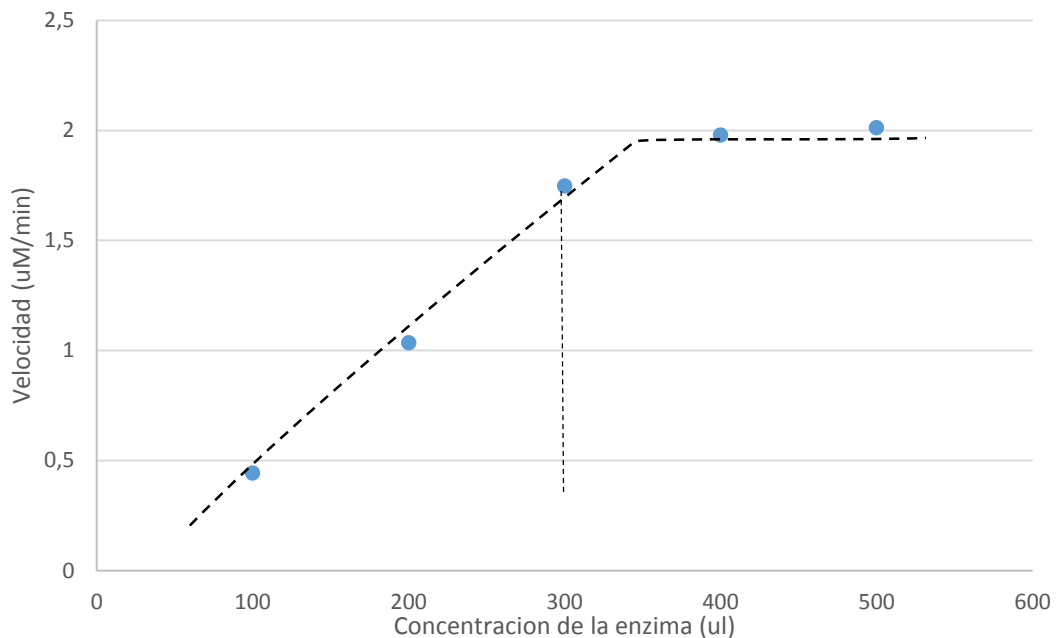
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 97,7164 %

Error estándar del est. = 0,10338

**Fuente:** Elaboración propia

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre Velocidad del producto formado ( $\mu\text{M}/\text{min}$ ) y Concentración de la Enzima ( $\mu\text{l}$ ) con un nivel de confianza del 95 %. La salida muestra los resultados de ajustar un modelo polinomial de segundo orden para describir la relación entre velocidad del producto formado ( $\mu\text{M}/\text{min}$ ) y Concentración de la Enzima ( $\mu\text{l}$ ).

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo así ajustado explica 98,8582% de la variabilidad en Velocidad ( $\mu\text{M}/\text{min}$ ). El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más apropiada para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 97,7164 %.



**Figura 12.** Efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad de producto formado

**Fuente:** Elaboración propia

En la fig. 14 el incremento de la concentración de la enzima hasta 300  $\mu\text{l}$  hace que haya una velocidad constante de  $\mu\text{M}$  de pNP formado por minuto, pero al incrementar la concentración de la enzima a valores superiores a este, hace que la velocidad disminuya, siendo la posible causa la disminución de la concentración de sustrato, por tanto, la concentración enzimática que se consideró más adecuada fue esta (300  $\mu\text{l}$ ) para posteriores procesos de caracterización.

**b. Efecto del tiempo de reacción en la aparición del producto (p-nitrofenol) cinética de la reacción**

**Tabla 32.** Efecto del tiempo de reacción en la aparición del producto (p-nitrofenol) cinética de la reacción

Tiempo (min)	Concentración del producto pNP ( $\mu\text{M}$ )				DE
	RI	RII	RIII	Promedio	
10	31,00	32,22	31,60	31,61	0,61
15	51,43	52,00	51,00	51,47	0,50
30	99,00	98,56	98,00	98,56	0,50
45	143,10	143,00	142,10	142,72	0,55
60	176,33	176,01	176,67	176,33	0,33
75	197,00	194,70	196,00	195,92	1,15
120	229,80	228,00	228,97	228,97	0,90

**RI, II, III:** Repeticiones

**DE:** Desviación Estándar.

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 33.** Análisis de varianza del tiempo sobre la concentración de producto formado (pNP)

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>Modelo</b>	33225,7	2	16612,8	2710,8	0,000
<b>Residual</b>	24,5134	4	6,12834		
<b>Total (Corr.)</b>	33250,2	6			

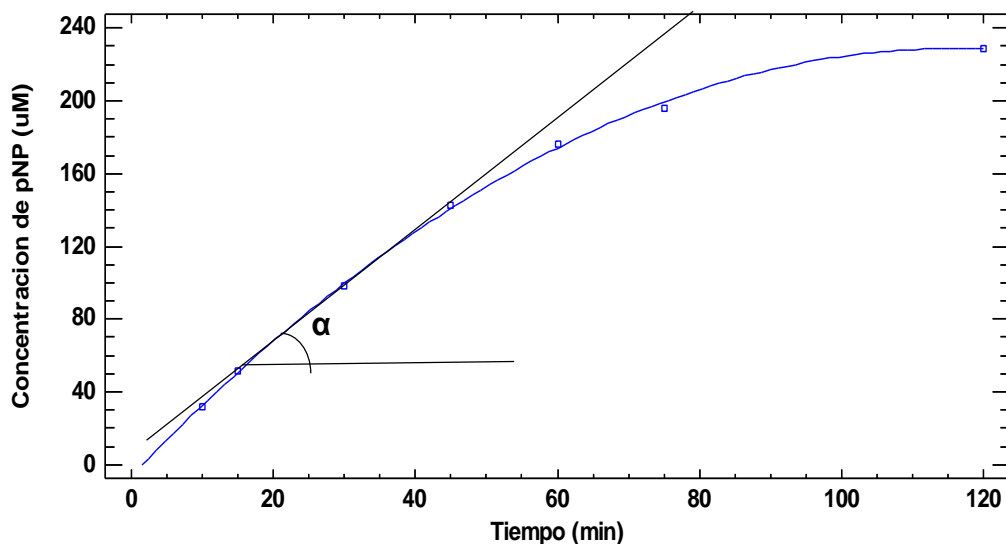
R-cuadrada = 99,92 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 99,8894 por ciento

Error estándar del est. = 2,47555

**Fuente:** Elaboración propia

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre concentración de producto formado ( $\mu\text{M}$ ) y Tiempo (min) con un nivel de confianza del 95 %. La salida muestra los resultados de ajustar un modelo polinomial de segundo orden para describir la relación entre concentración de producto formado ( $\mu\text{M}$ ) y Tiempo (min). El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo así ajustado explica 99,92 % de la variabilidad en concentración de producto formado ( $\mu\text{M}$ ). El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más apropiada para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 99,88 %.



**Figura 13.** Efecto del tiempo sobre la concentración de producto formado (pNP)

**Fuente** Elaboración propia

En la figura 15 se observa el modelo ajustado a un modelo polinomial, es decir que a medida que la reacción transcurre, la velocidad de acumulación del producto va disminuyendo porque se va consumiendo el sustrato de la reacción, Para evitar esta complicación se procede a medir la velocidad inicial de la reacción ( $v_0$ ). La cual es igual a la pendiente de la curva de avance a tiempo cero.

De esta forma, la medida de  $V_0$  se realiza antes de que se consuma el 10% del total del sustrato (Gonzales Mañas, 2012), de forma que pueda considerarse la concentración del sustrato [S] como esencialmente constante a lo largo del experimento. Además, en estas condiciones no es necesario considerar la reacción inversa, ya que la cantidad de producto

formada es tan pequeña que la reacción inversa apenas ocurre. De esta forma se simplifican enormemente las ecuaciones de velocidad. Siendo la ecuación de la recta de los 60 primeros minutos la siguiente:

$$\text{Concentración de pNP } (\mu\text{M}) = 7,1883 + 2,904 \cdot \text{Tiempo (min)}$$

Siendo la velocidad inicial (cinética de la reacción) ( $V_0$ )

$$V_0 = \text{tg } \alpha \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

$$Y_2 = 169,9 \mu\text{M}$$

$$Y_1 = 66,5 \mu\text{M}$$

$$X_2 = 60 \text{ min}$$

$$X_1 = 20 \text{ min}$$

$$V_0 = \text{tg } \alpha \left( \frac{169,9 \mu\text{M} - 66,5 \mu\text{M}}{60 \text{ min} - 20 \text{ min}} \right)$$

$$V_0 = 2,36 \mu\text{M}/\text{min}$$

Como ya se tiene la velocidad inicial y esta es constante en los primeros 60 minutos, el valor tomado para medir la actividad es 15 min para los posteriores ensayos de caracterización.

**c. Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción.**

**Tabla 34.** Análisis de varianza de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción.

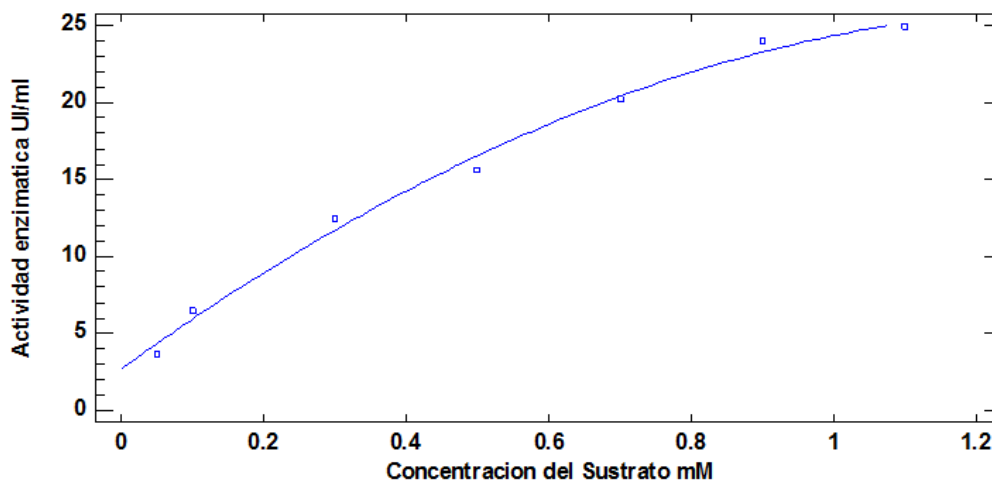
[S]	V				DE	1/[S]	1/V
	RI	RII	RIII	Promedio			
<b>0,05</b>	3,74	3,00	4,48	3,74	0,74	20,0	0,3
<b>0,1</b>	6,10	6,48	6,86	6,48	0,38	10,0	0,2
<b>0,3</b>	12,00	12,50	13,00	12,50	0,50	3,3	0,1
<b>0,5</b>	16,05	15,10	15,56	15,56	0,48	2,0	0,1
<b>0,7</b>	20,24	20,00	20,48	20,24	0,24	1,4	0,0
<b>0,9</b>	24,50	23,50	24,02	24,02	0,50	1,1	0,0
<b>1,1</b>	24,85	24,00	25,60	24,85	0,80	0,9	0,0

**[S]:** Concentración del sustrato pNPP mM

**V:** Velocidad (actividad enzimática) UI/ml

**DE:** Desviación estándar

**Fuente:** Elaboración propia



**Figura 64.** Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción.

**Fuente:** Elaboración propia

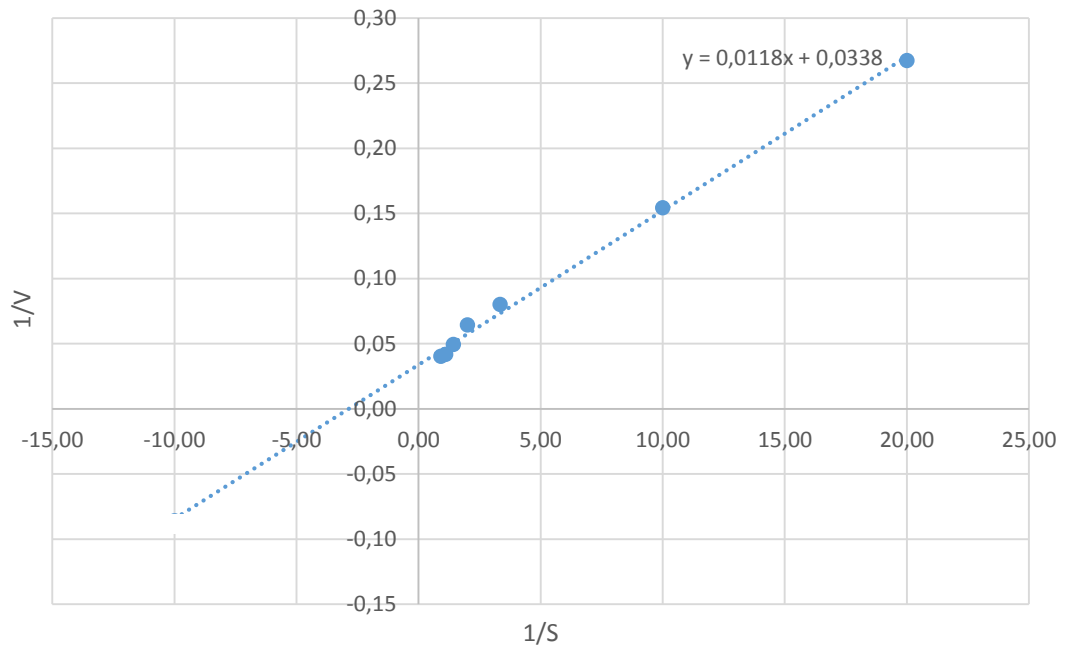
La salida muestra los resultados de ajustar un modelo polinomial de segundo orden para describir la relación entre actividad enzimática (UI/ml) y Concentración del Sustrato (mM). La ecuación del modelo ajustado es

$$V = 2,68345 + 33,7942 * [S] - 12,1338 * [S]^2$$

V = Actividad enzimática (UI/ml)

[S] = Concentración del Sustrato (mM).

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo así ajustado explica 99,305 % de la variabilidad en Actividad enzimática UI/ml. El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más apropiada para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 98,95 %.



**Figura 15.** Modelo ajustado de la regresión lineal de la inversa de la concentración de sustrato vs la inversa de la actividad enzimática. (Representación de Lineweaver Burk)

**Fuente:** Elaboración propia

En la figura 17 muestra los resultados de ajustar un modelo lineal para describir la relación entre  $1/V$  y  $1/S$ . La ecuación del modelo ajustado es

$$1/V = 0,0337592 + 0,0118813 \cdot 1/S$$

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99,7172 % de la variabilidad en  $1/V$ . El coeficiente de correlación es igual a 0,998585, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables

De la ecuación se obtuvo que la  $V_{m\acute{a}x}$  estimada de la lipasa es  $30,53 \text{ Uml}^{-1} \text{ min}^{-1}$  y le  $K_m$  estimado para la lipasa es  $0,36 \text{ mM}$

### 3.2.1.2 Determinación de pH y temperatura optima

**Tabla 35.** Análisis de varianza para la actividad enzimática de lipasas de la cepa GT 5.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>A:ph</b>	274,186	1	274,186	45,91	0,0000
<b>B:temperatura</b>	0,1176	1	0,1176	0,02	0,8912
<b>AA</b>	67,7192	1	67,7192	11,34	0,9912
<b>AB</b>	0,0448148	1	0,0448148	0,01	0,9327
<b>BB</b>	102,707	1	102,707	17,20	0,8912
<b>bloques</b>	22,7213	2	11,3606	1,90	0,1995
<b>Error total</b>	59,7286	10	5,97286		
<b>Total (corr.)</b>	699,511	17			

R-cuadrada = 99,3 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 98,9 porciento

Error estándar del est. = 0,84

**Fuente:** Elaboración propia

Para la optimización de respuesta esperada del rendimiento de la actividad enzimática de la cepa GT 5, se realizó un análisis de regresión, donde se excluyó el efecto de la temperatura y de la interacción de los

factores pH, temperatura por no presentar diferencia estadística significativa, así como en el caso del número de bloques el cual también fue ignorado.

Mientras que los efectos de pH, indican variabilidad significativa con un nivel de confianza de 95 %, siendo este el único, indicando que existen al menos un pH en la cual la enzima presenta mejor rendimiento y que al no presentar diferencia significativa respecto a la temperatura, eso nos indica que no existe diferencia entre la actividad enzimática respecto a una temperatura y otra.

Del estadístico R-cuadrada corregido según el número de casos evaluados, se observó que los factores incluidos en el modelo (pH y temperatura) están explicando el 98,95 % de la variabilidad del rendimiento.

Se obtuvo la siguiente función de respuesta (ecuación de regresión) a utilizar que se ha ajustado a los datos para maximizar los factores de pH y temperatura

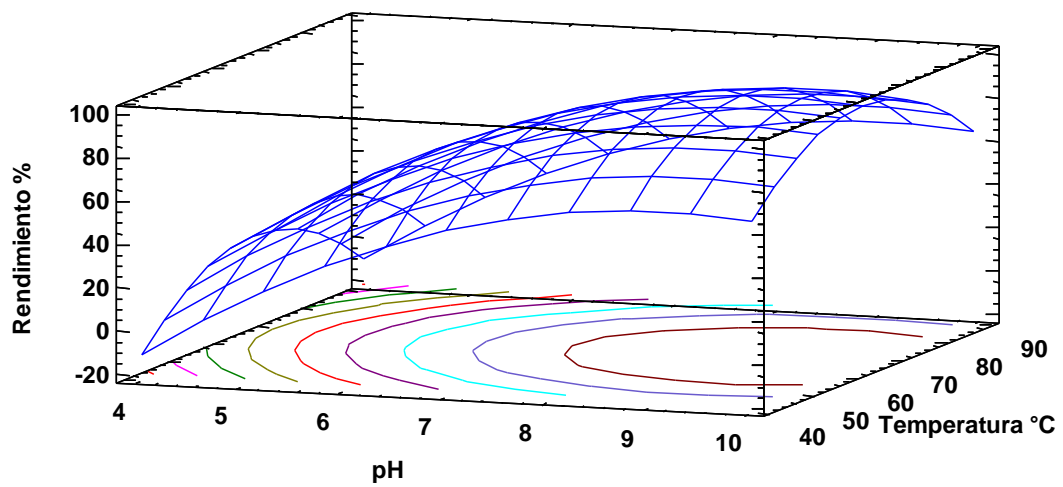
$$R = -66,741 + 9,749 \cdot \text{pH} + 1,234 \cdot T - 0,5279 \cdot \text{pH}^2 - 0,0016 \cdot \text{pH} \cdot T - 0,0096 \cdot T^2$$

R = Rendimiento %

T = temperatura

De la ecuación anterior se obtuvo el rendimiento óptimo para el factor pH 9,13 en el cual a conformación de la enzima es la más adecuada para la actividad catalítica y la temperatura de 65,11 °C para el factor de

temperatura, dando un rendimiento óptimo del 100 % que asciende a 21,6 UI/ml, tal como se muestra en la fig. 18 (figura de optimización enzimática)



**Figura 76.** Superficie de respuesta estimada de la optimización del rendimiento de la actividad enzimática de lipasas de la cepa GT5

**Fuente:** Elaboración propia

### 3.2.1.3 Termoestabilidad

**Tabla 36.** Análisis de varianza para la actividad residual de la termoestabilidad de las lipasas de la cepa GT 5

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GI</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón- F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>A:ph</b>	1778,68	1	1778,68	7,38	0,0217
<b>B:temperatura</b>	27146,3	1	27146,3	112,70	0,0000
<b>AA</b>	2644,64	1	2644,64	10,98	0,0578
<b>AB</b>	760,028	1	760,028	3,16	0,1061
<b>BB</b>	10307,7	1	10307,7	42,79	0,0501
<b>bloques</b>	93,1941	2	46,597	0,19	0,8271
<b>Error total</b>	2408,64	10	240,864		
<b>Total (corr.)</b>	56618,5	17			

R-cuadrada = 95,74 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 92,76 porciento

Error estándar del est. = 15,51

**Fuente:** Elaboración propia

Para la optimización de respuesta esperada de la actividad residual de la cepa GT 5 en base a su termoestabilidad, se realizó un análisis de regresión, donde se excluyó la interacción de los factores tiempo y temperatura por no presentar diferencia estadística significativa, así como en el caso del número de bloques el cual también fue ignorado.

Mientras que los efectos de tiempo y temperatura indican variabilidad significativa con un nivel de confianza de 95 %, siendo las temperaturas menores (60 a 70 °C) las que presentaron más significancia dando interpretar que estas temperaturas influyen incrementando la actividad residual de la enzima, siendo este fenómeno similar al que pasa con la influencia del tiempo que incrementa la actividad en menos tiempo de exposición.

Del estadístico R-cuadrada corregido según el número de casos evaluados, se observó que los factores incluidos en el modelo (tiempo y temperatura) están explicando el 92,76 % de la variabilidad de la actividad residual.

Se obtuvo la siguiente función de respuesta (ecuación de regresión) a utilizar que se ha ajustado a los datos para maximizar los factores de tiempo y temperatura

$$AR = -908,04 - 0,19*t + 33,22*T - 0,0026*t^2 + 0,010*t*T - 0,260*T^2$$

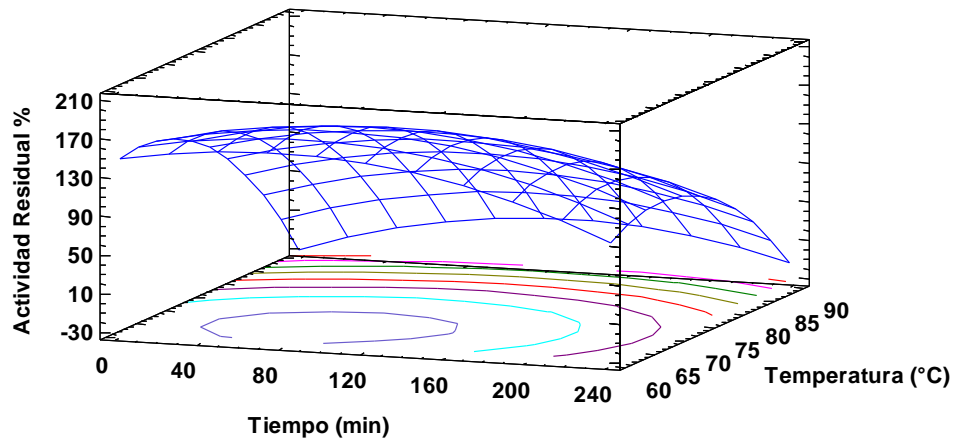
AR = Actividad residual %

t = tiempo (min)

T = temperatura (°C)

De la ecuación anterior se obtuvo el valor máximo de actividad residual a 86,6 minutos de exposición para el factor tiempo a una temperatura de 65,45 °C para el factor de temperatura, dando un máximo de 171,038 % de actividad residual de lipasas, tal como se muestra en la fig. 19, es decir que las lipasas de la cepa GT 5 incrementan en un 171,038

% su actividad enzimática residual cuando es sometida a 65,45 °C por un periodo máximo de 86,6 minutos.



**Figura 87.** Superficie de respuesta estimada del tiempo de exposición de la enzima sobre diferentes temperaturas de las lipasas de la cepa GT 5

**Fuente:** Elaboración propia

### 3.2.2 Caracterización enzimática de la cepa FT3

#### 3.2.2.1 Determinación de los parámetros cinéticos enzimáticos

##### a. Efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad del producto formado.

**Tabla 37.** Efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad del producto formado.

Concentración de enzima	VPF				
	RI	RII	RIII	Promedio	DE
500	1,50	1,42	1,46	1,46	0,04
400	1,46	1,40	1,42	1,42	0,03
300	1,15	1,23	1,19	1,19	0,04
200	0,50	0,46	0,48	0,48	0,02
100	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01

VPF: Velocidad de producto formado ( $\mu\text{M} / \text{min}$ )

RI, II, III: Repeticiones

DE: Desviación Estándar.

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 38.** Análisis de varianza del efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad del producto formado.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón- F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>Modelo</b>	1,62244	2	0,81122	49,12	0,0200
<b>Residual</b>	0,03303	2	0,0165158		
<b>Total (Corr.)</b>	1,65547	4			

R-cuadrada = 98,89 por ciento

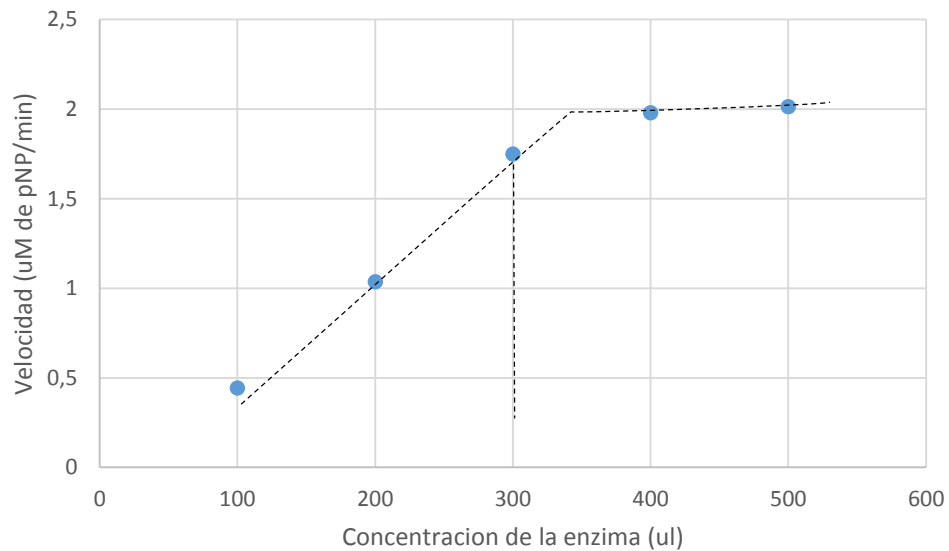
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 97,72 por ciento

Error estándar del est. = 0,11

**Fuente:** Elaboración propia

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05; existe una relación estadísticamente significativa entre Velocidad del producto formado ( $\mu\text{M}/\text{min}$ ) y Concentración de la Enzima ( $\mu\text{l}$ ) con un nivel de confianza del 95 %. La salida muestra los resultados de ajustar un modelo polinomial de segundo orden para describir la relación entre velocidad del producto formado ( $\mu\text{M} / \text{min}$ ) y Concentración de la Enzima ( $\mu\text{l}$ ).

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo así ajustado explica 98,86 % de la variabilidad en Velocidad ( $\mu\text{M} / \text{min}$ ). El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más apropiada para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 97,72 %.



**Figura 98.** Efecto de la concentración de la enzima sobre la velocidad de producto formado.

**Fuente** Elaboración propia

En la fig. 20 El incremento de la concentración de la enzima hasta 300  $\mu\text{l}$  hace que haya una velocidad constante de  $\mu\text{M}$  de pNP formado por minuto, pero al incrementar la concentración de la enzima a valores superiores a este, hace que la velocidad disminuya, siendo la posible causa la disminución de la concentración sustrato, por tanto, la concentración que se consideró más adecuada fue esta (300  $\mu\text{l}$ ) para posteriores procesos de caracterización.

**b. Efecto del Tiempo de reacción en la aparición del producto (p-nitrofenol) cinética de la reacción de la FT3**

**Tabla 39.** Efecto del tiempo de reacción en la aparición del producto (p-nitrofenol) cinética de la reacción

Tiempo (min)	concentración del producto pNP ( $\mu\text{M}$ )				DE
	RI	RII	RIII	Promedio	
15	67,50	68,00	67,00	67,50	0,50
30	89,00	92,00	90,00	90,33	1,53
45	128,00	129,70	130,00	129,23	1,08
60	159,00	158,70	159,30	159,00	0,30
90	184,10	181,40	184,50	183,33	1,69
120	190,00	192,10	189,00	190,37	1,58

RI, II, III: Repeticiones

DE: Desviación Estándar.

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 40.** Análisis de varianza del tiempo sobre la concentración de producto formado (pNP)

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>Modelo</b>	12418,4	2	6209,22	145,23	0,0010
<b>Residual</b>	128,266	3	42,7553		
<b>Total (Corr.)</b>	12546,7	5			

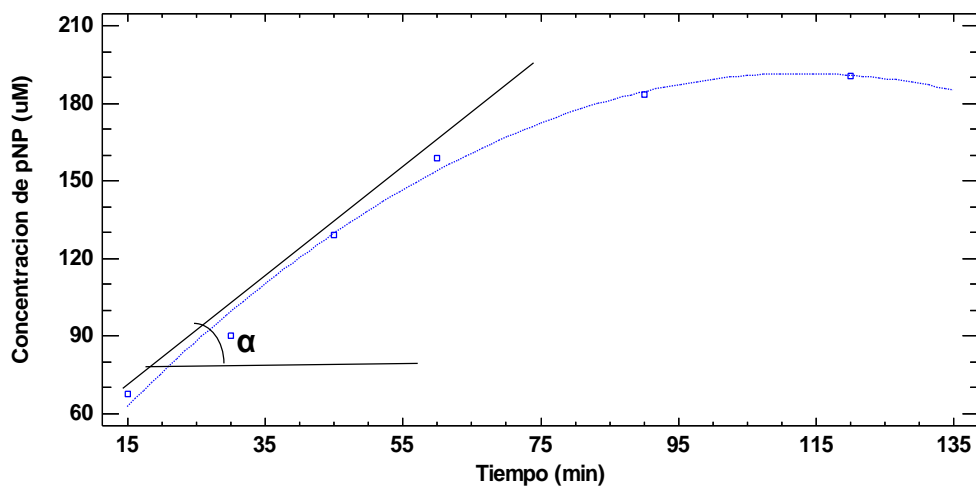
R-cuadrada = 98,9 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 98,29 por ciento

Error estándar del est. = 6,56

**Fuente:** Elaboración propia

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre concentración de producto formado ( $\mu\text{M}$ ) y Tiempo (min) con un nivel de confianza del 95 %. La salida muestra los resultados de ajustar un modelo polinomial de segundo orden para describir la relación entre concentración de producto formado ( $\mu\text{M}$ ) y Tiempo (min). El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo así ajustado explica 98,9 % de la variabilidad en concentración de pNPP ( $\mu\text{M}$ ). El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más apropiada para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 98,29 %.



**Figura 19.** Efecto del tiempo sobre la concentración de producto formado (pNP)

**Fuente** Elaboración propia

En la figura 21 se observa el modelo ajustado a un modelo polinomial, es decir que a medida que la reacción transcurre, la velocidad de acumulación del producto va disminuyendo porque se va consumiendo el sustrato de la reacción, Para evitar esta complicación se procede a medir la velocidad inicial de la reacción ( $V_0$ ). La cual es igual a la pendiente de la curva de avance a tiempo cero.

De esta forma, la medida de  $V_0$  se realiza antes de que se consuma el 10 % del total del sustrato (Gonzales Mañas, 2012), de forma que pueda considerarse la  $[S]$  como esencialmente constante a lo largo del experimento. Además, en estas condiciones no es necesario considerar la reacción inversa, ya que la cantidad de producto formada es tan pequeña que la reacción inversa apenas ocurre. De esta forma se simplifican

enormemente las ecuaciones de velocidad. Siendo la ecuación de la recta de los 60 primeros minutos la siguiente:

$$\text{Concentración de pNPP } (\mu\text{M}) = 12.9068 + 3.29457 \cdot \text{Tiempo (min)}$$

Siendo la velocidad inicial ( $V_0$ )

$$V_0 = \text{tg } \alpha \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

$$Y_2 = 127,17 \mu\text{M}$$

$$Y_1 = 85,39 \mu\text{M}$$

$$X_2 = 45 \text{ min}$$

$$X_1 = 25 \text{ min}$$

$$V_0 = \text{tg } \alpha \left( \frac{127,17 \text{ uM} - 85,39 \text{ uM}}{45 \text{ min} - 25 \text{ min}} \right)$$

$$V_0 = 2,08 \text{ uM/min}$$

Como ya se tiene la velocidad inicial y esta es constante en los primeros 60 minutos, el valor tomado para medir la actividad es 15 min para los posteriores ensayos de caracterización.

**c. Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción.**

**Tabla 41.** Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción.

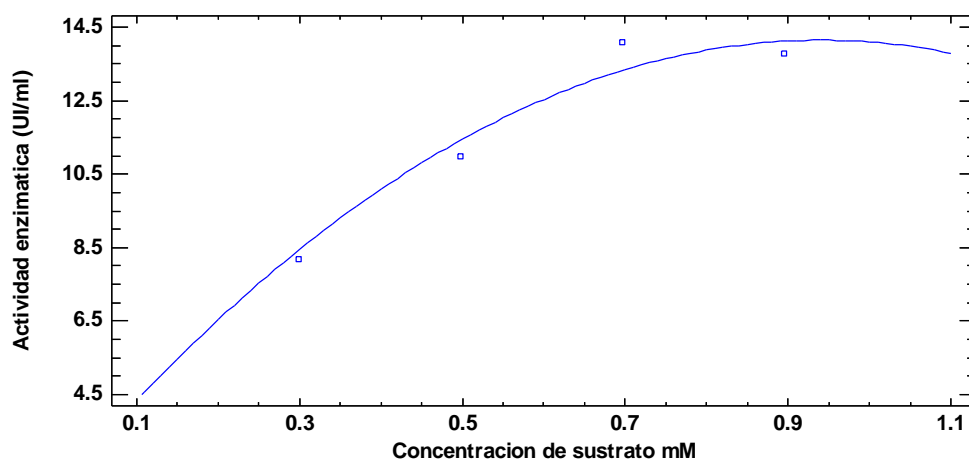
[S]	V				DE	1/[S]	1/V
	RI	RII	RIII	Promedio			
<b>0,05</b>	4,5	4,7	4,4	4,5	0,15	10,05	0,22
<b>0,1</b>	8,2	8,4	8,0	8,2	0,20	3,35	0,12
<b>0,3</b>	11,0	10,8	11,2	11,0	0,20	2,01	0,09
<b>0,5</b>	14,3	13,9	14,1	14,1	0,20	1,44	0,07
<b>0,7</b>	13,6	13,7	14,0	13,8	0,21	1,12	0,07
<b>0,9</b>	4,5	4,7	4,4	4,5	0,15	10,05	0,22
<b>1,1</b>	8,2	8,4	8,0	8,2	0,20	3,35	0,12

[S]: Concentración del sustrato pNPP mM

V: Velocidad (actividad enzimática) UI/ml

DE: Desviación estándar

**Fuente:** Elaboración propia



**Figura 20.** Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción

**Fuente** Elaboración propia

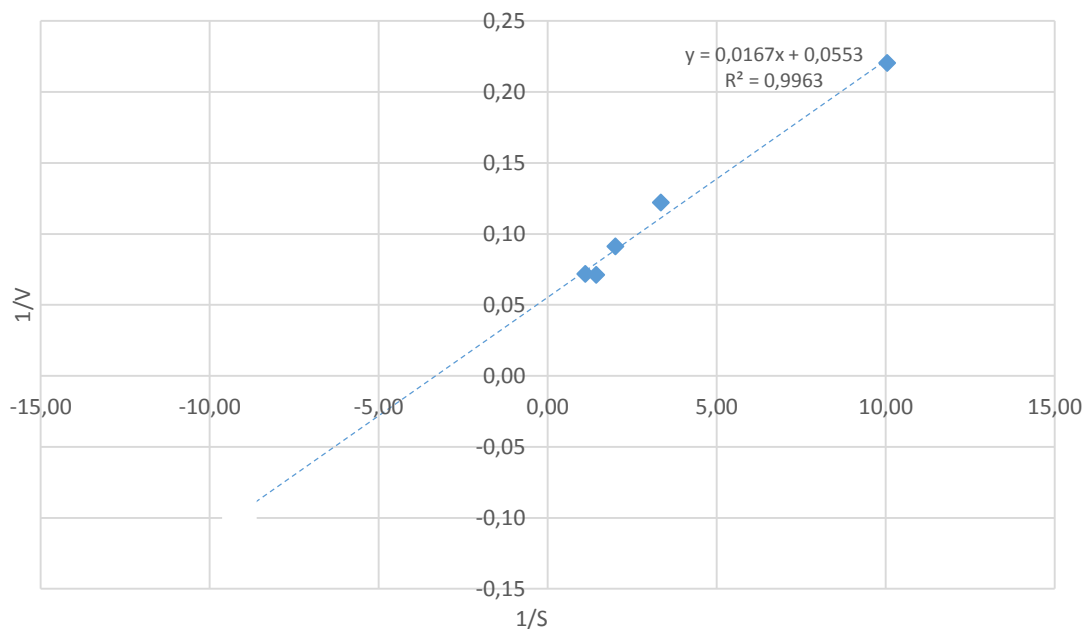
La salida muestra los resultados de ajustar un modelo polinomial de segundo orden para describir la relación entre Actividad enzimática UI/ml y Concentración del Sustrato mM. La ecuación del modelo ajustado es

$$V = 1,97414 + 25,2686 \cdot C - 12,9286 \cdot C^2$$

V = Actividad enzimática UI/ml

C= Concentración de sustrato (mM)

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo así ajustado explica 98,66 % de la variabilidad en Actividad enzimática UI/ml. El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más apropiada para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 97,32 %.



**Figura 21.** Modelo ajustado de la regresión lineal de la inversa de la concentración de sustrato vs la inversa de la actividad enzimática. (Representación de Lineweaver Burk)

**Fuente:** Elaboración propia

En la figura 23 muestra los resultados de ajustar un modelo lineal para describir la relación entre 1/V y 1/S. La ecuación del modelo ajustado es

$$1/V = 0,0535966 + 0,0167 \cdot 1/S$$

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 98,84 % de la variabilidad en 1/V. El coeficiente de correlación es igual a 0,99, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

De la ecuación se obtuvo que la  $V_{\text{máx}}$  estimada de la lipasa es 18,65 UI ml<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> y le  $K_m$  estimado para la lipasa es 0,31 mM

### 3.2.2.2 Determinación de pH y temperatura optima

**Tabla 42.** Análisis de varianza para la actividad enzimática de lipasas de la cepa FT 3

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>A:ph</b>	348,516	1	348,516	110,08	0,0000
<b>B:temperatura</b>	0,0128601	1	0,0128601	0,00	0,9502
<b>AA</b>	40,836	1	40,836	12,90	0,0533
<b>AB</b>	1,0317	1	1,0317	0,33	0,5778
<b>BB</b>	99,366	1	99,366	31,38	0,0501
<b>bloques</b>	20,6181	2	10,309	3,26	0,0714
<b>Error total</b>	41,1594	13	3,1661		
<b>Total (corr.)</b>	704,748	20			

R-cuadrada = 93,67 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 90,25 porciento

Error estándar del est. = 1,81

**Fuente:** Elaboración propia

Para la optimización de respuesta esperada de la actividad enzimática de la cepa FT 3, se realizó un análisis de regresión, donde se excluyó el efecto de la temperatura y de la interacción de los factores pH, temperatura

por no presentar diferencia estadística significativa, así como en el caso del número de bloques el cual también fue ignorado.

Mientras que los efectos de pH, indican variabilidad significativa con un nivel de confianza de 95 %, siendo este el único, indicando que existen al menos un pH en la cual la enzima presenta mejor actividad enzimática y que al no presentar diferencia significativa respecto a la temperatura, eso indica que no existe diferencia entre la actividad enzimática respecto a una temperatura y otra.

Del estadístico R-cuadrada corregido según el número de casos evaluados, se observó que los factores incluidos en el modelo (pH y temperatura) están explicando el 90,2545 % de la variabilidad de la actividad enzimática.

Se obtuvo la siguiente función de respuesta (ecuación de regresión) a utilizar que se ha ajustado a los datos para maximizar los factores de pH y temperatura

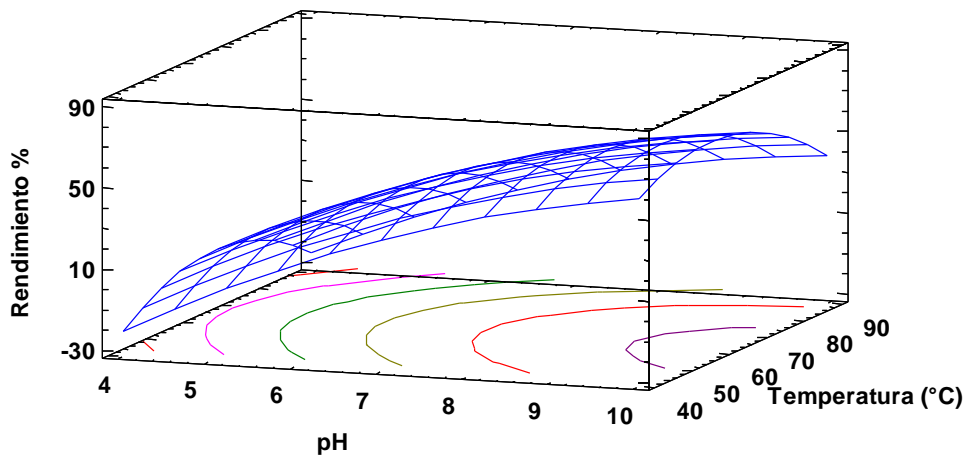
$$R = -57,6191 + 7,720 \cdot \text{pH} + 1,132 \cdot T - 0,405 \cdot \text{pH}^2 + 0,00763 \cdot \text{pH} \cdot T - 0,009107 \cdot T^2$$

R= Rendimiento %

T= temperatura

De la ecuación anterior se obtuvo el valor óptimo de 10 para el factor pH en el cual a conformación de la enzima es la más adecuada para la actividad catalítica y la temperatura de 66,35 °C para el factor de

temperatura, dando un rendimiento del 90 % que asciende a 19,14 UI/ml de actividad enzimática de lipasas, tal como se muestra en la figura 24 (figura de optimización del rendimiento enzimático)



**Figura 22.** Superficie de respuesta estimada de la optimización del rendimiento de la actividad enzimática de lipasas de la cepa FT3

**Fuente:** Elaboración propia

### 3.2.2.3 Termoestabilidad

**Tabla 43.** Análisis de varianza para la actividad residual de la termoestabilidad de las lipasas de la cepa FT 3

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>A:ph</b>	38,981	1	38,981	8,44	0,0157
<b>B:temperatura</b>	97,0895	1	97,0895	21,02	0,0010
<b>AA</b>	1,16533	1	1,16533	0,25	0,6263
<b>AB</b>	10,4699	1	10,4699	2,27	0,1631
<b>BB</b>	32,0771	1	32,0771	6,94	0,0549
<b>bloques</b>	14,0701	2	7,03504	1,52	0,2646
<b>Error total</b>	46,1906	10	4,61906		
<b>Total (corr.)</b>	255,528	17			

R-cuadrada = 81,9235 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 69,2699 por ciento

Error estándar del est. = 2,1492

**Fuente:** Elaboración propia

Para la optimización de respuesta esperada de la actividad residual de la cepa FT 3 en base a su termoestabilidad, se realizó un análisis de regresión, donde se excluyó la interacción de los factores tiempo y temperatura por no presentar diferencia estadística significativa, así como en el caso del número de bloques el cual también fue ignorado.

Mientras que los efectos de tiempo y temperatura indican variabilidad significativa con un nivel de confianza de 95 %, siendo las temperaturas menores (60 a 70 °C) las que presentaron más significancia dando interpretar que estas temperaturas influyen incrementando la actividad residual de la enzima, siendo este fenómeno similar al que pasa con la influencia del tiempo que incrementa la actividad en menor de exposición.

Del estadístico R-cuadrada corregido según el número de casos evaluados, se observó que los factores incluidos en el modelo (tiempo y temperatura) están explicando el 81,92 % de la variabilidad de la actividad residual.

Se obtuvo la siguiente función de respuesta (ecuación de regresión) a utilizar que se ha ajustado a los datos para maximizar los factores de tiempo y temperatura

$$AR = -420,237 - 1,047*t + 18,73*T - 0,000604*t^2 + 0,01268*t*T - 0,1554*T^2$$

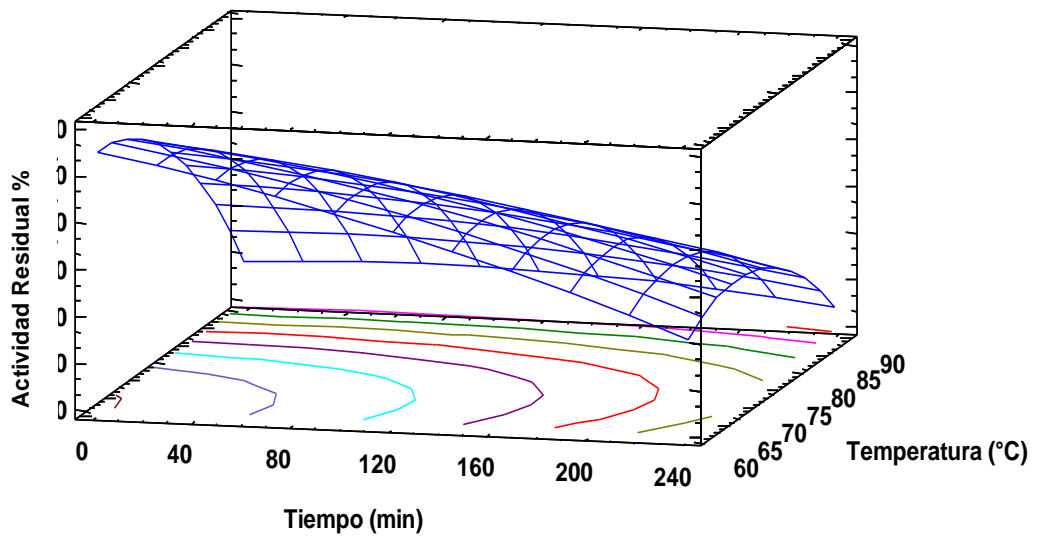
AR = Actividad residual %

t = tiempo (min)

T= temperatura (°C)

De la ecuación anterior se obtuvo el valor máximo de actividad residual a 30 minutos de exposición para el factor tiempo a una temperatura de 61,49 °C para el factor de temperatura, dando un máximo de 135,344 % de actividad residual de lipasas, tal como se muestra en la figura 25, es decir que las lipasas de la cepa FT 3 incrementan en un 135,344 % su

actividad enzimática residual cuando es sometida a 61,49 °C por un periodo máximo de 30 minutos.



**Figura 23.** Superficie de respuesta estimada del tiempo se exposición de la enzima sobre diferentes temperaturas de las lipasas de la cepa FT3

**Fuente:** Elaboración propia

### 3.3. Identificación de las dos cepas seleccionadas con mayor actividad enzimática.

Para la identificación de la cepa bacteriana se procedió previamente a caracterizarlas según MacFaddin (2003):

#### 3.3.1 Caracterización microscópica

**Tabla 44.** Tinción Gram de las cepas bacteriana seleccionada

<b>Código de la Cepa</b>	<b>Carácter tintorial Gram</b>	<b>Forma y disposición</b>
<b>FT-3</b>	<b>Positivo</b>	Bacilos pequeños y medianos, delgados que forman filamentos largos, algunos con espora terminal.
<b>GT-5</b>	<b>Positivo</b>	Bacilos pequeños, delgados, algunos con espora terminal, no forman filamentos.

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 45.** Caracterización macroscópica de las cepas bacterianas seleccionadas

<b>Código de la cepa</b>	<b>Forma y disposición</b>
<b>FT-3</b>	Colonias de forma esférica de color amarillo pálido con elevación convexa, borde entero y superficie lisa
<b>GT-5</b>	Colonias de forma fusiforme de color amarillo pálido con elevación acumulada, borde ondulado y superficie rugosa

**Fuente:** Elaboración propia

### 3.3.2 Pruebas bioquímicas

**Tabla 46.** Pruebas bioquímicas de las cepas seleccionadas

<b>Bacteria termófila</b>	<b>Citocromo Oxidasa</b>	<b>Catalasa</b>
<b>FT 3</b>	Positivo	Positivo
<b>GT-5</b>	Positivo	Positivo

**Fuente:** Elaboración propia

### 3.3.3 Identificación molecular

Los resultados del secuenciamiento del gen ARNr 16S informa sobre la identidad de la bacteria con la depositada en la base de datos del GenBank (búsqueda en BLAST), que mayor similitud presenta con la bacteria problema, indicando el porcentaje de identidad y el porcentaje de la secuencia que ha sido comparada.

**Tabla 47.** Similitud de las secuencias de ARNr 16S para las cepas GT 5 y FT 3 en BLAST.

<b>Muestra cepa</b>	<b>Descripción</b>	<b>Cob. %</b>	<b>Id. %</b>	<b>Acceso</b>
FT 3	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	99	99	HE574321.1
GT 5	<i>Anoxibacillus sp</i>	98	98	EU234220.1

**Cob:** Cobertura

**Id:** Identidad

**Fuente:** Elaboración propia

### 3.4 Caracterización físico química de los aceites residuales.

**Tabla 48.** Caracterización Físico Química de los aceites residuales a degradar.

Prueba fisicoquímica	Rango esperado	Aceite de oliva (teórico)	Aceite de Oliva Real	A.R. Ch.	A.R. Cev.	A.R. Res.
<b>Índice de acidez</b>	(2,38 - 2,59) % de ácido oleico	1	0,98	0,46	0,33	0,46
<b>Índice de peróxidos</b>	(9,4325- 11,4668) meq O <sub>2</sub> / kg de aceite	1,5	2,99	1,34	16,69	5,59
<b>Índice de saponificación</b>	(199,5 - 199,9) mg de KOH/g de aceite)	192,4	196,70	210,05	194,46	188,13
<b>Densidad</b>	(0,9150- 0,9160) g/ml	0,9148	0,91	0,96	0,93	0,96
<b>Índice de yodo</b>	Centígramo de yodo absorbido por grado (cg/g)	0,75-0,94	30,99	23,93	21,49	27,37
<b>Fuente</b>	Herrera Restrepo (2008)	Elaboración propia				

A.R Ch. = aceite residual de chicharronerías

A.R Cev. = aceite residual cevicherías

A.R Res. = aceite residual de Restaurantes.

**Fuente:** Elaboración propia

### 3.5 Evaluación de la actividad lipolítica de las enzimas termoestables de las bacterias termófilas seleccionadas sobre los aceites residuales vegetales

**Tabla 49.** Actividad enzimática por titulación de la degradación de los aceites residuales usando lipasas termoestables de las cepas GT 5 y FT 3.

N° de repeticiones	Enzima GT5				Enzima FT3			
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>
R I	6,35	4,76	4,76	3,17	4,76	4,76	5,00	3,17
R II	6,35	4,76	2,38	2,38	6,35	3,17	4,76	5,00

S 1: Sustrato 1 (aceite de oliva como control)

S 2: Sustrato 2 (aceite residual de cevicherías)

S 3: Sustrato 3 (aceite residual de chicharronerías)

S 4: Sustrato 4 (aceite residual de restaurants)

R I y R II: Repeticiones de cada ensayo

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 50.** Análisis de Varianza de la degradación de los aceites residuales vegetales usando dos enzimas termoestables de las cepas GT 5 y FT 3.

Origen	Suma de cuadrados tipo		Media		
	III	gl.	cuadrática	F	Sig.
<b>Modelo corregido</b>	18,092 <sup>a</sup>	7	2,585	2,803	0,086
<b>Intersección</b>	322,921	1	322,921	350,259	0,000
<b>enzimas</b>	0,265	1	0,265	0,288	0,606
<b>aceites</b>	13,396	3	4,465	4,843	0,033
<b>enzimas * aceites</b>	4,431	3	1,477	1,602	0,264
<b>Error</b>	7,376	8	0,922		
<b>Total</b>	348,389	16			
<b>Total corregida</b>	25,468	15			

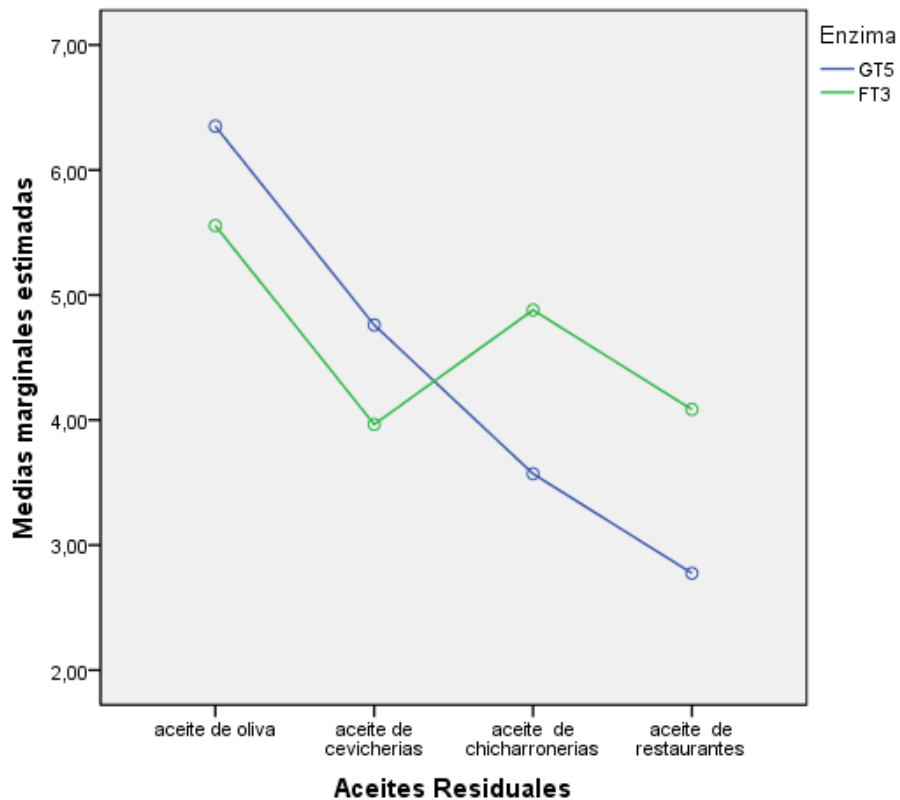
a. R cuadrado = 0,919 (R cuadrado corregida = 0,849)

b. Calculado con alfa = 0,05

**Fuente:** Elaboración propia

En la Tabla 49 del ANOVA de la degradación de los aceites residuales vegetales usando las enzimas termoestables de las cepas GT 5 y FT 3 se excluyó la interacción entre las dos variables y el factor enzimas debido a que no presentan diferencias significativas, tomando solo el factor aceites residuales, por presentar p- valor menor a 0,05 dando a entender que por lo menos uno de los aceites residuales vegetales presenta mayor capacidad para ser biodegradados, tantos por las lipasas de la cepa GT5 y/o FT 3 con una nivel de confianza del 95 %.

Por otra parte, se puede apreciar la presencia una intersección que presenta un P-valor menor que 0,05 dando a entender el cambio de comportamiento de una de las dos enzimas en la biodegradación de algunos de los aceites residuales vegetales, con un nivel de significancia del 95 %.



**Figura 24.** Gráfico de medias de la actividad enzimática (UI/ml) de la biodegradación de los aceites residuales vegetales por las lipasas termoestables.

**Fuente** Elaboración propia

En la figura 30 se observa que no existe interacción entre la degradación de aceite de oliva y los aceites de la cevicherías siendo para los dos casos, la lipasa de la GT 5 la que degrada mejor; caso similar sucede con el aceite de chicharronerías y de restaurantes al no presentar interacción, pero la lipasas de la FT3 pasa a ser más efectiva en ambos

casos que la GT 5 esto debido posiblemente a que resistencia de esta enzima a las grasas de porcino mezcladas en los aceites residuales de chicharronerías, y a los diferentes componente que se mezclaron cuando se estaba cocinando en los restaurantes.

Por otro lado, la presencia de la intersección dice que hay interacción, pero al tener un p-valor menor que 0,05 esta interacción no es estadísticamente significativa; esta intersección no dice que se presenta un cambio en la capacidad biodegradadora de los aceites por parte de las enzimas termoestables, siendo la posible causa, los componentes de dicho aceites, tales como el tiempo de cocción, la cantidad de comida frita en ellos los cuales fueron posiblemente mayores en los aceites de chicharronerías y en los restaurantes que en los de la cevicherías, haciendo disminuir la capacidad biodegradadora de las enzimas a los aceites residuales; y ese incremento de actividad de la FT3 sobre los dos últimos aceites (chicharronerías y restaurante) son debido posiblemente a las propiedades de resistencia del sitio activo de la lipasa a los ciertos componentes que estuvo presente en dicho aceites de chicharronerías y de restaurantes.

**Tabla 51.** Promedio de significancia de Tukey para actividad enzimática (UI/ml) de los diferentes aceites residuales degradados.

Aceite residual	N	Subconjunto	
		1	2
Aceite de restaurantes	4	3,4300	
Aceite de chicharronerías	4	4,2250	4,2250
Aceite de cevicherías	4	4,3625	4,3625
Aceite de oliva	4		5,9525
<b>Sig.</b>		0,547	0,126

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 0,922.

Alfa = 0,05.

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 51 se observa 2 grupos homogéneos los cuales difieren entre sí. No existiendo diferencia estadísticamente significativa entre aquellos niveles que comparten la misma columna, siendo así que de todos los aceites degradados solo el aceite de oliva presenta un mayor promedio de actividad enzimática, siendo lo más probable que al ser usado como inductor para la producción de las dos enzimas estas enzimas tengan una mayor afinidad por este sustrato. Y las demás al ser usadas, se mezclan con otros componentes, dependiendo de la procedencia del aceite, haciendo que influya negativamente en la degradación de estos, pero a

pesar de eso, todos los aceites residuales degradados no presentan diferencia significativa entre sí, asumiendo que a pesar de los componentes extras que presentan, estos tienen la capacidad a ser degradados homogéneamente y/o por cualquiera de las dos enzimas con un nivel de confianza del 95 %.

#### IV. DISCUSIÓN

Para una buena selección cualitativa muchos autores prueban diferentes métodos de producción en placa para sus cepas recién aisladas, utilizando medios que van desde el aceite de oliva (Gupta, 2005), yema de huevo (Saengsangaa & Siripornadulsila, 2016) y/o tributirina (Kumar, 2005) todo con Agar base tributirina por ser esta base comúnmente usado. Y cuya formación de halos es más evidente que el uso de agar LB suplementado con los sustratos oleoso antes mencionados (Ver fig. 8 y 9), obteniendo con eso (agar tributirina suplementado con tributirina) la elección de dos cepas (GT5 y FT3) cuyos halos tuvieron los mejores promedios con diferencia estadísticamente significativa con el resto más no con entre ellos, y cuyo promedio de halos ascendió a 31 mm y 28 mm respectivamente, siendo estos promedios mayores que los reportados por (Saengsangaa & Siripornadulsila, 2016) el cual uso agar base tributirina suplementado con tributirina y yema de huevo obteniendo para una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* halos de 1 a 2 mm. Para poder degradar los aceites residuales es necesario contar con una buena producción enzimática y para ello el inductor del medio de producción es indispensable (Sharma et al, 2001), siendo el más utilizado el aceite de oliva (1 %) obteniendo como resultado actividades que van desde 0,612 UI/ml en *Bacillus sp.* (Sharma et al , 2014) hasta 1,56 UI/ml para *Bacillus coagulans* (Satyendra et al, 2005) en bacterias y para hongos actividades de 4,5 UI/ml de *Penicillium simplicissimum* (Gutarra & Godoy , 2009). Pero la fuente de carbono no es la única que influye directamente en la producción enzimática, la fuente de nitrógeno (peptona y extracto de levadura presentaron mejores resultados que con el sulfato de amonio ( Abdel-Fattah & Soliman, 2012)) y los iones metálicos también tiene repercusión, tanto así que la ausencia de Mg<sup>+</sup> hizo

que la actividad se redujera en un 50 %, pero esta disminución fue amortiguada cuando se reemplazó este ion por uno de  $\text{Ca}^{2+}$  dando a conocer la importancia de este ion para un medio de producción de lipasas (Sharma *et al*, 2001). Es por tal que se escogió tres métodos de producción, cada uno de ellos basados en la concentración de sus componentes principales (fuente de carbono, fuente de nitrógeno y iones metálicos) teniendo así al primer método descrito por Satyendra *et al*, (2005) donde la elevada concentración de peptona (0,5 %), y extracto de levadura (0,5 %) lo hicieron un medio prometedor para la inducción además de presentar al aceite de oliva como el inductor y al  $\text{CaCl}_2$  en concentraciones mínimas (0,005 %), cuyos resultados ascendieron a 1,56 UI/ml en *Bacillus coagulans* (productor de una lipasa termófila), para el segundo método se buscó un medio de producción que presentara un incremento en la concentración de los iones de  $\text{Ca}^+$  debido a la importancia de este para la producción (Sharma *et al*, 2001), encontrando así al método descrito por Castro-Ochoa *et al* (2005) el cual reemplazando la peptona y el extracto de levadura por el caldo nutritivo a 0,325% (w/v) y cuya concentración de  $\text{CaCl}_2$  ascendió al 0,1 % (w/v) conservando el medio inductor y su concentración, medio que tuvo como resultado una actividad de 6 UI/ml con *Bacillus thermoleovorans*. Para el tercer método se buscó medios ya optimizados en donde algunas literaturas afirman que el aceites de oliva es un buen inductor, pero no es el único, Abdel-Fattah & Soliman, (2012) en una de sus publicaciones sobre optimización usando superficie de respuesta en un termofilo aislado en suelos de Malasia (*Geobacillus thermodenitrificans*) encontraron que el almidon soluble presentaba una actividad de 20 UI/ml, seguida de Sucrosa con 11 UI/ml, siendo este último también elegido como mejor medio de inducción para *Bacillus subtilis* en un diseño de optimización de producción llegando a una actividad máxima de 3,16 UI/ml (Esmaeili , Yolmeh, &

Shakerar, 2015); y todo esto sumado a una afirmación de Sharma *et al* (2001) en donde indica que los iones metálicos influyen de manera directa sobre la producción enzimática, siendo los más indispensables no solo los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  si no también los de  $\text{Mg}^{2+}$  seguido por los de  $\text{Na}^+$   $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  es por esto que para el tercer método de producción se eligió uno descrito por (Murillo *et al*, 2012) cuya fuente de carbono (componente inductor) es reemplazado por el almidón soluble (2%) y este presenta como parte de los iones metálicos al  $\text{NaNO}_3$  (0.3 %), y el  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.05 %). Con los métodos uno, dos y tres se obtuvieron como resultado actividades de 11,26; 2,63 y 3,40  $\text{Uml}^{-1}\text{min}^{-1}$  respectivamente eligiendo al método 1 por presentar diferencia estadísticamente significativa.

Un gran número de bacterias presentan actividad lipolítica extracelular (Adan, 2009; Aliyu Salihu<sup>1</sup> & Alam<sup>1</sup>, 2014; Krishnaveni, 2013 ; Colla, Ficanh, & Rizzard, 2015; Esmaeili , Yolmeh, & Shakerar, 2015) pero no siempre pasa esto, investigaciones realizadas a *Rhizopus oligosporus* mostraron que este presenta una mayor actividad lipolítica intracelular con 0,490 U/ml (Iftikhar *et al*, 2008) y así también Ertugrul, Dunmez, & Takac (2007) encontró una mayor actividad intracelular que asciende 168 U/ml trabajando con *Bacillus sp* (productor de una enzima termófila) cuya actividad es mayor que muchas lipasa extracelulares, además que en otros trabajos encontraron una mayor actividad en la membrana celular siendo los fosfolípidos considerados como lipasas verdaderas (Kulkarni *et al*, 2002) en *Pseudomonas fluorescens*, es por esto que al tener cepas nativas de los geiseres de Calientes, no se sabía el tipo de enzima que producían, teniendo que medir de la actividad en los posibles lugares de ubicación, donde se encontró que las dos cepas (GT 5 y la FT 3) presentaron una mayor actividad estadísticamente significativa con un 95 % de confiabilidad

en el extracto crudo esto quiere decir que sus enzimas lipolítica son extracelulares.

Para tener una mayor producción enzimática se necesita no solo el medio de inducción, ni saber si la enzima es extracelular, sino también el tiempo de producción el cual difiere por cada bacteria, Abdel-Fattah & Soliman, (2012) que trabajo con *Geobacillus thermodenitrificans* y cuyo tiempo de mayor producción fue a las 24 horas teniendo como resultado 15 UI/ml no obstante, Castro-Ochoa *et al*,(2005) logró una actividad máxima de 6 UI/ml con *Bacillus thermoleovorans* a las 44 h; Satyendra *et al*, (2005) logró 1,56 UI/ml en *Bacillus coagulans* a las 48 h y Zuoaqi & Bouziane, (2012) a las 48 h trabajando con *Pseudomonas aeruginosas*, y evaluando a las cepas seleccionadas (GT 5 y FT 3) se pudo encontrar una actividad maxima a las 24 horas en ambos casos con diferencia estadísticamente significativa con las demas horas evaluadas. Siendo estas de 17 y 7 UI/ml respectivamente. Al Compararlas con ( Castro-Ochoa, Rodriguez-Gomez, Valerio-Alfaro, & Oliart Ros, 2005) el cual publicó una lipasa con actividad de 6 UI/ml en 44 horas, y en la cepa GT 5 se obtuvo tres veces más su actividad en la mitad del tiempo, haciendo a esta enzima una muy rentable y mas eficiente, y si se compara con las antes mencionadas, excepto a la del *Geobacillus thermodenitrificans* con un tiempo de producción de 24 horas, pero con una actividad de 15 UI/ml superándolo de igual manera, pero si se habla de actividad específica, se puede apreciar que la GT5 muestra una actividad específica de 57 UI/mg siendo una de las más elevadas si se comparan con Iftikhar, *et al* (2008) el cual trabajo con *Rhizopus oligosporus* obteniendo una actividad específica de 0,49 UI/mg, Murillo *et al* ,(2012) obtuvo 0,276 UI/mg. En *Bacillus sp* . y (Jaina & Mishraa, 2015) 5,5 UI/mg para *Bacillus sp*. Siendo esta cepa (GT 5)

prometedora para futuras recombinantes y sus diversas aplicaciones industriales así como en la fabricación de biodiesel, la cual está cobrando más acogida en todo el mundo.

En la caracterización enzimática se determinó que la velocidad inicial de las dos cepas (GT 5 y FT 3) es 2,26 y 0,11  $\mu\text{M}/\text{ml}$  respectivamente dando a entender que la lipasa de la GT 5 presenta una mayor actividad catalítica que la enzima de la otra bacteria termófila, explicando esto el porque GT5 presentó una mayor actividad enzimática frente a la FT3, no obstante si se observa el  $K_m$  de las dos cepas se puede apreciar la similaridad entre ambas explicando que la afinidad que tienen estas con el pNPP es casi igual (0,36; 0,33 mmol/ml respectivamente) pero al ver la velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) se puede notar que la GT 5 presenta casi el doble de la capacidad catalítica que la FT 3 explicando nuevamente su actividad superior por casi el doble de actividad de la FT 3; si se comparan estos datos la lipasa termófila de *Bacillus sp* cuyo sustrato usado fue el mismo pNPP y los valores de  $K_m$  fueron 0,474 mmol/ml y la  $V_{m\acute{a}x}$  ascendió a 1,093 mmol /ml dando una actividad enzimática de 5,05 UI/ml (Murillo, Barbosa, Moura de Melo, & Soares, 2012) por tal se puede decir que la afinidad por el sustrato es menos que la lipasa de la GT 5 y FT 3 y la velocidad máxima es de 30 veces menos que la GTs5 dando una explicación del porque la actividad enzimática termófilas de *Bacillus sp* es baja 5,5 UI/ml.

Al determinar su pH y temperatura óptima, se nota la afinidad alcalófila y termófila de las lipasas de las cepas GT5 y FT3 con pH de 9,13 y 10 respectivamente; y temperatura óptima de 65,11 °C y 66 °C respectivamente, dando a entender las futura utilidad en la industria alimenticia, de detergentes de estas cepas y que al presentar actividades

ya sea de 17 UI/ml (GT5) o 7 UI/ml (FT3) y que al compararlo con las lipasas de *Bacillus coagulans* este presenta un pH óptimo de 8,5 y una temperatura de 55°C y cuya actividad máxima asciende a 1,6 UI/ml (Satyendra, Khyodano, Ashutosh, & S., 2005), pero si se comparan con las lipasas de *Bacillus stearothermophilus* este presenta una actividad máxima de 9 UI/ml y cuyo pH óptimo es 9 y cuya temperatura óptima asciende a 60 °C. (Sharmaa, Chistib, & Chand Banerjeea, 2001), pero si se compara con algunos mesófilos tales como *Staphylococcus aureus* se nota que este presenta un pH óptimo de 7 y temperatura óptima de 45 °C dando una actividad máxima de 15 UI/ml (Krishnaveni, 2013 ) estando las lipasas de las cepas GT 5 y FT 3 con una excelente actividad ascendiendo a 21 y 19 UI/ml respectivamente.

Respecto a la termoestabilidad de la cepa GT 5 se observa un incremento de hasta un 171 % de la actividad residual cuando esta enzima es sometida en un tiempo de hasta 86 minutos a una temperatura de 65 °C (cercana a su temperatura óptima), siendo lo más probable que el tiempo de exposición a su temperatura óptima haga que su punto activo incremente su afinidad por el sustrato dando como resultado este incremento de su actividad residual; pero si se deja esta enzima a casi el triple de tiempo (4 horas) de exposición en su temperatura óptima, este 171 % se reduce hasta un 90 % de su temperatura residual, caso contrario pasa si la exposición se deja a 90 °C durante 1 hora haciendo que la actividad residual reduzca hasta una 10 % de la actividad residual. Si se compara estos datos con la lipasa de la cepa FT 3.

Se observa el mismo suceso, un incremento de hasta un 135 % de la actividad residual si se somete a la enzima a su temperatura óptima por un

lapso de tiempo no mayor a 30 minutos, dando una actividad residual de hasta un 135 % y si se somete a 4 horas en su misma temperatura óptima se va a observar una disminución hasta el 40 % de su actividad residual original; y si se lleva hasta 90 °C por un tiempo mínimo la actividad residual desaparece.

Para la identificación de las cepas, las caracterización macroscópicas, microscopias y bioquímicas según el libro de (MacFaddin, 2003) dio como resultado que las bacterias tanto GT 5 como FT 3 son del género *Bacillus* sp o *Geobacillus* sp

En la caracterización físico química de los aceites, el índice de acidez es muy bajo en los aceites domésticos indicando que, si se mezcló con otros aceites o componentes alimenticios, estos no hicieron que se produjera hidrolisis de los ácidos libres, este fenómeno hace lo mismo con los aceites de chicharronerías y de restaurantes. En el caso del índice de peróxidos este da a entender qué tan malo esta en aceite evaluados debido a que este índice mide los oxígenos activos por 1 kg de grasa y mientras más elevado esté el índice, significa que sí hubo una mezcla con otros aceites, estos aceites incrementaron probablemente la cantidad de ácidos grasos insaturados, los cuales hicieron que se incrementara los oxígenos activos formando así peróxidos y con esto la rancidez, es el caso de los aceites residuales de uso doméstico cuyo valor superó el límite dado por Herrera (2008), para el caso de aceite de oliva su índice está dentro de los límites, al igual que el aceite residual de chicharronerías y restaurantes. Para el caso de los índices de saponificación no cumplen con el rango dado por Herrera, el cual se basa en un trabajo de los aceites residuales consumibles.

La biodegradación de los aceites residuales muestran que hay interacción muy baja entre los aceites domésticos y el aceite de oliva por presentar líneas paralelas con una pequeña pendiente, y que el aceite de oliva es más biodegradable por la lipasa de la GT 5 que por la FT3 siendo lo más probable que esto suceda por que la lipasa de la GT 5 presenta una mayor velocidad inicial ( $V_0$ ) que la FT3 siendo esta relación la misma en los aceites domésticos, pero en el caso de los aceites de chicharronerías existe una intersección entre la degradación de las enzimas siendo la enzima de la FT 3 la que degrada más que la enzima de la GT 5, y esta relación se mantiene para los aceites de restaurantes.

## V. CONCLUSIONES

Es posible la producción de lipasas termoestables bacterianas teniendo la cepa de código GT 5 una mayor producción (17 UI/ml) que la de código FT 3 (7 UI/ml).

La caracterización enzimática de pH y Temperatura óptima para la cepa de código GT5 es de 9,13 y 65,45 °C respectivamente, y su termoestabilidad asciende a 171 % de actividad residual cuando se le somete a 65,45 °C por 86 min; y para la cepa FT3 su pH y temperatura óptima es de 10 y 66,35 °C respectivamente y su termoestabilidad asciende a 135 % de actividad residual cuando es sometida a 61 °C por 30 min.

En la identificación molecular la cepa de código GT 5 es *Anoxibacillus sp* con un 98 % de identidad y la cepa de código FT 3 es *Geobacillus kaustophilus* con un 99 % de identidad.

La caracterización fisicoquímica respecto a la densidad, índices de acidez, peróxidos, saponificación, y de yodo para el aceite de oliva fue 0,91 g/ml; 0,98 % de ácido oleico; 2,99 meq O<sub>2</sub>/ kg de aceite; 196,7 mg de KOH/g de aceite; 30,99 centígramo de yodo absorbido por gramo (cg/g) respectivamente; para el aceite de chicharronerías fue 0,96 g/ml; 0,46 % de ácido oleico; 1,34 meq O<sub>2</sub>/ kg de aceite; 210,05 mg de KOH/g de aceite; 23,93 centígramo de yodo absorbido por gramo (cg/g) respectivamente; para el aceite de cevicherías fue 0,93 g/ml; 0,33 % de ácido oleico; 16,69 meq O<sub>2</sub>/ kg de aceite; 194,46 mg de KOH/g de aceite; 21,49 centígramo de yodo absorbido por gramo (cg/g) respectivamente y para el aceite de restaurantes fue 0,96 g/ml; 0,46 % de ácido oleico; 5,59 meq O<sub>2</sub>/ kg de

aceite; 188,13 mg de KOH/g de aceite; 27,37 centigramo de yodo absorbido por gramo (cg/g) respectivamente.

En la evaluación de la biodegradación de los aceites residuales domésticos, los aceites de cevicherías fueron los de más fácil biodegradación por lipasas de *Anoxybacillus sp* (GT 5) con 4,76 U/ml, seguidas de los aceites de chicharronerías y restaurantes usando lipasas termoestables de *Geobacillus kaustophilus* (FT 3) con 4,88 y 4,085 U/ml respectivamente.

## **VI. RECOMENDACIONES**

Optimizar la producción de lipasas termófilas según un diseño de superficie de respuesta.

Inmovilizar las enzimas lipolítica termófilas para incrementar su rendimiento en los procesos de biodegradación de aceites residuales vegetales.

Probar con nuevos aceites residuales a biodegradar ya sea de origen vegetal y/o mineral.

Recombinar las bacterias productoras de lipasa termófilas ya seleccionadas.

Producir biodiesel a partir de los aceites residuales emitidos en la ciudad.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Fattah , Y. R., & Soliman, N. A. (2012). Application of experimental designs to optimize medium composition for production of thermostable lipase/esterase by *Geobacillus thermodenitrificans* AZ1. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 193–200.
- Castro-Ochoa, L., Rodriguez-Gomez, C., Valerio-Alfaro, G., & Oliart Ros, R. (2005). Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology*, 648–654.
- Hasan, F., Ali Shah , A., & Hameed. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 782–798.
- Romdhanea, I. B.-B., Fendrib , A., & Gargouri, Y. (2010). A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. *Biochemical Engineering Journal*, 112–120.
- Adan, A. (2009). *Isolation and identification of a lipase producing psychrotrophic bacteria from soil: cloning and partial characterization of its lipase*. İZMİR: İzmir Institute of Technology .
- Aliyu Salihu<sup>1</sup>, & Alam<sup>1</sup>, Z. (2014). Thermostable Lipases: an Overview of Production, Purification and Characterization. *BIOSCIENCES BIOTECHNOLOGY RESEARCH ASIA*, 1095-1107.
- Balkanlioğlu, E. (12 de 04 de 2012). *Today's Zaman*. Recuperado el 20 de 08 de 2015, de [http://www.todayszaman.com/national\\_recycling-of-waste-cooking-oil-into-biodiesel-protects-water-resources\\_277470.html](http://www.todayszaman.com/national_recycling-of-waste-cooking-oil-into-biodiesel-protects-water-resources_277470.html)

- Biodyne-Perú. (- de - de 2015). *Aguas Residuales - trampa de Grasa*. Recuperado el 28 de 08 de 2015, de [http://www.biodyne-peru.com/aguas\\_residuales.php](http://www.biodyne-peru.com/aguas_residuales.php)
- Caballero Moreno, E., Lopez Vidal, J. C., Morgan Lopez, C., & Espinoza Ovaldo, M. (2012). Aceites reciclados de cocina como materia prima de próxima generación para la obtención de biodiesel en Chiapas. *Concyteg*, 896-910.
- Castillo Ramirez, S. C. (2013). *Evaluación de actividad lipolítica en la degradación de Fusarium spp y aplicación de interes nutricional de lipasas microbianas*. Colombia: Pontífice Universidad Javeriana.
- Chahinian, H., & Sarda, L. (2009). Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. *Protein Pept* , 1149-61.
- Charpe, T., & Rathod, V. (2011). Biodiesel production using waste frying oil. *Waste Management*, 31, 85–90.
- Chhetri, A. B., Watts, K. C., & Islam, M. (2008). Waste Cooking Oil as an Alternate Feedstock for Biodiesel Production. *Energies*, 1, 3-18.
- Chin-Hang, S., Chun-Jun, X., & Gee-Chen , L. (2006). Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*, 734–738.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294–306.
- Coca, J., Hernández, O., Berrio, R., & Martínez, S. (2001). Producción y caracterización de las lipasas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*. *Bioteconología Aplicada*, 18, 216-220.
- Colla, L. M., Ficanh, A., & Rizzard, J. (2015). Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of *Aspergillus*

- through Solid-State and Submerged Fermentation. *BioMed Research International*, 0-9.
- Corpac, S. (- de Junio de 2008). *Instructivo de trabajo ambiental para la gestión de residuos peligrosos generados en Corpac S.A.* Lima.
- Ertugrul, S., Dunmez, G., & Takac, S. (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*, 720–724.
- Esmaeili, M., Yolmeh, M., & Shakerar, A. (2015). A central composite design for the optimizing lipase and protease production from *Bacillus subtilis* PTCC 1720. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 349–354.
- Espinoza, O. (07 de Mayo de 2014). Gestión ambiental de residuos sólidos, una herramienta para la empresa. Lima.
- Espinoza, O., & Gutiérrez., P. (- de - de 2005). *Centro de recursos para America Latina y el Caribe en Gestion de recursos*. Recuperado el 19 de 08 de 2015, de <http://www.aldecooperu.com/>
- Felizardo, P., Neiva Correia, J. M., Raposo, I., & Mendes, J. (2006). Production of biodiesel from waste frying oils. *Waste Management*, 26, 487–494.
- Gonzales Mañas, J. M. (2012). *Curso de biomoléculas*. Obtenido de Cinética enzimática: <http://www.ehu.eus/biomoleculas/index.htm>
- Gutarra, M. L., & Godoy, M. G. (2009). Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 5249–5254.
- Gutiérrez-Arnillas, E., Rodríguez, A., & Sanromán, M. A. (2016). New sources of halophilic lipases: Isolation of bacteria from Spanish and Turkish saltworks. *Biochemical Engineering Journal*, 170–177.

- Hanaa, A., El-Shafei, & Rezkallah, L. A. (1997). Production, purification and characterization of Bacillus lipase. *Microbiological Research*, 199-208 .
- Hidrotec. (s.f.). *Biorremediación Enzimática*. Recuperado el 28 de 08 de 2015, de Enzimas para tratamiento de aguas: <http://www.hidrotec.cl/PDF/ficha1.pdf>
- Iftikhar, T., Niaz, M., & Afza, M. (2008). Maximization of Intracellular Lipase Production in a Lipase-Overproducing Mutant Derivative of Rhizopus oligosporus DGM 31: A Kinetic Study. *Food Technol. Biotechnol*, 402–412.
- Iftikhar, T., Niaz, M., & Afzal, M. (2008). Maximization of Intracellular Lipase Production in a Lipase-Overproducing Mutant Derivative of Rhizopus oligosporus DGM 31: A Kinetic Study. *Food Technol. Biotechnol*, 402–412.
- Indecopi. (21 de Marzo de 2006). Catálogo de Normas Técnicas Peruanas. *Medio Ambiente*. Lima: Indecopi.
- Infotur. (14 de 08 de 2013). *Infotur*. Recuperado el 27 de 08 de 2015, de Multas de hasta 2000% mensuales pagarían empresas que no se adecúen a norma de alcantarillado: <http://www.infoturperu.com.pe/noticias-del-dia/10417-multas-de-hasta-2000-mensuales-pagarian-empresas-que-no-se-adecuen-a-norma-de-alcantarillado>
- IPES - Promoción del Desarrollo Sostenible. (2002). *Gestión Ambiental de Aceites Usados*". Lima: Tarea Asociación Gráfica Educativa.
- IPES. (- de - de 2006). *Centro de recursos para America Latina y el Caribe en gestión de residuos*. Recuperado el 20 de 08 de 2015, de Gestión Ambiental de Aceites Usados:

[http://www.ipes.org/backup\\_eyresis/public\\_html/images/gestion-residuos/6.pdf](http://www.ipes.org/backup_eyresis/public_html/images/gestion-residuos/6.pdf)

- Jaina, D., & Mishraa, S. (2015). Multifunctional solvent stable Bacillus lipase mediated biotransformations in the context of food and fuel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21–30.
- Koneman, E. W., & Allen, S. (2006). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas en color*. España: Editorial Medica Panamericana S. A.
- Krishnaveni, M. (2013 ). Characterization of lipase producing Staphylococcus aureus MTCC 10787 from soil sample at Salem, Tamil Nadu, India. *journal of pharmacy research*, 304 -308.
- Kulkarni, N. (2002). *Studies on lipase enzyme from Pseudomonas*. Pune: University of Pune.
- Kulkarni, N. (2002). *Studies on lipase enzyme from Pseudomonas fluorescens NS2W*. Pune: University of Pune.
- Kumar, R., & Mahajan, S. (2011). Identification of variables and value optimization for optimum lipase production by Bacillus pumilus RK31 using statistical methodology. *New Biotechnology*, 65-71.
- Lew, C. P., Kumar, H., & Zambare, V. P. (2014). Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Applied Energy*, 497–520.
- Lopez, D. B., Fraga, L. P., & Fleuri, J. F. (2011). Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately? *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 608-613.
- Lopresto, C. G., Naccarato, S., Albo, L., DePaola, M. G., & Chakraborty, S. (2015). Enzymatic transesterification of waste vegetable oil to produce biodiesel. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30-37.

- MacFaddin, J. F. (2003). *Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Málaga, I. (25 de 04 de 2010). *El comercio*. Recuperado el 28 de 08 de 2015, de Cada vez son más las empresas que apuestan por producir biocombustibles.
- Márquez-Riquel , M., Navas-Yamarte , P., Yegres , F., & Vivas-Espejo , C. (2015). Biodegradación parcial de aceites residuales usados utilizando *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp. y *Saccharomyces cerevisiae*. *Química Viva*, 84-88.
- Martinez-Guerra, E., & Gnaneswar Gude, V. (2014). Transesterification of waste vegetable oil under pulse sonication using ethanol, methanol and ethanol–methanol mixtures. *Waste Management*, 34(12), 2611–2620.
- Mendoza Vera, J. M. (2004). *Estado Actual de la Biorremediación en México*. México: Instituto Politécnico Nacional.
- Murillo, J., Barbosa, P., Moura de Melo, C., & Soares, F. (2012). Biochemical characterisation of lipase from a new strain of *Bacillus* sp. itp-001. *Quim. Nova*, 6, 1173-1178.
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 0039 . (1973). *Grasas y aceites comestibles. Determinación de la pérdida por calentamiento*. Ecuador: Edict of government.
- Normas Técnicas Ecuatorianas NTE INEN 0035 . (1973). *Grasas y aceites comestibles. Determinación de la densidad relativa*. Ecuador: EDICT OF GOVERNMENT.
- Normas Técnicas Ecuatorianas NTE INEN 0040. (1973). *Grasas y aceites comestibles. Determinación del índice de saponificación*. Ecuador: EDICT OF GOVERNMENT.

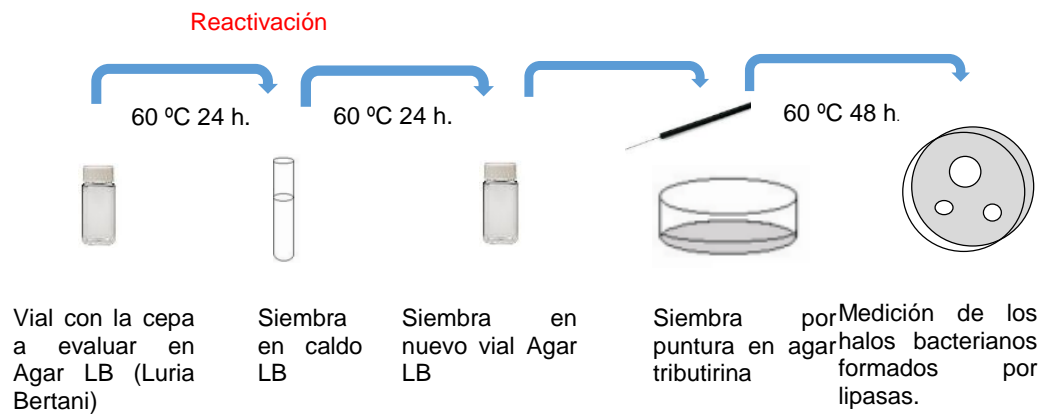
- Normas Tecnicas Ecuatorianas NTE INEN 0277. (1978). *Grasas y aceites. Determinación del índice de peróxido*. Ecuador: Normas ecuatorianas.
- Normas Tecnicas Ecuatorianas, N. I. (1973). *Grasas y aceites comestibles. Determinación de la acidez*. Ecuador: Edict of government.
- Papagora, C., & Rouka, T. (2013). Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing*, 413–420.
- Patil , P., & Gnaneswar Gude , V. (2009). Biodiesel Production from *Jatropha Curcas*, Waste Cooking, and *Camelina Sativa* Oils. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(24), 10850–10856.
- Radich, A. (08 de 07 de 2015). *Biodiesel performance, costs, and use*. Obtenido de US Energy Information Administration: <http://www.eia.doe.gov/oiaf/analysispaper/biodiesel/index.html>
- Rivera-Pérez, , C., & García-Carreñ, F. (2007). Enzimas Lipolíticas y su Aplicación en la Industria del Aceite. *BioTecnología*, 37-45.
- Saengsangaa, T., & Siripornadulsila, W. (2016). Molecular and enzymatic characterization of alkaline lipase from *Bacillus amyloliquefaciens* E1PA isolated from lipid-rich food waste. *Enzyme and Microbial Technology*, 23–33.
- Satyendra, K., Khyodano, K., Ashutosh, U., & S., S. (2005). Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*, 38–44.
- Shan, G., Jin, W., & Lam, E. (2008). Purification of total DNA extracted from activated sludge. *Journal of Environmental Science*, 80–87.

- Sharma , D., Kumbhar , B. K., & Tewari, L. (2014). Optimization of critical growth parameters for enhancing extracellular lipase production by alkalophilic Bacillus sp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 205–211.
- Sharma, R., Chistib, Y., & Chand Banerjee, U. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 627-662.
- Sharon, C., Furugoh, S., Yamakido, T., & Ogawa, H. (1998). Purification and characterization of a lipase from Pseudomonas aeruginosa KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 304–307.
- Torres Vargas, G. M. (- de Enero de 2011). *Universidad Nacional Abierta y a Distancia*. Obtenido de Lección 12: Cinética enzimática: [http://datateca.unad.edu.co/contenidos/201103/201103/leccin\\_12\\_cintica\\_enzimtica.html](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/201103/201103/leccin_12_cintica_enzimtica.html)
- Tsai, S.-W. (2014). Review - Enantioference of Candida antarctica lipase B toward carboxylicacids: Substrate models and enantioselectivity thereofShau-. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1381-1177.
- Valdez Pantoja, C., & Universo Bermudez, G. (2010). Extraccion y caracterizacion del aceites de las larvas del Tenebrio molitor. *Asociacion de Revista Quimica del Perú*, 407-412.
- Yapasan, E. (2008). Partial purification and characterization of lipase enzyme from a Pseudomonas strain. *A Thesis Submitted to the Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of MASTER OF SCIENCE*. İzmir, Turquía .

Zuoaqi, B., & Bouziane, A. (2012). Production, optimization and characterization of the lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Romanian Biotechnological Letters*, 7187-7193.

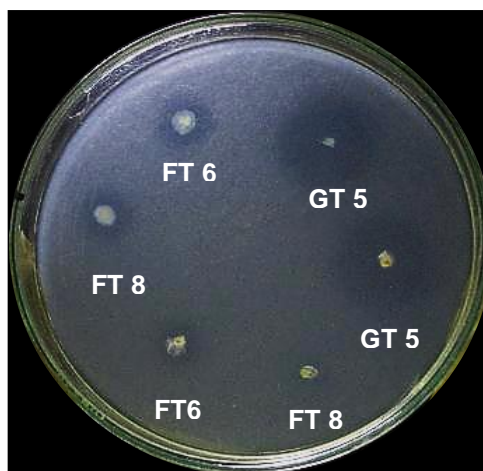
## **VIII. ANEXOS**

## Anexo 1. Esquema de la selección cualitativa



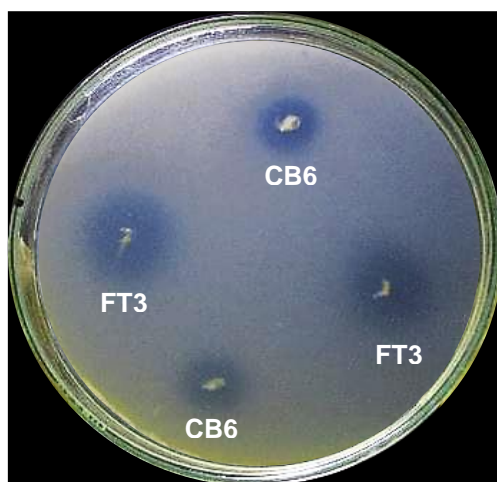
**Fuente:** Elaboración propia

## Anexo 2. Halo formado en el agar tributirina de la cepa GT5



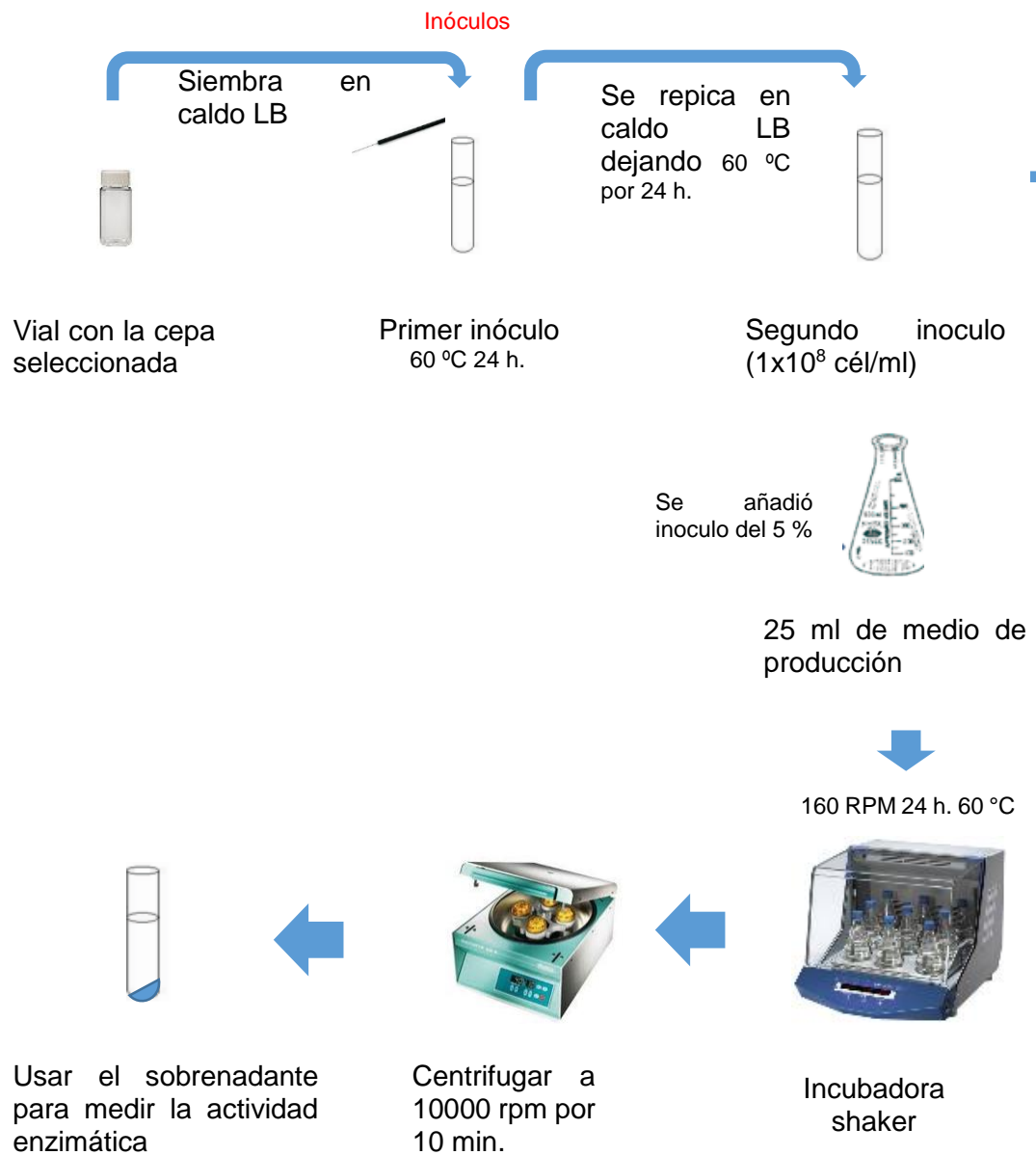
**Fuente:** Elaboración propia

**Anexo 3.** Halo formado en el agar tributirina de la cepa FT 3



**Fuente:** Elaboración propia

#### Anexo 4. Esquema de la selección cuantitativa



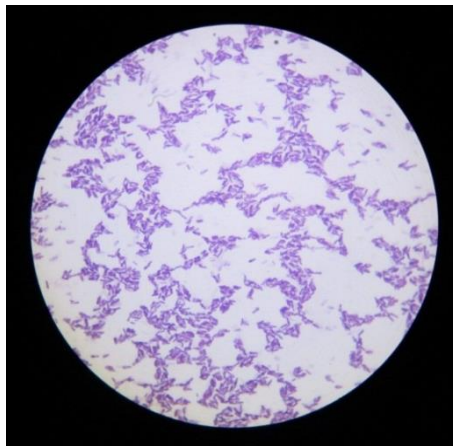
**Fuente:** Elaboración propia

**Anexo 5.** Fotografía del incubador Shaker J-NSIO, donde se realizó la producción enzimática



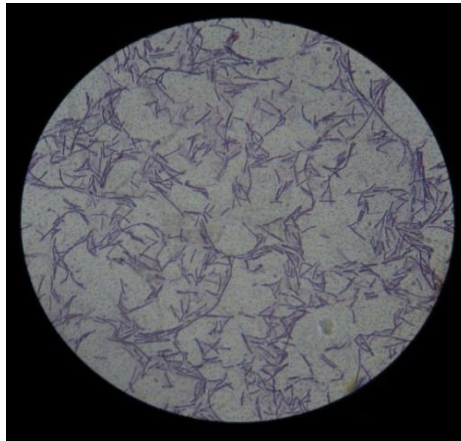
**Fuente:** Elaboración propia

**Anexo 6.** Vista microscópica de la coloración Gram de la bacteria GT 5



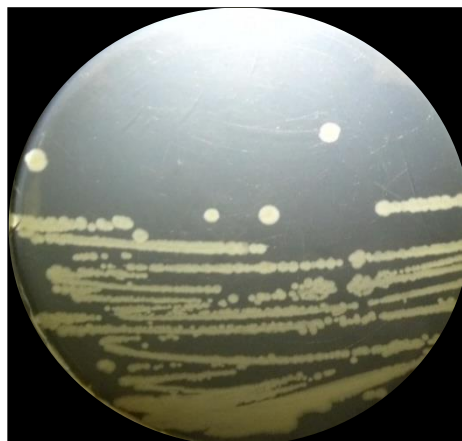
**Fuente:** Elaboración propia

**Anexo 7.** Vista microscópica de la coloración Gram de la bacteria FT3



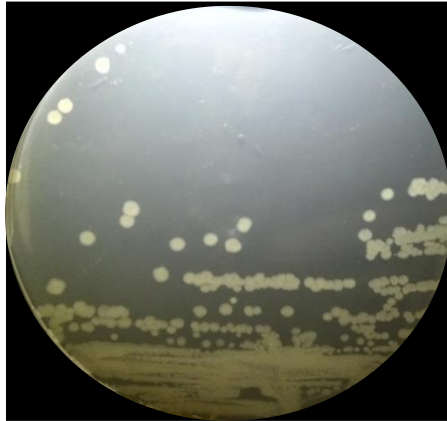
**Fuente:** Elaboración propia

**Anexo 8.** Caracterización macroscópica de las colonias de la cepa GT 5 en placas con agar LB



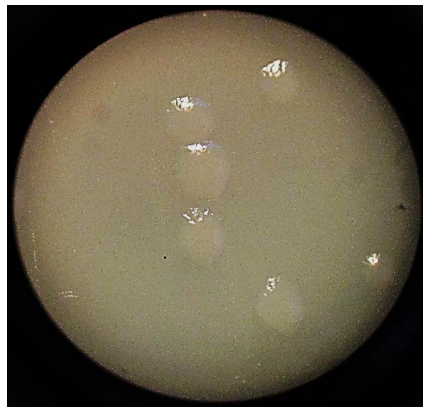
**Fuente:** Elaboración propia

**Anexo 9.** Caracterización macroscópica de las colonias de la cepa FT 3 en placas con agar LB



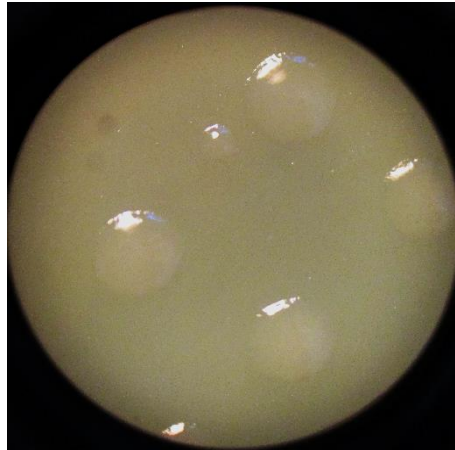
**Fuente:** Elaboración propia

**Anexo 10.** Vista en el estéreo de las colonias de la cepa GT 5



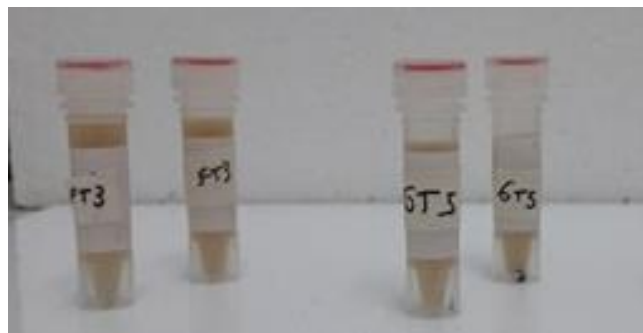
**Fuente:** Elaboración propia

**Anexo 11.** Vista en el estéreo de las colonias de la cepa FT 3



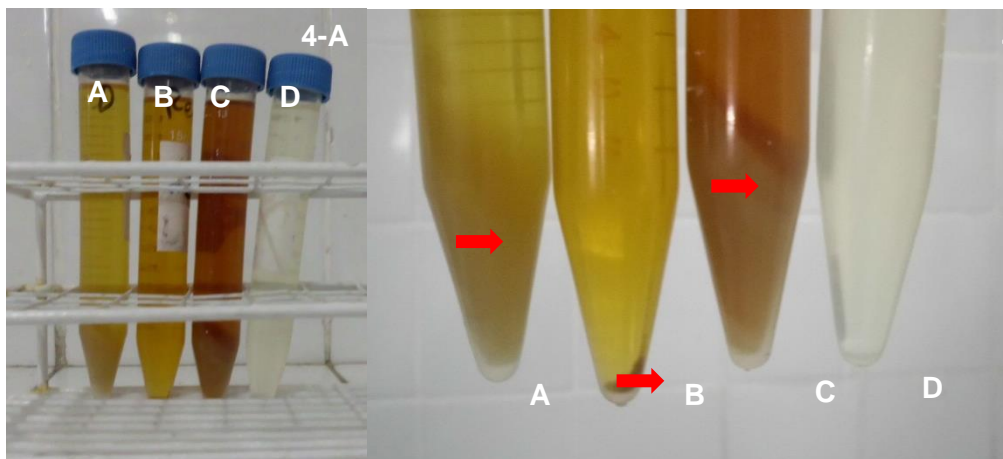
**Fuente:** Elaboración propia

**Anexo 12.** Fotografía de las cepas seleccionadas las cuales fueron guardadas en glicerol 30 % para su envío a Macrogen.



**Fuente:** Elaboración propia

**Anexo 13.** Fotografía de los aceites residuales analizados (4-A); Fotografía del sedimento de los contaminantes de los aceites residuales en su pre-tratamiento físico para separar impurezas y proceder a su posterior biodegradación por las lipasas termófilas (4-B).



A= Aceites residuales de cevicherías  
B= Aceites residuales de restaurantes  
C= Aceites residuales de chicharronerías  
D= Aceites residuales de oliva (control)

**Fuente:** Elaboración propia

**Anexo 14.** Fotografía midiendo la actividad enzimática por titulación de los aceites residuales ya tratados.



**Fuente:** Elaboración propia