

Empleo de enzimas inmovilizadas para el tratamiento de residuales líquidos

Susana Rodríguez-Muñoz^{1*}, Beatriz Guerra-Álvarez¹, María Shirlendy Guerrero-Alcívar²,
Olinda E. Caicedo-Arévalo²

1. Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echeverría (CUJAE)

Ave. 114, No. 11091, e/ Rotonda y Ciclovía, Marianao. La Habana, Cuba

2. Universidad Técnica de Manabí. Avenida Urbina y Che Guevara, Ecuador

* susana@quimica.cujae.edu.cu

RESUMEN

Los métodos convencionales para remover grasas y aceites de los residuales, presentan importantes desventajas como la necesidad de reactivos de alto costo, baja eficiencia de remoción y producción de lodos extremadamente problemáticos. Los microorganismos con capacidad para degradar este tipo de sustancias han sido utilizados para la biorremediación de sitios contaminados, las enzimas han mostrado ser excelentes catalizadores desde el punto de vista de selectividad, conversión e impacto ambiental. En este trabajo se estudia la inmovilización de enzimas lipasas expresadas por el hongo *Aspergillus niger* sobre una resina de intercambio iónico con grupos funcionales amínicos, con el empleo del método de unión covalente. A partir de lo anterior y de otros resultados se demuestra que las lipasas obtenidas mediante las técnicas de fermentación en los estados sólido, sumergido e inmovilizado, son efectivas en la remoción de grasas y aceites presentes en los residuales industriales y sintéticos. Los parámetros de la cinética de adsorción se obtuvieron a partir del ajuste de los modelos de pseudoprimer y pseudosegundo órdenes, en este último se describe mejor el proceso cinético de inmovilización. El método de inmovilización desarrollado es de fácil implementación, económicamente atractivo y con alto grado de retención de la enzima.

Palabras clave: enzimas, inmovilización, remoción de grasas y aceites.

ABSTRACT

The conventional methods for removing fats and oils from wastewater, have important disadvantages, such as the need for expensive reagents, low removal efficiency and production of extremely problematic sludge. The use of microorganisms with capacity to degrade this type of polluting substances, has been used for bio-remediation of contaminated sites, because his resistance, increase in catalytic activity and low operational cost. The enzymes have proven to be excellent catalysts for its selectivity, conversion and environmental impact. Based on the above and previous results, this research studies the immobilization of lipase enzymes expressed by fungus *Aspergillus niger* on an ion exchange resin, with amine functional groups using the covalent binding method. It is shown that lipases obtained by fermentation techniques in solid and submerged state and immobilized, they are effective in the removal fats and oils from industrial and synthetic wastewater. The parameters of the adsorption kinetics are obtained by pseudo-first and pseudo-second order models. The pseudo- second order better describes the kinetic process of immobilization. The immobilization method developed is easy to implement, economically attractive and with a high degree of enzyme retention.

Keywords: enzyme, immobilization, removal of oils and fats.

INTRODUCCIÓN

La contaminación de los residuales con aceites y grasas se ha convertido en un problema que genera un gran impacto negativo ambiental, esto se debe a todos los efectos tóxicos que producen en la biosfera y en la salud humana, de plantas y animales. Asimismo, estos agentes tóxicos pueden contaminar cualquier tipo de ambiente en distintos lugares, debido a que provienen de espacios diversos como: centros de trabajo, hogares, hospitales y otros y perjudican todo tipo de habitación natural, por ello es prioridad encontrar alternativas que contribuyan a la mitigación y resolución de esta gran problemática ambiental.

En la actualidad, gracias a los grandes avances en la biotecnología y a sus propiedades intrínsecas, las enzimas se han convertido en importantes herramientas para la catálisis de una amplia variedad de procesos industriales. Entre las aplicaciones más comunes de las enzimas están la síntesis de productos químicos, en la industria de alimentos y farmacéutica, pues presentan claras ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos, como son su mayor especificidad y selectividad, trabajan en condiciones de presión, temperatura y pH moderadas y alcanzan velocidades de reacción similares a los catalizadores químicos, en condiciones más costosas (1).

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

Las lipasas producidas por microorganismos cumplen un papel fundamental en la biodegradación de aceites, debido a que son capaces de desdoblar sustancias químicas que los componen y dar lugar a sustancias más simples, que son fácilmente degradables; además, el uso de los microorganismos productores de enzimas lipolíticas es una gran alternativa pues estas poseen múltiples ventajas y propiedades como su fácil y segura producción, estabilidad y, adicionalmente, se trata de un proceso económico (2).

Los microorganismos con una alta capacidad para producir lipasas pueden ser encontrados en diferentes hábitats, principalmente en desechos o residuos de aceites vegetales empleados en la elaboración de frituras, industrias de productos lácteos, suelos contaminados con aceites y alimentos deteriorados. La producción de lipasas depende de factores ambientales que pueden alterar la reactividad de la enzima, como: temperatura o pH, composición del medio de fermentación: fuente de carbono mixta (compuesta por un carbohidrato y un lípido), nitrógeno y concentración de sales inorgánicas. Además, la síntesis de lipasas se ve favorecida en condiciones aerobias (2).

El uso de las lipasas como biocatalizadoras tiene ventajas, aunque el proceso de aislamiento y purificación es costoso y, una vez aisladas de su entorno natural su estructura es inestable; también, al ser solubles en agua y operar en sistemas de reacción homogéneos, contaminan el producto y no pueden ser recuperadas para su reutilización, lo que se convierte en un problema económico, debido a que parte de la actividad enzimática se pierde.

La inmovilización de enzimas es una herramienta poderosa para mejorar sus propiedades, como por ejemplo, la estabilidad operacional, estabilidad térmica, la especificidad y selectividad, además, se reduce la posible inhibición por el medio o los productos de la reacción. Lo anterior depende, ampliamente, de la naturaleza del soporte y el protocolo de inmovilización que se emplee. La inmovilización supone el anclaje de las enzimas a un soporte sólido insoluble, en el que el movimiento de la enzima en el espacio se ve restringido total o parcialmente y causa un sistema de reacción heterogéneo con las enzimas inmovilizadas, lo que permite llevar a cabo reacciones enzimáticas continuas, controlar la formación de productos y facilitar la remoción de las enzimas de la mezcla de reacción. Si se comparan las enzimas libres con las inmovilizadas, estas últimas son más robustas

y más resistentes a los cambios en el entorno. Generalmente, no hay un método aceptado como el mejor para la inmovilización de todas las enzimas, esto se debe a su composición y diferentes características químicas, las diferentes propiedades de los sustratos y productos y a las aplicaciones del producto, además de las ventajas y desventajas que tienen cada uno de los métodos de inmovilización. Por tanto, las condiciones óptimas para la inmovilización de una enzima y su aplicación se establecen según las propiedades físicas y estructurales del soporte y las propiedades físicas y químicas de la enzima y las especificaciones de proceso para el catalizador, de tal forma que se asegure la retención más alta posible de la actividad enzimática y que se tenga en cuenta su funcionamiento, durabilidad, costo de inmovilización y la toxicidad de los reactivos de inmovilización (3, 4, 5).

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

Actualmente algunas industrias cubanas utilizan esta tecnología, por eso se hace necesario reducir la frecuencia de limpieza de las trampas de grasa en las instalaciones de descarga de residuales de la industria láctea, ya que esto puede contribuir al mejoramiento de este parámetro en las operaciones industriales.

Si se toma en consideración lo anterior y se cumple lo establecido en las normativas cubanas para reducir el impacto que estas sustancias pudieran provocar en el entorno, se hace necesario destinar esfuerzos, cada vez mayores, hacia la búsqueda de cepas lipolíticas que satisfagan estas expectativas. La obtención de productos biológicos para evitar la limpieza de las trampas de grasa promete ser una alternativa más económica que la adquisición de productos importados para estos fines.

De ahí que el objetivo principal de este trabajo sea la obtención de crudos enzimáticos ricos en lipasas para ser inmovilizados en una resina y comprobar su eficiencia en el tratamiento de residuales líquidos ricos en grasas y aceites.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental realizado consta de tres etapas fundamentales. La primera consistió en la obtención de las lipasas, a partir de una cepa de *Aspergillus niger*, por fermentación en estado sólido (FES) (el sustrato sólido seco (sss) utilizado fue salvado de trigo) y fermentación en estado sumergido (FESm), en este caso se utilizaron como fuente de carbono 20 g/L de aceite de oliva y 20 g/L de sacarosa y la fuente de nitrógeno empleada fue $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ al 1 %, además, el aceite de oliva también se utilizó como inductor de enzimas lipasas.

La actividad hidrolítica del crudo enzimático se determinó espectrofotométricamente (UV-VIS spectrophotometer, modelo UV mini 1240), mediante la hidrólisis del propanoato de p-nitrofenilo (pNPP). El método consiste en medir el incremento de absorbancia a 348 nm, debido a la formación de p-nitrofenol como resultado de la hidrólisis de 0.4 mM de pNPP en 25 mM de tampón de fosfato de sodio a pH 7 y 30 °C.

La determinación de proteínas totales se realizó por el método de Bradford, conocido también por el método de Comassie (6, 7).

La segunda etapa correspondió a la inmovilización de las enzimas lipasas obtenidas. La resina empleada es del tipo Lewatit S 3428 (Bayer), que es de intercambio aniónico heterodisperso y macroporoso, débilmente básico, que contiene únicamente grupos amino terciarios con base de poliestireno.

Para obtener los parámetros de la cinética de adsorción se emplearon los modelos de pseudoprimer orden (Modelo de Lagergren) y pseudosegundo orden.

Las mejores condiciones de inmovilización referidas a la concentración inicial de proteínas y el tiempo de contacto entre el crudo enzimático y la resina, se determinaron con la utilización de dos Erlenmeyer colocados en paralelo, con un volumen de líquido de 40 ml, 2 g de resina aniónica cada uno y diferentes concentraciones iniciales de proteínas (2.5, 5 y 7.5 mg/ml), se colocaron en una zaranda a 120 min^{-1} y $30 \text{ }^\circ\text{C}$, se tomaron muestras cada una hora (de 1 a 6 horas). El contenido de cada Erlenmeyer que se extrajo se filtró y se separó así la resina del crudo enzimático. Para obtener y analizar los resultados se desarrolló un diseño experimental factorial 6×3 , se realizaron dos réplicas, para un total de 54 corridas experimentales. La variable respuesta analizada fue la concentración final de proteínas determinadas en el crudo enzimático.

El tiempo de equilibrio fue determinado por medio de estudios de la cinética de adsorción. Estos experimentos relacionan la cantidad de proteínas adsorbidas por la resina, a diferentes tiempos de contacto (Q_{ads} vs t).

Para llevar a cabo la cinética de adsorción se emplearon ocho Erlenmeyer, con 2 g de sólido, 40 ml de líquido con la concentración de proteína inicial óptima, obtenida a partir del desarrollo del diseño de experimento anteriormente descrito. Cada mezcla se sometió a agitación mecánica, se tomaron muestras cada una hora, las cuales se filtraron y se determinó el contenido de proteínas, este proceso se repitió hasta ocho horas. Dicho procedimiento se realizó tres veces. La concentración de proteínas adsorbida por unidad de masa de la resina (Q_{ads}) se determinó con el empleo de la ecuación 1.

$$Q_{\text{ads}} = \frac{(C_0 - C_{\text{eq}}) \cdot V_L}{m_{\text{ads}}} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

Q_{ads} : Cantidad de proteínas adsorbidas por peso unitario de adsorbente (mg/g)

C_0 : es la concentración inicial de proteínas en la solución que se puso en contacto con el adsorbente (mg/L).

C_{eq} : es la concentración de equilibrio de proteínas en el extracto, obtenido después de la adsorción (mg/L)

V_L : es el volumen del líquido extraído después de la adsorción (L)

m_{ads} : es la masa de adsorbente utilizada en cada punto experimental (g)

Los parámetros cinéticos se determinaron a partir de los modelos de pseudoprimer orden (Modelo de Lagergren) y Modelo de pseudosegundo orden, descritos por las ecuaciones 2 y 3, respectivamente.

$$Q_t = Q_{\text{eq}}(1 - e^{-K_L \cdot t}) \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

Q_{eq} y Q_t son las cantidades del ion adsorbidas (mg proteínas/g resina) en el equilibrio y en el tiempo t (min), respectivamente.

K_L (min^{-1}) es la constante de adsorción de Lagergren

$$Q_t = \frac{Q_{\text{eq}}^2 \cdot k \cdot t}{1 + Q_{\text{eq}} \cdot k \cdot t} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde:

Q_{eq} y Q_t son las cantidades de proteínas adsorbidas (mg proteínas/ g resina) en el equilibrio y en el tiempo t (min), respectivamente.

k es la constante de velocidad de pseudosegundo orden para el proceso de adsorción (g/mg/min).

En la tercera etapa de trabajo se evalúa la eficiencia de remoción de grasas y aceites, a partir de las enzimas inmovilizadas, para estudiar la influencia del pH y la masa de resina, en el tratamiento de un residual sintético y otro de procedencia industrial. Para esto se desarrolla un diseño de experimento factorial multinivel 3·2, que considera como variable respuesta el porcentaje de remoción de grasas y aceites y utiliza para ello la enzima obtenida e inmovilizada en una resina con las dos fermentaciones en estudio. La determinación del contenido de grasas y aceites se realizó a partir de ensayo estandarizado (8).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el empleo de la técnica de fermentación en estado sólido (FES), se obtuvo un crudo enzimático a partir del hongo *Aspergillus niger*, con una concentración de proteínas totales de 0.368 mg/ml y una actividad enzimática de 8.953 U/g sss y para la fermentación en estado sumergido los valores de concentración de proteínas fueron de 0.120 mg/ml y 0.6973 U/ml para la actividad enzimática. Al realizar el análisis del diseño de experimento correspondiente a la inmovilización de proteínas, con la utilización del programa *Statgraphics Centurion XV.1*, se obtuvieron los resultados:

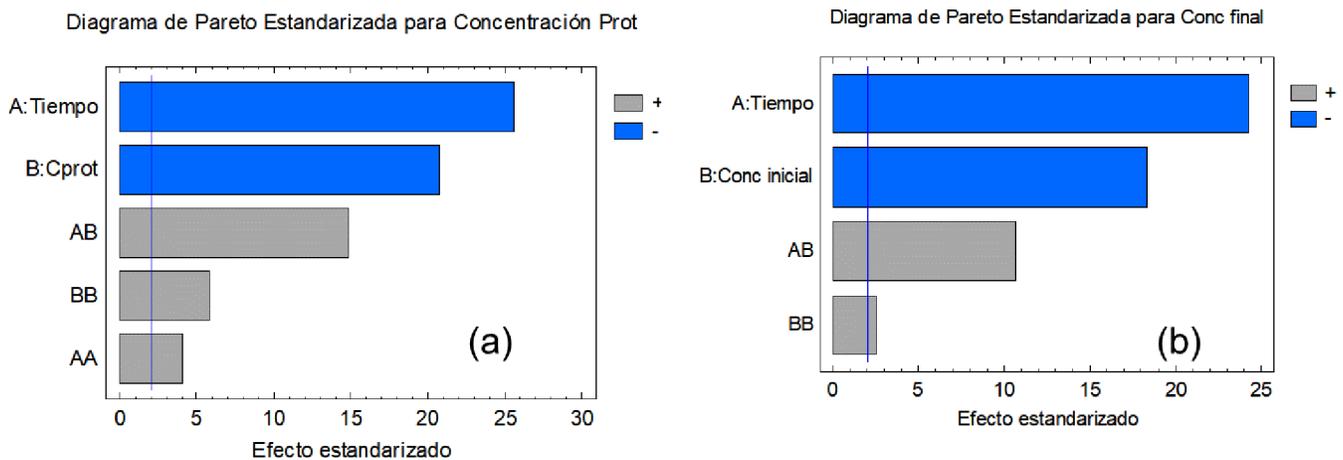


Figura 1. Diagrama de Pareto estandarizado para concentración final de proteínas. (a): FES, (b): FESm.

En la figura 1 se observan los diagramas de Pareto que demuestran que, tanto los factores como sus interacciones son significativos en la concentración final de proteínas, para los dos tipos de fermentaciones empleadas. En el caso del tiempo y la concentración inicial de proteínas el efecto resultó ser negativo, esto indica que un aumento de ambos factores provoca una disminución en la concentración final de proteínas. En cuanto a las interacciones múltiples se muestra que todas influyen de forma positiva, por lo que un aumento de estas provoca el mismo efecto en la concentración final de proteínas, lo que afecta el proceso de inmovilización. Los valores mejores de los factores analizados se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de la minimización para la concentración final de proteínas

Factor	FES	FESm	Valor
Tiempo de inmovilización (h)	6.0		Mejor
Concentración inicial de proteínas (mg/ml)	4.87608	5.78	Óptimo

Se determinó experimentalmente que se inmoviliza, como promedio, una masa de proteína de 195 mg, para la FES y de 231 mg para FESm.

Tiempo de equilibrio

Teniendo en cuenta que los mejores resultados en cuanto a cantidad de proteínas lipasas inmovilizadas en la resina aniónica se obtienen con la utilización de la FESm, la cinética de inmovilización de estas enzimas se realiza con el crudo enzimático resultante de esta fermentación.

La curva que relaciona las cantidades inmovilizadas de proteínas por gramo de resina en función del tiempo se muestra en la figura 2.

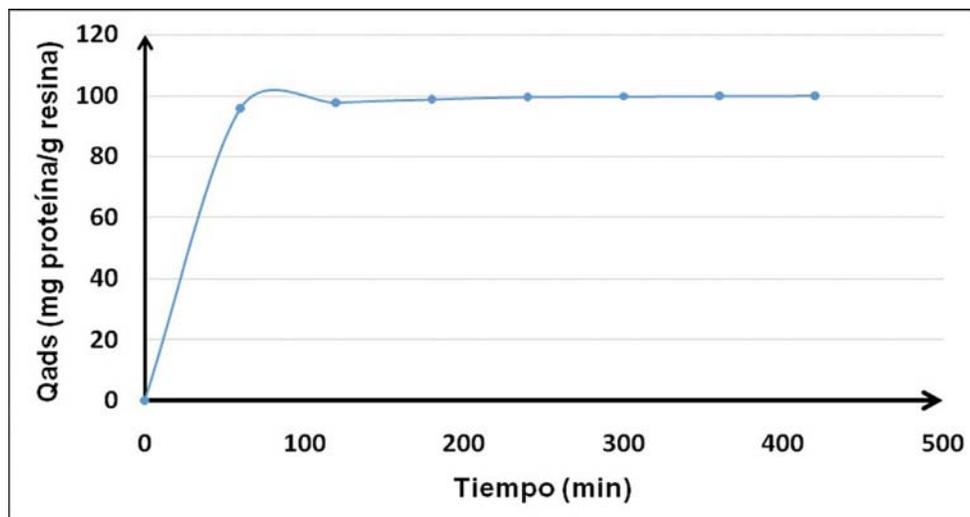


Figura 2. Cinética de inmovilización de las lipasas.

En la curva que representa la cinética de inmovilización de las enzimas, presentada en la figura anterior se observa que, desde los primeros minutos, existe un incremento paulatino de la cantidad adsorbida de proteínas. En este sentido, se apreció una primera zona hasta los 100 minutos y, a partir de este tiempo, se formó una meseta que indicó que se había alcanzado el estado de equilibrio, lo que establece el intervalo de tiempo requerido para la obtención de la mayor inmovilización de la enzima lipasa en la resina de intercambio aniónico empleada.

Parámetros de la cinética de adsorción

En las figuras 3 y 4 se muestran los ajustes respectivos de la cinética de inmovilización de las lipasas obtenidas para ambos modelos.

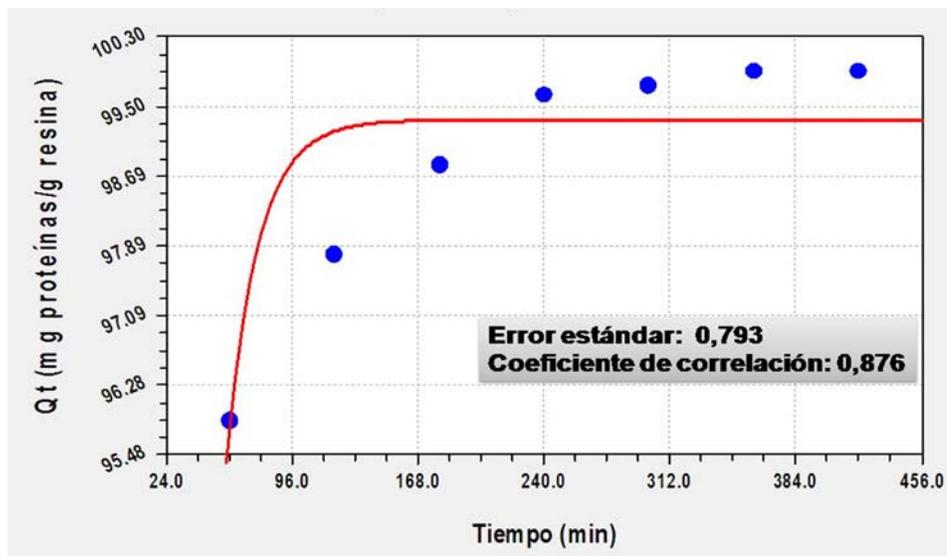


Figura 3. Ajuste al modelo cinético de pseudoprimer orden.

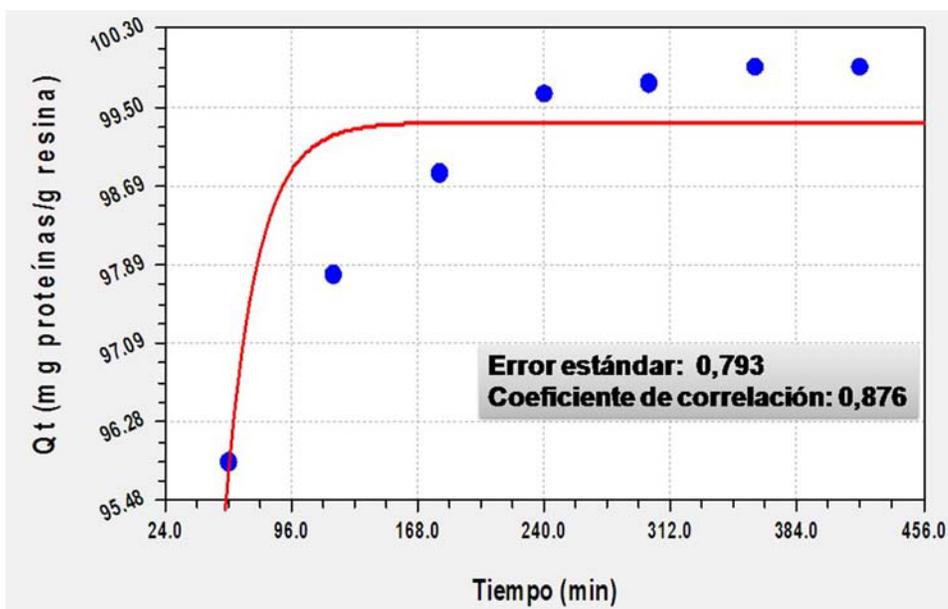


Figura 4. Ajuste al modelo cinético de pseudosegundo orden.

El análisis de los resultados obtenidos, al aplicar los modelos cinéticos, indicó que el proceso de inmovilización de las enzimas se describe mejor con el modelo de pseudosegundo orden. Esta afirmación se basa en el análisis de los coeficientes de correlación y en la comparación entre el valor de la cantidad de enzima adsorbida, según los resultados experimentales y el valor de este parámetro calculado con cada uno de los modelos, el resumen de los resultados obtenidos se reporta en la tabla 2.

Tabla 2. Resumen de los parámetros de la cinética de adsorción

Modelo cinético	Parámetros	
Pseudoprimer orden	Q_{eq} calculada (mg proteínas/g resina)	99.34
	Q_{eq} experimental (mg proteínas/g resina)	98.24
	K_L (min^{-1})	0.0055
	R^2	87.6 %
Pseudosegundo orden	Q_{eq} calculada (mg proteínas/g resina)	100.68
	Q_{eq} experimental (mg proteínas/g resina)	99.94
	K (g/mg min)	0.0031
	R^2	99.1 %

Los resultados reportados en la tabla anterior muestran que el modelo de pseudosegundo orden, describe adecuadamente el proceso cinético de inmovilización de las enzimas lipasas en la resina de intercambio aniónica utilizada como adsorbente. Esto indica que el proceso ocurre, principalmente, como resultado de la quimisorción, teniendo en cuenta que el modelo de pseudosegundo orden considera que la velocidad del paso limitante está dada por la quimisorción, que involucra fuerza de valencia a través del intercambio o compartimiento de electrones entre el adsorbato y el adsorbente.

A partir de lo anteriormente expuesto se puede plantear que las enzimas inmovilizadas sobre la resina, que tiene grupos funcionales amino, se adsorben químicamente mediante enlaces covalentes entre los grupos amino de la resina y los de la enzima y finaliza la enzima inmovilizada con una conformación estructural cerrada, debido a los enlaces de tipo covalente.

Remoción de grasas y aceites en los residuales estudiados

El residual sintético preparado tiene un contenido de grasas y aceites de 1.2369 mg/L. Para determinar las mejores condiciones de remoción de grasas y aceites en un residual sintético se estudia la influencia del pH y la masa de resina, en la tabla 3 se muestran los resultados del diseño de experimento desarrollado.

Tabla 3. Influencia del pH y masa de la resina

No. Corrida	pH	Masa resina (g)	Remoción de grasas y aceites (%)	
			FES	FESm
1	7	2	93.5	90.0
1	6	1	70.05	75.0
1	8	1	94.3	95.0
1	6	2	81.3	83.0
1	8	2	97.1	98.3
1	7	1	87.8	90.0
2	8	2	93.5	98.8
2	6	2	83.5	85.1
2	8	1	93.6	96.1
2	6	1	71.3	72.9
2	7	2	92.9	96.0
2	7	1	88	91.3
3	6	2	81.3	86.3
3	8	1	95.1	94.9
3	6	1	72.1	76.32
3	8	2	97.6	97.64
3	7	1	88.6	89.0
3	7	2	95.1	95.0

Del análisis estadístico de los resultados mostrados en la tabla 3 se obtiene el diagrama de Pareto reportado en la figura 5. Es importante señalar que este responde al análisis de los resultados obtenidos para las enzimas inmovilizadas provenientes de las dos fermentaciones empleadas.

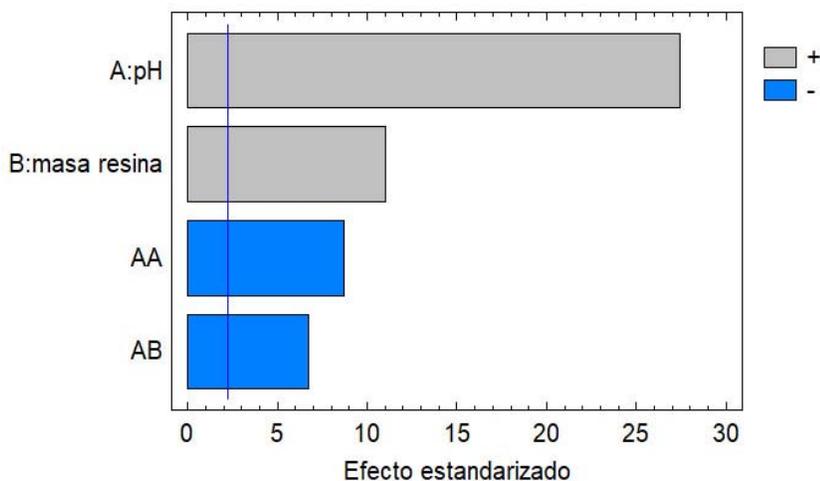


Figura 5. Diagrama de Pareto de la influencia del pH y masa de la resina.

Para el gráfico anterior se observan los factores y las interacciones que son significativas. En el caso del pH y la masa de resina influyen de manera positiva, lo que indica que un aumento de estos provoca un incremento en el porcentaje de remoción de grasas y aceites del residual sintético.

Los modelos obtenidos para la descripción del comportamiento de la variable respuesta se presentan por la ecuación 4 para el caso de la FES y por la 5 para la FESm, en ellas se observa la similitud en el comportamiento del porcentaje de remoción de grasas y aceites.

$$\%R_{\text{grasas}} = -280.63 + 87.39\text{pH} + 38.13m_{\text{resina}} - 5.0875\text{pH}^2 - 4.57\text{pH} \cdot m_{\text{resina}} \quad \text{Ec. 4}$$

$$\%R_{\text{grasas}} = -190.04 + 64.32\text{pH} + 30.53m_{\text{resina}} - 3.603\text{pH}^2 - 3.57\text{pH} \cdot m_{\text{resina}} \quad \text{Ec. 5}$$

Donde:

$\% R_{\text{grasas}}$ es el porcentaje de remoción de grasas, m_{resina} es la masa de la resina (g).

Se realiza un Análisis de varianza para los dos casos estudiados. Se puede plantear que el estadístico R-Cuadrado indica que los modelos, así ajustados, explican 98.91 % (96.75 % FESm) de la variabilidad en la concentración final de proteínas. El estadígrafo R-cuadrado ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 98.58 % (95.75 % FESm). El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 1.1736 (1.8383 FESm). El error medio absoluto (MAE) de 0.678 (1.0627 % FESm) es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5.0 %, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5.0 %. Si se tienen en cuenta estos resultados se considera que los modelos representados por las ecuaciones 4 y 5 son adecuados para predecir el comportamiento del porcentaje de remoción de grasas y aceites en el residual sintético estudiado.

Tabla 4. Mejores valores de pH y masa de resina

Parámetro	Bajo	Alto	FES	FESm	Valor
pH	6.0	8.0	7.69	7.93	Óptimo
Masa de resina (g)	1.0	2.0	2.0		Mejor

Con los valores de los parámetros reportados en la tabla anterior se realizaron tres corridas experimentales en cada caso. De estos ensayos se obtuvieron valores máximos de porcentaje de remoción de grasas y aceites en el residual sintético de 98.1 % para las enzimas inmovilizadas obtenidas a partir de la FES y de 97.77 % para la FESm.

A partir de las mejores condiciones obtenidas para el residual sintético se monitoreó la eficiencia de remoción de las grasas y aceites de un residual industrial y se obtuvieron los resultados que se reportan en la tabla 5.

Tabla 5. Remoción de grasas y aceites en el residual industrial

Tiempo (días)	FES		FESm	
	Grasas y aceites (mg/L)	Remoción de grasas y aceites (%)	Grasas y aceites (mg/L)	Remoción de grasas y aceites (%)
1	56	40.42	60	36.17
2	23	75.53	32	65.95
3	10	89.36	13	86.17
4	10	89.36	12	87.23

En la tabla 5 se observa que la máxima remoción de grasas y aceites se alcanza entre los días tres y cuatro, pero ya desde el segundo día se logran valores de este parámetro que cumplen con la norma cubana de vertimiento a cuerpos receptores terrestres (9). Los resultados obtenidos se corresponden con estudios reportados en la literatura consultada (10, 11, 12).

En cuanto a la comparación de los resultados en las enzimas obtenidas, en las dos fermentaciones estudiadas no existen diferencias significativas, lo cual es posible afirmar a partir de una prueba de hipótesis, donde el P-valor (0.7189) resultó ser superior a 0.05.

CONCLUSIONES

1. Con el empleo de la técnica de fermentación en estado sólido, se obtuvo un crudo enzimático a partir del hongo *Aspergillus niger*, con una concentración de proteínas totales de 0.368 mg/ml y una actividad enzimática de 8.953 U/g sss y para la fermentación en estado sumergido los valores de concentración de proteínas fueron de 0.120 mg/ml y 0.6973 U/ml para la actividad enzimática.
2. En la FES se determinaron las mejores condiciones para la inmovilización de enzimas lipasas en una resina de intercambio iónico, a las 6 horas, con una concentración inicial de proteínas de 4.88 mg/ml y en la FESm, con el mismo tiempo, la concentración inicial de proteínas fue de 5.78 mg/ml.
3. El proceso de inmovilización de las lipasas alcanzó el estado de equilibrio a los 100 minutos. La cinética de inmovilización es descrita por el modelo de pseudosegundo orden y se considera que este proceso se desarrolla en mayor proporción por quimisorción.
4. Los valores de remoción de grasas y aceites en los residuales estudiados fueron superiores al 96 % (residual sintético) y 89 % (residual industrial), para pH de ocho, con el empleo de 2 g de masa de resina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martínez, K. Evaluación de parámetros de operación en un reactor de lecho empacado a flujo para la obtención de galactooligosacáridos mediante enzimas inmovilizadas. Tesis previa a la obtención del Título de Ingeniera agroindustrial. Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y ambientales. Universidad Técnica del Norte. Ibarra-Ecuador, 2022.
2. Martínez, R. *et al.* Hongos y levaduras: fábricas de lipasas. *Interciencia*, vol. 44, no. 7, pp. 378-385 Asociación Interciencia Venezuela, 2019.
3. Arana, S. *et al.* Efectos de las condiciones de carga e inmovilización enzimática sobre las características catalíticas de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada en partículas de octil agarosa. *Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 8, No. 36. Febrero 2020.
4. Arana, S. Inmovilización y co-inmovilización de lipasas utilizando soportes hidrofóbicos. Nuevas estrategias para reusar las enzimas más estables en los combi-biocatalizadores. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, 2021.
5. Arana, S. *et al.* Inmovilización de lipasas mediante activación interfacial sobre soportes hidrofóbicos: Producción de bibliotecas de biocatalizadores mediante la alteración de las condiciones de inmovilización. *Catalisys Today* 362, 130 – 140. 2021.
6. Guerra, B. Tratamiento de residuales oleaginosos empleando enzimas inmovilizadas en un lecho poroso. Memoria escrita presentada en opción al Título de Máster en Ingeniería Ambient-

- tal. Facultad de Ingeniería Química, Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría, Cujae. Cuba, 2014.
7. Morantes, M. Evaluación de la Actividad Hidrolítica de un Extracto Enzimático de *Candida palmioleophila* Libre e Inmovilizado en Nanopartículas de Óxido de Hierro. Maestría en Biotecnología. Universidad de Santander, Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agropecuarias. Bucaramanga, 2022.
 8. APHA 5520-D. Standard Methods for the examination of water and wastewater., in, A.P.H. Assotciation, Editor APHA _AWWA_ WEF, 23st ed: 15th Street, NW Washington, DC, United States of America, 2017, pp. 244-540.
 9. Norma Cubana NC-27-2012. Vertimientos de las aguas al sistema de alcantarillado y cuerpos receptores terrestres.
 10. Hassan, A. *et al.* Application and characterization of crude fungal lipases used to degrade fat and oil wastes. Scientific Reports [en línea]. Pp. 110, 2021. Disponible en <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98927-4>.
 11. Pinheiro de Lima, A. *et al.* Obtaining filamentous fungi and lipases from sewage treatment plant residue for fat degradation in anaerobic reactors [en línea]. Pp. 1-19, 2018. Disponible en <https://peerj.com/articles/5368/>.
 12. Sanghamitra, P. *et al.* Toxic / Hazardous Substances and Environmental Engineering Treatment of wastewater containing oil and grease by biological method- a review. Journal of Environmental Science and Health, Part A [en línea]. vol. 56, no. 4, pp. 394412, 2021. Disponible en <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10934529.2021.1884468>.