



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Inmovilización de lipasa en soporte de acero inoxidable para la  
producción de sabores enzimáticos lácteos**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Presenta:**  
Sandra Díaz Camacho

**Dirigido por:**  
Dra. Blanca Estela García Almendárez.

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Enero 2020



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Inmovilización de lipasa en soporte de acero inoxidable para la producción de sabores enzimáticos lácteos**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Presenta:**

Sandra Díaz Camacho

**Dirigido por:**

Dra. Blanca Estela García Almendárez

Dra. Blanca Estela García Almendárez  
Presidente

Dr. Carlos Regalado González  
Secretario

Dr. Eduardo Castaño Tostado  
Vocal

Dr. Aldo Amaro Reyes  
Suplente

Dra. Monserrat Escamilla García  
Suplente

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Enero 2020

## RESUMEN

La tecnología enzimática ofrece una alternativa para la biosíntesis de sabores naturales, utilizando enzimas que catalizan la producción de compuestos relacionados con el sabor a partir de moléculas precursoras. La inmovilización y reutilización de las enzimas podría hacer más eficientes los procesos de producción de sabores enzimáticos. El objetivo de este trabajo fue la inmovilización de la lipasa pancreática de cerdo en un soporte de acero inoxidable y su aplicación en la elaboración de sabor enzimático lácteo. Se realizó una funcionalización del soporte con quitosano y un entrecruzamiento con glutaraldehído (GA) y genipino (GE). En una muestra de lipasa comercial se obtuvo un contenido de proteína de  $28.2 \pm 0.048$  % y mediante un análisis electroforético se obtuvo que el 29.9 % de la proteína separada correspondía a la enzima lipasa. Una vez funcionalizado el soporte, se inmovilizó  $169.04$  mg de lipasa/m<sup>2</sup> con el uso de GA y  $131.9$  mg/m<sup>2</sup> con el uso de GE. Se obtuvo una eficiencia de inmovilización para el uso de GA de 8.42 % y de 7.80 % con GE. Se realizó un diseño experimental 3<sup>2</sup> para determinar las condiciones de tiempo y pH de la etapa de entrecruzamiento para obtener la máxima actividad enzimática (AE) con cada agente entrecruzante, con AE como variable respuesta. La mayor AE se obtuvo en el tratamiento de pH 4.5 y 3 h para GE ( $404.4 \pm 10.9$  nM min<sup>-1</sup>) y pH 7 por 6 h para GA ( $436.9 \pm 6.1$  nM min<sup>-1</sup>). Se determinó el efecto del pH y temperatura sobre la actividad enzimática, obteniendo la mayor actividad enzimática para la enzima libre en pH 9 y 50°C y para la enzima inmovilizada, utilizando tanto GE como GA, en pH 10 y 65 °C. Se obtuvieron 5 ciclos de reúso para GA y 4 ciclos para GE manteniendo una actividad residual superior al 70 %. Las enzimas inmovilizadas pueden almacenarse a 4 °C durante 3 semanas manteniendo una actividad residual superior al 50 %. Se elaboró sabor enzimático utilizando las enzimas inmovilizadas, evidenciando la presencia de ácidos grasos relacionados al sabor lácteo mediante análisis de cromatografía de gases (acético, butanoico, hexanoico, octanoico, decanoico). La utilización de lipasa inmovilizada es una opción viable para la elaboración de sabor enzimático lácteo y es necesaria una exploración más amplia de las condiciones del proceso de inmovilización que permitan una mayor eficiencia y una mayor AE.

**Palabras clave:** inmovilización, lipasa, sabor enzimático.

## ABSTRACT

Enzyme technology offers an option for natural flavor biosynthesis, using enzymes that catalyze the production of flavor-related compounds from precursor molecules. Immobilization and reuse of enzymes is an efficient alternative for the production of enzymatic flavors. The aim of this work was the immobilization of the pancreatic pig lipase in a stainless steel support and its application in the elaboration of dairy enzymatic flavor. A functionalization of the support with chitosan and a cross-linking with glutaraldehyde (GA) and genipin (GE) was made. A protein content of  $28.2 \pm 0.048$  % was obtained in the commercial lipase sample and 29.9% of the separated protein corresponded to lipase according to electrophoretic analysis. Using the proposed methodology, 169.04 mg of lipase per  $m^2$  of support was immobilized with the use of GA and 131.9 mg per  $m^2$  with the use of GE. An immobilization efficiency was obtained for the use of GA of 8.42 % and of 7.80 % with GE. An experimental design  $3^2$  was carried out to determine the time and pH conditions of the cross-linking stage of maximum enzymatic activity (EA) with each cross-linking agent, with EA response variable. The highest EA was obtained in the treatment of pH 4.5 and 3 hours for GE ( $404.4 \pm 10.9$  nM  $min^{-1}$ ) and pH 7 and 6 hours for GA ( $436.9 \pm 6.1$  nM  $min^{-1}$ ). The effect of pH and temperature on the enzymatic activity was determined, obtaining the highest enzymatic activity for the free enzyme at pH 9 and 50 °C and for the immobilized enzyme, using both GE and GA, at pH 10 and 65 °C. 5 reuse cycles were obtained for GA and 4 cycles for GE maintaining a residual activity greater than 70 %. Immobilized enzymes can be stored at 4 °C for 3 weeks maintaining a residual activity greater than 50 %. The enzymatic flavor was elaborated using the immobilized enzymes, evidencing the presence of fatty acids related to dairy flavor by gas chromatography analysis (acetic, butanoic, hexanoic, octanoic, decanoic). The use of immobilized lipase is a viable option for the elaboration of dairy enzymatic flavor. Broader exploration of the conditions of the immobilization process may allow greater efficiency and EA.

**Key words:** immobilization, lipase, enzymatic flavor.

## DEDICATORIA

A mi esposo por su apoyo incondicional.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

A la Dra. Blanca E. García Almendárez, por aceptarme en su equipo de trabajo y trabajar en su laboratorio, por su guía y sus enseñanzas. Por ser un ejemplo para mí de superación, trabajo y excelencia.

Al Dr. Carlos Regalado González, por su apoyo, enseñanzas y orientación en el proyecto, fueron muy valiosos. Por ser un modelo a seguir en el gusto y pasión por el trabajo y la investigación.

Al Dr. Aldo por su apoyo en el proyecto, por compartirme sus conocimientos y el interés y disposición que siempre mostró. Por intentar hacer más ligeras nuestras preocupaciones.

A la Dra. Monserrat Escamilla García por su orientación, por sus ideas, aportaciones y comentarios para el desarrollo de este proyecto, además de su disposición por ayudarnos cuando empezamos a trabajar en el laboratorio.

Al Dr. Castaño que encontraba el tiempo dentro de todas sus actividades para atender mis dudas y su ayuda para clarificar el objetivo de mi trabajo, que preguntas quería contestarme con el desarrollo del proyecto.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química, por su apoyo y facilidades otorgadas, especialmente a Carmelita que siempre muestra interés y disposición.

A mi esposo, que siempre me alentó a seguir mis sueños, por brindarme su apoyo en todo momento, por escucharme y darme fuerzas y amor para continuar.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biotecnología de Alimentos, especialmente a Angie, Karla y Keila por su apoyo, su motivación y por su valiosa amistad.

A mis compañeros y amigos de generación por su amistad y apoyo.

## ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
<b>RESUMEN</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>ii</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
2.1    PRODUCCIÓN DE SABORES ENZIMÁTICOS.....	3
2.1.1    DESARROLLO DE SABORES LÁCTEOS.....	4
2.2    ENZIMAS LIPOLÍTICAS.....	8
2.2.1    LIPASA PANCREÁTICA DE CERDO.....	10
2.3    INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA.....	11
2.3.1    INMOVILIZACIÓN COVALENTE.....	14
2.3.2    FISISORCIÓN.....	18
2.4    MATERIALES UTILIZADOS EN LA INMOVILIZACIÓN.....	19
2.4.1    ACERO INOXIDABLE.....	21
2.4.2    QUITOSANO.....	25
2.4.3    GENIPINO.....	27
2.4.4    GLUTARALDEHÍDO.....	29
2.4.5    ESQUEMAS HIPOTÉTICOS DE LA FORMACIÓN DE ENLACES E INTERACCIONES EN EL SISTEMA DE INMOVILIZACIÓN.....	32
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
3.1    OBJETIVO GENERAL.....	35
3.2    OBJETIVOS PARTICULARES.....	35

<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>36</b>
4.1 MATERIALES	36
4.2 MÉTODOS	37
4.2.1 CONTENIDO DE PROTEÍNA DE LA ENZIMA COMERCIAL LIPASA P	37
4.2.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECILSULFATO DE SODIO (SDS-PAGE)	37
4.2.3 INMOVILIZACIÓN DE LIPASA EN PLACAS DE ACERO INOXIDABLE	38
4.2.4 DETERMINACIÓN DE CANTIDAD DE ENZIMA INMOVILIZADA	43
4.2.5 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA	44
4.2.6 EFICIENCIA DE LA INMOVILIZACIÓN	46
4.2.7 PROPIEDADES TÉRMICAS Y CINÉTICAS DE LA ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA	47
4.2.8 CICLOS DE REÚSO CON SUSTRATO SINTÉTICO	48
4.2.9 TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE LAS PLACAS CON ENZIMA INMOVILIZADA	48
4.2.10 INTERACCIONES ENTRE LOS COMPONENTES DE LA INMOVILIZACIÓN	49
4.2.11 MORFOLOGÍA SUPERFICIAL DEL SISTEMA DE INMOVILIZACIÓN	49
4.2.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>
5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA LIBRE	51
5.1.1 DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE PROTEÍNA	51
5.1.2 SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA	51
5.2 INMOVILIZACIÓN DE LIPASA EN SOPORTE DE ACERO INOXIDABLE	52
5.3 EFICIENCIA DE LA INMOVILIZACIÓN	53
5.4 DISEÑO EXPERIMENTAL: PH Y TIEMPO DE ENTRECruzAMIENTO	53
5.5 EFECTO DE LA TEMPERATURA Y PH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	56
5.6 PARÁMETROS CINÉTICOS $K_M$ Y $V_{MAX}$	62
5.7 ELABORACIÓN DE SABOR ENZIMÁTICO LÁCTEO	63
5.8 CICLOS DE REÚSO	65
5.9 ALMACENAMIENTO DE LA ENZIMA INMOVILIZADA	67
5.10 ANÁLISIS DE LA COMPOSICION Y ESTRUCTURA SUPERFICIAL DE LA	



<u>INMOVILIZACIÓN</u>	69
5.10.1 ESPECTROSCOPÍA FOTOELECTRÓNICA DE RAYOS X (XPS)	69
5.10.2 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO SEM	70
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>74</b>
<b>7. REFERENCIAS</b>	<b>76</b>
<b>8. APENDICES</b>	<b>85</b>

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Rutas bioquímicas que conducen a la formación de compuestos de sabor (Marilley, 2003).	5
2	Reacción enzimática de una lipasa catalizando la hidrólisis y síntesis de un triacilglicerol. TAG: triacilglicérido, AGL: ácido graso libre (Stehr <i>et al.</i> , 2003).	8
3	Reacciones catalizadas por lipasas (Houde <i>et al.</i> , 2004).	9
4	Diagrama de cinta esquemático de la estructura de lipasa-colipasa porcina. (Hermoso <i>et al.</i> , 1996).	11
5	Clasificación de los métodos de inmovilización.	14
6	Estructura de la quitina, quitosano y celulosa (Krajewska, 2004).	27
7	Estructura química del genipino, planta y fruto de <i>Gardenia jasminoides</i> de donde se extrae el genipósido.	28
8	Ilustración hipotética de la red de genipino entrecruzado con quitosano-lipasa (Chiou <i>et al.</i> , 2007).	29
9	El glutaraldehído puede reaccionar teóricamente con los grupos -NH <sub>2</sub> a través de dos mecanismos distintos: la base de Schiff y la adicción de tipo Michael (Barbosa <i>et al.</i> , 2014; Migneault <i>et al.</i> , 2004).	31
10	Enlaces formados al funcionalizar la superficie del acero inoxidable con una capa de quitosano.	32

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
11	Entrecruzamiento de quitosano con (a) glutaraldehído y (b) genipino.	33
12	Enlaces formados en la inmovilización de lipasa en un soporte de acero inoxidable funcionalizado con quitosano y entrecruzado con genipino.	33
13	Enlaces formados en la inmovilización de lipasa en un soporte de acero inoxidable funcionalizado con quitosano y entrecruzado con glutaraldehído.	34
14	Diagrama general de proceso de inmovilización de lipasa en acero inoxidable.	39
15	Pretratamiento de las placas de acero inoxidable con solución piraña en baño maria.	40
16	Placas de acero inoxidable después de la funcionalización con quitosano y el tratamiento con hidróxido de amonio.	41
17	Placa de acero con la lipasa inmovilizada (a) con genipino y (b) con glutaraldehído.	43
18	Preparación y recubrimiento con oro de las muestras a analizar por microscopía electrónica de barrido.	50
19	Gel de electroforesis obtenido. Carril 1 L= lipasa, carril 2 WM=marcador de peso molecular.	52
20	Gráfica de interacción de los factores tiempo y pH en la etapa de entrecruzamiento con genipino, (actividad enzimática expresada en $nM \text{ min}^{-1}$ y tiempo en h).	54

Figura		Página
21	Gráfica de interacción de los factores tiempo y pH en la etapa de entrecruzamiento con glutaraldehído, (actividad enzimática expresada en $\text{nM min}^{-1}$ y tiempo en h).	56
22	Liberación de <i>p</i> - nitrofenol ( $\mu\text{M}$ ) a través del tiempo, utilizando lipasa libre.	57
23	Liberación de <i>p</i> - nitrofenol ( $\mu\text{M}$ ) a través del tiempo, utilizando lipasa inmovilizada con ambos agentes entrecruzantes.	57
24	Determinación del efecto del pH sobre la actividad enzimática de la enzima libre. (a) <i>p</i> - nitrofenol liberado en sustrato preparado a diferentes valores de pH. (b) Actividad enzimática en sustrato preparado a diferentes valores de pH.	58
25	Determinación del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la enzima libre. (a) <i>p</i> - nitrofenol liberado en la reacción incubada diferentes temperaturas. (b) Actividad enzimática en la reacción incubada diferentes temperaturas.	59
26	Determinación del efecto del pH sobre la actividad enzimática de la enzima inmovilizada, con glutaraldehído como agente entrecruzante. (a) <i>p</i> - nitrofenol liberado en sustrato preparado a diferentes valores de pH. (b) Actividad enzimática en sustrato preparado a diferentes valores de pH.	60
27	Determinación del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la enzima inmovilizada, utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante. (a) <i>p</i> - nitrofenol liberado en la reacción incubada a diferentes temperaturas. (b) Actividad enzimática en la reacción incubada a diferentes temperaturas.	60

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
28	Determinación del efecto del pH sobre la actividad enzimática de la enzima inmovilizada, con genipino como agente entrecruzante. (a) p- nitrofenol liberado en sustrato preparado a diferentes valores de pH. (b) Actividad enzimática en sustrato preparado a diferentes valores de pH.	61
29	Determinación del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la enzima inmovilizada, con genipino como agente entrecruzante. (a) p- nitrofenol liberado en la reacción incubada a diferentes valores temperatura. (b) Actividad enzimática en la reacción incubada a diferentes valores temperatura.	61
30	Gráfica Lineweaver-Burk de la enzima libre.	63
31	Gráfica Lineweaver-Burk de la enzima inmovilizada, (a) con glutaraldehído (b) con genipino, como agentes entrecruzantes.	63
32	Ciclos de reuso de la lipasa inmovilizada con glutaraldehído. (a) Actividad remanente después de cada ciclo y (b) actividad relativa.	66
33	Ciclos de reuso de la lipasa inmovilizada con genipino. (a) Actividad remanente después de cada ciclo y (b) actividad relativa.	67
34	Grafica de estabilidad durante el almacenamiento (a) Retención de la actividad enzimática de la lipasa inmovilizada con genipino y con glutaraldehído, durante 6 semanas. (b) actividad relativa.	68

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
35	Análisis elemental XPS de la placa de acero inoxidable y las etapas de inmovilización.	70
36	Micrografías obtenidas mediante SEM de la etapa de funcionalización con quitosano, (A) 2500 X, (B) 5000 X, (C) 10000 X.	71
37	Micrografías obtenidas mediante SEM de la etapa de entrecruzamiento con genipino. (A) 2500 X, (B) 5000 X, (C) 10000 X.	72
38	Micrografías obtenidas mediante SEM de la etapa de entrecruzamiento con glutaraldehído. (A) 2500 X, (B) 5000 X, (C) 10000 X.	72
39	Micrografías obtenidas mediante SEM de la inmovilización de lipasa utilizando genipino. (A) 2500 X, (B) 5000 X, (C) 10000 X.	73
40	Micrografías obtenidas mediante SEM de la inmovilización de lipasa utilizando glutaraldehído. (A) 2500 X, (B) 5000 X, (C) 10000 X.	73

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Compuestos aislados como sabores en varios quesos (Marilley, 2003).	7
2	Tablas de composición química de acero inoxidable austenítico, estándar europeo 10088-2 (British Stainless Steel Association, 2018).	23
3	Tipos de acabado superficial de acero inoxidable (British Stainless Steel Association, 2018).	24
4	Diseño experimental en la etapa de entrecruzamiento con genipino, para encontrar las condiciones de pH y tiempo de máxima actividad enzimática.	41
5	Diseño experimental en la etapa de entrecruzamiento con glutaraldehído, para encontrar las condiciones de pH y tiempo de máxima actividad enzimática.	42
6	Preparación de curvas estándar de p-nitrofenol, a) $5 \times 10^{-5}$ M. b) $1 \times 10^{-4}$ M.	44
7	Cantidad de enzima y quitosano en la inmovilización sobre placas de acero inoxidable.	53
8	Resultados del diseño experimental en la etapa de entrecruzamiento con genipino.	54
9	Resultados del diseño experimental en la etapa de entrecruzamiento con glutaraldehído.	55
10	KM y VMAX de lipasa libre e inmovilizada.	62

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
11	Resultados de análisis bromatológico realizado al sustrato lácteo.	64
12	Resultados del análisis de cuantificación de ácidos grasos presentes en las muestras de sabor enzimático y sustrato lácteo mediante cromatografía de gases, expresado en ppm.	65

Dirección General de Bibliotecas UAQ



## 1. INTRODUCCIÓN

Los ésteres de ácidos y alcoholes de cadena corta se conocen como compuestos de sabor y fragancia en los alimentos. Las crecientes demandas de los consumidores preocupados por temas de salud están aumentando las solicitudes de ingredientes alimentarios naturales. Sin embargo, las fuentes comunes de compuestos de sabor natural no son suficientes para satisfacer estas solicitudes del mercado y, a menudo, su extracción directa de las plantas implica procesos caros y de bajo rendimiento (Spinelli *et al.*, 2014). La tecnología enzimática ofrece una opción muy prometedora para la biosíntesis del sabor natural, varias enzimas catalizan la producción de compuestos relacionados con el aroma a partir de moléculas precursoras. La biotransformación de estos compuestos es un potencial de considerable interés para la aplicación en la industria del sabor de los alimentos.

La grasa láctea modificada muestra notas de sabor distintas según el grado de hidrólisis parcial (lipólisis). Debido a su efecto sobre el sabor, la grasa de leche hidrolizada con enzimas lipolíticas (GLH) es un ingrediente ampliamente utilizado e importante en la industria alimentaria. Las enzimas lipolíticas son ubicuas en la naturaleza y juegan papeles esenciales en los procesos de fabricación de GLH. Tanto las lipasas como las estererasas se usan comúnmente para producir los sabores deseados en los productos lácteos (Peng *et al.*, 2014).

Las lipasas se encuentran entre las enzimas más versátiles y tienen una amplia variedad de aplicaciones industriales debido a la multiplicidad de reacciones que catalizan. La versatilidad de la lipasa conduce a múltiples aplicaciones industriales en la fabricación de alimentos y sabores, productos farmacéuticos, síntesis de ésteres de carbohidratos, aminas, amidas, biodetergentes, cosméticos y perfumería (IUPAC, 1997).

La inmovilización de enzimas juega un papel importante dentro de la biotecnología aplicada. La razón principal para inmovilizar enzimas es la

capacidad de aislar el biocatalizador del producto de reacción y reutilizarlo para aumentar su productividad. Para reacciones catalizadas por lipasa (triacilglicerol hidrolasa), la inmovilización puede ayudar a proporcionar condiciones no acuosas necesarias para la síntesis de ésteres y la interesterificación (Christensen *et al.*, 2003).

Existen varias alternativas de materiales de soporte a utilizar en la inmovilización, entre las cuales se encuentra el acero inoxidable, que debido a sus características como resistencia, disponibilidad, compatibilidad con biorreactores y con productos alimenticios, es una de las opciones viables.

Para utilizar el acero inoxidable como soporte es necesario funcionalizar la superficie con grupos amina para poder formar enlaces covalentes con la enzima a inmovilizar, lo anterior se puede lograr mediante la formación de una capa delgada de compuestos como el (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES) o polietilenimina (PEI) y posteriormente entrecruzando con glutaraldehído (Caro *et al.*, 2010).

Se propuso para este proyecto la utilización de acero inoxidable como soporte de la inmovilización, funcionalizar su superficie con quitosano y evaluar dos agentes entrecruzantes genipino y glutaraldehído y la elaboración de un sabor enzimático lácteo utilizando lipasa inmovilizada en este sistema propuesto con el fin de reutilizar la enzima inmovilizada.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Producción de sabores enzimáticos

Hoy en día, muchos investigadores e industrias han migrado a la síntesis de sabores biocatalíticos debido a la inclinación del consumidor hacia los sabores naturales sobre los producidos por métodos químicos. Los ésteres sintetizados por ácidos grasos de cadena corta y alcoholes son un gran grupo de compuestos de sabor y fragancia, que se utilizan ampliamente en las industrias alimentaria, cosmética, de bebidas y farmacéutica (Dhake *et al.*, 2013). Estos compuestos se pueden extraer directamente de fuentes naturales u obtenerse por síntesis química. El primero implica un alto costo debido a la muy baja producción de extracción y la escasez de algunos materiales naturales. Pero los compuestos obtenidos por este medio se pueden etiquetar como "naturales". En la síntesis química requiere alta temperatura y catálisis química agresiva que tiene un alto costo ambiental. Además, los compuestos obtenidos no pueden etiquetarse como "naturales" (Guillén *et al.*, 2012).

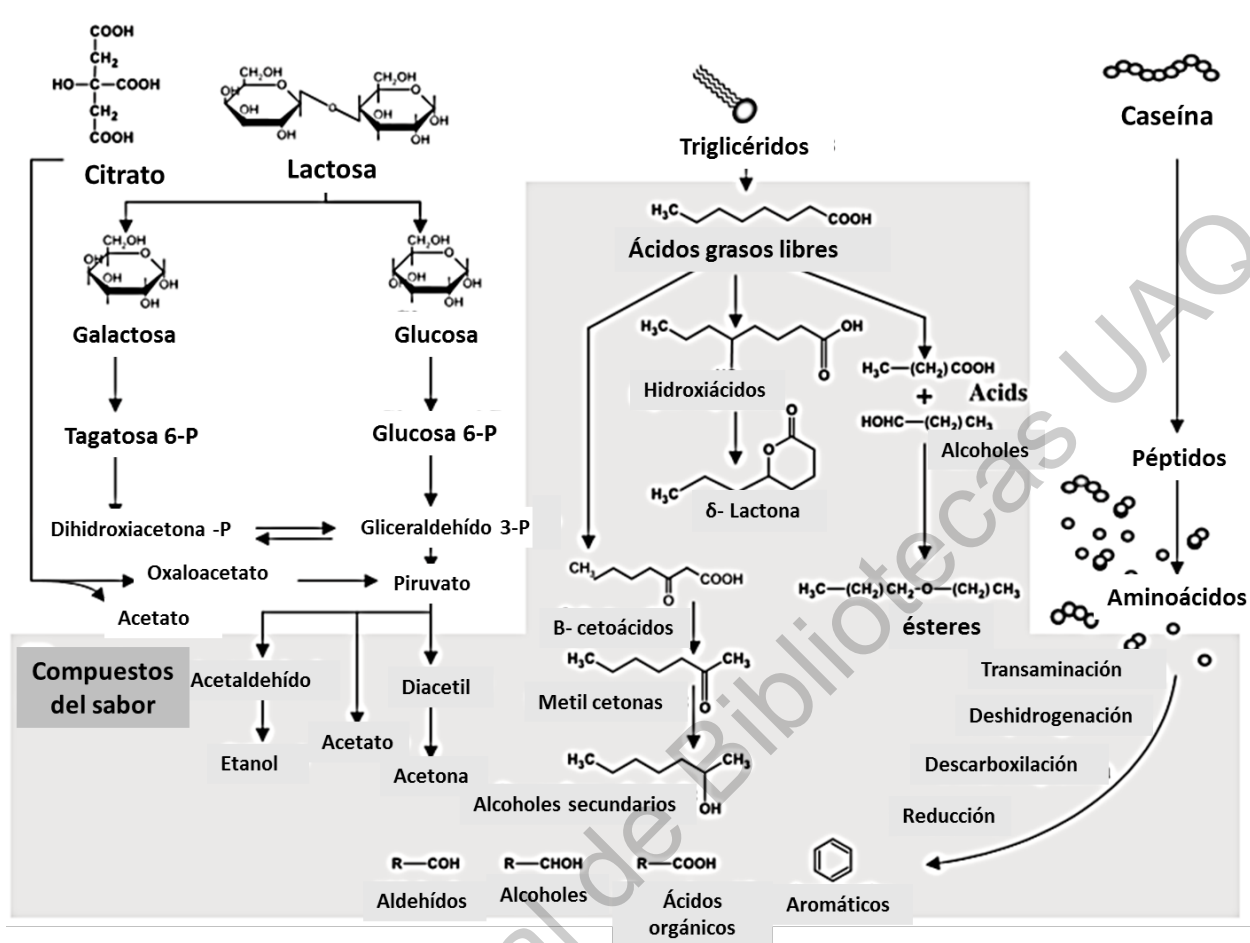
La síntesis enzimática de ésteres aromáticos de cadena corta ha ganado una atención creciente por las ventajas de sus condiciones de reacción suaves, suministro garantizado y alta eficiencia catalítica (Pires-Cabral *et al.*, 2009). Además, los compuestos obtenidos pueden etiquetarse como "naturales" y también se ha informado que son de mejor olor y color más agradable (Guillén *et al.*, 2012). Los ésteres de sabor de cadena corta han sido sintetizados con éxito principalmente por lipasas, cutinasas y esterases (Yan *et al.*, 2014). Entre las diferentes enzimas, la lipasa es la más utilizada para el desarrollo del sabor. Las lipasas se emplean para la esterificación en disolventes orgánicos para producir ésteres de sabor tales como acetato de isoamilo (Larios *et al.*, 2004; Vulsan, 1994), butirato de isoamilo (Abbas & Comeau, 2003) acetato de geranilo (Gatfield, 1995), acetato de citronelina (Welsh *et al.*, 1989).

La producción de ésteres de sabor catalizada por lipasa mediante reacciones de esterificación está influenciada por múltiples variables tales como molaridad del alcohol, tiempo de reacción, adición de agua, temperatura, velocidad de agitación y cantidad de enzima inmovilizada (Singh *et al.*, 2014).

Varios autores han evaluado las lipasas inmovilizadas con capacidad de esterificación para producir diversos ésteres de sabor (Ghamgui *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2009). En los trabajos e investigaciones realizados se han usado lipasas inmovilizadas y condiciones libres de disolvente para la síntesis de ésteres de sabor para superar los problemas asociados con la separación enzimática libre y la toxicidad del disolvente. Se ha utilizado la lipasa inmovilizada de *Candida rugosa* y la lipasa pancreática porcina para la síntesis de acetato de isoamilo (aroma de plátano), valerato de etilo (aroma de manzana verde) y acetato de butilo (aroma de piña) en n-hexano (Güvenç *et al.*, 2002).

#### 2.1.1 Desarrollo de sabores lácteos

El desarrollo de aromas en productos de queso resulta de las actividades metabólicas de las bacterias de queso, por glucólisis, lipólisis y proteólisis. Existen algunas rutas metabólicas principales, como el catabolismo de los aminoácidos, que producen los principales compuestos aromáticos pero que también pueden generar sabores desagradables. Durante la maduración del queso, las reacciones bioquímicas (Fig. 1) conducen a la formación del aroma del queso. Los compuestos de sabor se producen a partir de tres componentes principales de la leche: lactosa, lípidos y proteínas (Marilley, 2003).



**Figura 1.** Rutas bioquímicas que conducen a la formación de compuestos de sabor. La superficie gris indica compuestos con notas de sabor (Marilley, 2003).

Los lípidos del queso pueden ser oxidados o hidrolizados. Sin embargo, la oxidación es probablemente limitada debido al bajo potencial redox en los quesos. La lipólisis de los triglicéridos de la leche libera altas concentraciones de ácidos grasos de cadena corta e intermedia. Los ácidos grasos de cadena corta tienen un impacto considerable en el sabor, pero la lipólisis intensiva no es deseable en la mayoría de las variedades de queso debido al desarrollo de la rancidez. Los ácidos grasos libres son sustratos de reacciones enzimáticas que producen sabores. La oxidación y descarboxilación producen metil cetonas y alcoholes secundarios, y la esterificación de ácidos grasos hidroxilo produce lactonas. Los ácidos grasos reaccionan con grupos alcohólicos para formar ésteres, como

butanoato de etilo, hexanoato de etilo, acetato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo y hexanoato de metilo. Las concentraciones de ácido butírico encontradas en los quesos se deben en parte a las actividades hidrolíticas de las lipasas (Marilley, 2003).

La hidrólisis parcial (lipólisis) de la grasa láctea imparte sabores especiales a los productos lácteos (Holland *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2002). La grasa de leche modificada muestra notas de sabor distintas dependiendo del grado de lipólisis. Por ejemplo, en un grado muy bajo de lipólisis se puede percibir una nota sensorial libre de ácido, y sabores a mantequilla, cremosos o a queso en grados superiores de lipólisis. Debido a su efecto sobre el sabor, la grasa de leche hidrolizada con enzimas lipolíticas (GLH) es un ingrediente ampliamente utilizado e importante en la industria alimentaria (Regado *et al.*, 2007). Las enzimas lipolíticas son ubicuas en la naturaleza y desempeñan un papel esencial en los procesos de fabricación de GLH. Según su preferencia de sustrato, estas enzimas se clasifican como lipasas (EC 3.1.1.3) que hidrolizan acilglicerol de cadena larga (longitud de la cadena carbonada > 10) y esterases (EC 3.1.1.1) que hidrolizan acilglicerol de cadena corta (longitud de cadena de carbono ≤ 10) (Arpigny & Jaeger, 1999). Tanto las lipasas como las esterases se usan comúnmente para producir sabores deseados en productos lácteos.

La elección de la enzima es crítica porque determina el perfil final de los ácidos grasos liberados y el sabor consecuente del producto. Los ácidos grasos de cadena corta (C4-C8) que se liberan generalmente imparten un sabor a queso en los productos lácteos. La concentración de ácidos grasos de cadena larga debe mantenerse por debajo de un cierto umbral para evitar un sabor jabonoso (Ha & Lindsay, 1993; Lai *et al.*, 1997). La proporción de ácidos grasos de cadena corta a cadena larga en sus formas libres es, por lo tanto, un parámetro importante y depende en gran medida de la (s) enzima (s) utilizada (s) (Peng *et al.*, 2014).

La proteólisis contribuye directamente a los sabores del queso mediante la liberación de péptidos y aminoácidos. Los aminoácidos son sustratos para la

transaminación, deshidrogenación, descarboxilación y reducción, que producen una amplia variedad de compuestos de sabor tales como ácido fenilacético, fenetanol, p-cresol, metano tiol, dimetil disulfuro, 3-metil butirato, 3-metil butanal, 3-metilo. Butanol, 3-metil-2-butanona, propionato de 2-metilo, 2-metil-1-propanal, butirato de 2-metilo y butanal de 2-metilo. Los principales compuestos de sabor identificados en los quesos se muestran en la Tabla 1 (Marilley, 2003).

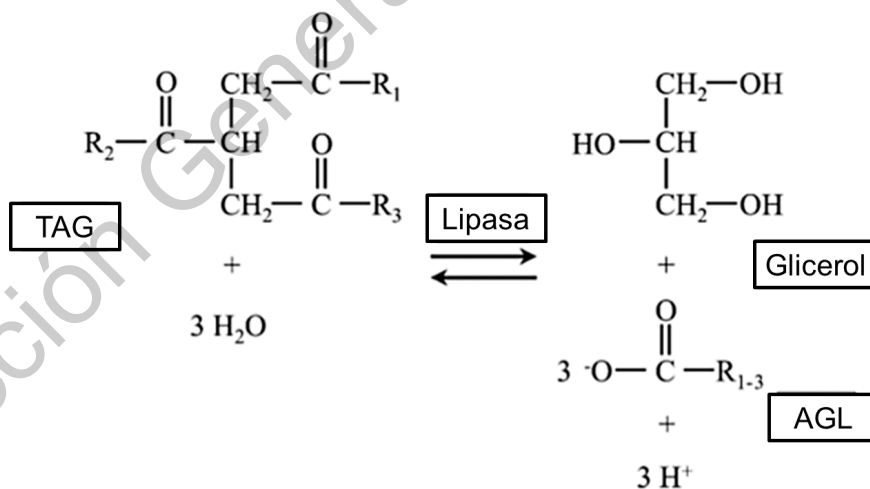
**Tabla 1.** Compuestos aislados como sabores en varios quesos (Marilley, 2003).

<b>Alcoholes</b>	isohexanal	<b>Ésteres</b>	metileno bis(metilsulfuro)
1,2-butanodiol	2.metilbutanal	etil acetato	Hexanotiol
2-butanol	3-metilbutanal	etil benzoato	<b>N- compuestos</b>
Etanol	2-metilpropanal	etil butirato	2-acetil-1-pirrolina
2-etilbutanol	nonanal	etil hexanoato	<b>Pirazinas</b>
2-etilhexanol	(E,E) 2,4-nonadienal	etil isobutanoato	2,3-dietil-5-metilpirazina
2-heptanol	(Z) 2-nonenal	etil octanoato	2-etil, 3-5-dimetil-pirazina
Hexanol	(E) 2-nonenal	etil 2-metilbutanoato	2-metoxi-3-isopropilpirazina
Isobutanol	Octanal	etil 3-metilbutanoato	<b>Furanos</b>
2-metilbutanol	pentanal	isobutil butanoato	2-etil-4-hidroxi-5-metil-3-(2H) furanona
3-metilbutanol	propanal	3-metilbutil acetato	3-hidroxi-4,5-dimetil-2-(5H) furanona
2-metilpropanol	propenal	metil-2-metilbutanoato	4-hidroxi-2,5-dimetil-3-(2H) furanona
2-nonanol	tiofen-2- aldehído	3-octil acetato	Tetrahidrofurano
1,5-octan-3-ol	<b>Cetonas</b>	pentil acetato	<b>Compuestos fenólicos</b>
2-octanol	acetoina	fenetil acetato	p-cresol
1-octan-3-ol	Acetona	propil butirato	<b>Ácidos grasos</b>
2-pentanol	2,3-butanodiona(diacetilo)	<b>Lactonas</b>	Acetato
feniletanol	2-butanona	δ-decalactona	Butirato
2-feniletanol	<i>b</i> -damaescenona	γ-decalactona	Caproato
1-propanol	2-heptanona	δ-dodecalactona	Decanoato
2-propanol	2-hexanona	δ-octalactona	Isobutirato
<b>Aldehídos</b>	3-metil-2-butanona	(Z)-6-dodecen-γ-lactona	metil acetato
acetaldehído	2-nonanona	<b>S- compuestos</b>	ácido 2-metilbutírico
Decanal	3-octanona	disulfuro de dimetilo	ácido 3-metilbutírico
Heptanal	1-octan-3-ona	sulfuro de dimetilo	Octanoato
4-heptanal	2-pentanona	trisulfuro de dimetilo	Fenilacetato
Hexanal	2-tridecanona	metanotiol	Propionato
2-hexanal	2-undecanona	metional	Valerato

## 2.2 Enzimas lipolíticas.

Las enzimas que son capaces de catalizar la hidrólisis de los triglicéridos incluyen lipasas y esterases, que difieren principalmente en sus actividades relativas en sustratos en forma de solución y en forma de emulsión. Las lipasas muestran una actividad desproporcionadamente mayor en los sustratos emulsionados (Nelson, 1972). Shahani *et al.* (1973) enumeró los siguientes tipos comunes de lipasas: lipasas lácteas; lipasas pancreáticas; lipasas botánicas, de numerosas frutas, vegetales y semillas de plantas tales como trigo, avena, centeno, algodón, soja y ricino; lipasas microbianas, que incluyen especies de levaduras de *Candida* y *Torulopsis*, especies de mohos de *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Geotrichum* y *Mucor*, y especies bacterianas de *Pseudomonas*, *Achromobacter* y *Staphylococcus*.

Las lipasas pueden catalizar tanto la hidrólisis como la síntesis de enlaces éster de triacilgliceroles (TAG) (Figura 2).

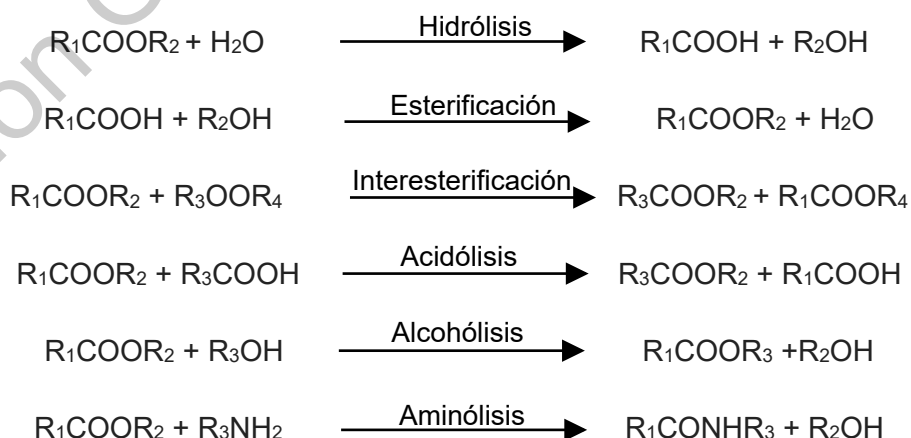


**Figura 2.** Reacción enzimática de una lipasa catalizando la hidrólisis y síntesis de un triacilglicérol. TAG: triacilglicérido, AGL: ácido graso libre (Stehr *et al.*, 2003).



Las lipasas (E.C. 3.1.1.3) ocupan un lugar de prominencia entre los biocatalizadores debido a sus múltiples y novedosas aplicaciones en oleoquímica, síntesis orgánica, formulación de detergente y nutrición (Pandey *et al.*, 1999). En los últimos años, ha aumentado el interés en el uso de enzimas para la biosíntesis de moléculas en medios orgánicos (Castillo, Pezzotti, Navarro, & López-Munguía, 2003; Gargouri, Drouet, & Legoy, 2002; Noel & Combes, 2003). Las lipasas se han inmovilizado con éxito en una variedad de matrices para realizar reacciones de esterificación y transesterificación en disolventes orgánicos (Hiol *et al.*, 2000). Las lipasas inmovilizadas ofrecen incentivos económicos de mayor estabilidad térmica y química, facilidad de manejo, fácil recuperación y reutilización en relación con formas no inmovilizadas (Kanwar *et al.*, 2004; Malcata *et al.*, 1990).

Las lipasas son catalizadores versátiles, que se han empleado para catalizar un rango de reacciones tales como esterificación, amidación y transesterificación de ésteres, así como de carbonatos orgánicos, en la figura 3 se describen algunas de estas reacciones. Son altamente estables en condiciones adversas, como disolventes orgánicos, altas temperaturas, etc. Las aplicaciones de lipasa incluyen la producción de aditivos alimentarios, productos intermedios quirales y productos farmacéuticos (Flores *et al.*, 2000; He *et al.*, 2002b; Pahujani *et al.*, 2008; Wu & Liu, 2000).



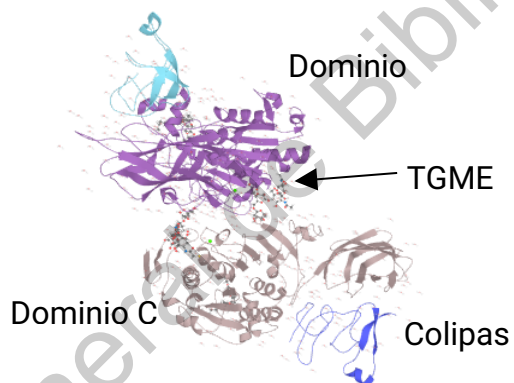
**Figura 3.** Reacciones catalizadas por lipasas (Houde *et al.*, 2004).

### 2.2.1 Lipasa pancreática de cerdo

Las lipasas son enzimas que se encuentran en microorganismos, plantas y tejidos animales. Entre ellos, la lipasa pancreática porcina (PPL por sus siglas en inglés) es una de las lipasas más ampliamente utilizadas en las reacciones de biotransformación, al ser más barata en comparación con otras lipasas microbianas y animales comerciales. La preparación de extracto crudo de PPL contiene un número significativo de otras hidrolasas (esterasas, amilasas y proteasas) como contaminantes. Sin embargo, la forma semi-purificada de esta lipasa tiene un alto precio. PPL también se considera muy atractiva para aplicaciones industriales debido a su accesibilidad (es comercializada por varios proveedores en el mercado internacional), alta estabilidad y amplia especificidad para la biotransformación de sustratos no naturales (Mendes *et al.*, 2012).

La lipasa pancreática de cerdo (PPL) es una pequeña proteína globular compuesta de una sola cadena de 449 aminoácidos, con un peso molecular de 50-52 kDa, y un volumen molecular de 4.6 nm × 2.6 nm × 1.1 nm. La determinación de la estructura tridimensional ha revelado la presencia de dos dominios bien definidos. El dominio del N-terminal es del tipo  $\alpha/\beta$ , este contiene los residuos del 1 al 336 y en el sitio catalítico la tríada Ser, Asp e His que se mantienen en las posiciones 153, 177 y 264, respectivamente. La estructura cristalina de la lipasa pancreática porcina reveló la presencia de varios bucles de superficie que cubren la tríada catalítica. La posición de estos bucles obstaculizaría estéricamente el acceso al sustrato al sitio catalítico. Un puente disulfuro entre Cys238 y Cys262 define el mayor de estos bucles (dominio de límite). Otro enlace formado por los residuos 76-85 (-5 loop) también bloquea el sitio catalítico. La lipasa es una glicoproteína que contiene unidades de manosa y N-acetil-glucosamina. Se reporta que contiene seis puentes disulfuro y dos grupos tiol libres. Aunque la lipasa contiene dos grupos tiol libres, no están implicados en la actividad enzimática (Mendes *et al.*, 2012).

La conformación abierta del dominio del párpado en PPL se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno entre el tapón y la colipasa, lo que permite el acceso del sustrato al sitio activo de la lipasa. El dominio C-terminal es un sándwich, contiene los residuos 337-449 que interactúan exclusivamente con la colipasa, como se puede observar en la Figura 4. La colipasa es un pequeño cofactor proteico con un peso molecular de 10 kDa que ancla la lipasa a las sales biliares en la interfaz lípido/agua. Se secreta a partir de células acinares pancreáticas como proforma, procolipasa y se convierte en colipasa madura mediante la escisión de un pentapéptido amino terminal en el duodeno. La actividad hidrolítica de las lipasas pancreáticas es el resultado del efecto combinado de la lipasa, la colipasa y las sales biliares (Mendes *et al.*, 2012).



**Figura 4.** Diagrama de cinta esquemático de la estructura de lipasa-colipasa porcina. La cadena de glicano, conectada al dominio N-terminal de lipasa (dominio N), se dibuja como un modelo de barra. Una molécula de tetra-etilenglicol monoocil éter (TGME), ubicada en el sitio activo abierto, está representada por esferas y palos. La colipasa interactúa con el dominio C-terminal de la lipasa (dominio C) (Hermoso *et al.*, 1996).

### 2.3 Inmovilización enzimática

La inmovilización enzimática muestra ventajas para la aplicación comercial debido a la conveniencia en la manipulación, la facilidad de separación de la

enzima de la mezcla de reacción, la reutilización y un posible aumento de la estabilidad enzimática térmica y del pH. Un requisito importante para la inmovilización de proteínas es que la matriz debe proporcionar un entorno biocompatible e inerte, es decir, no debe interferir con la estructura nativa de la proteína, lo que podría comprometer su actividad biológica. Sin embargo, la baja eficiencia biocatalítica de las enzimas inmovilizadas a menudo limita el desarrollo del bioprocésamiento a gran escala para competir con los procesos químicos sintéticos tradicionales. El efecto de la inmovilización, incluido el rendimiento de las enzimas inmovilizadas, depende en gran medida de las propiedades de los soportes. Se pueden lograr mejoras de la eficiencia biocatalítica mediante la manipulación de la estructura de los materiales de soporte (Ansari & Husain, 2012; Li *et al.*, 2010; Torres-Salas *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009).

Diferentes tecnologías de inmovilización se han desarrollado en los últimos 30 años y pueden clasificarse en las siguientes clases generales: 1. Deposición sobre material inorgánico hidrófilo, como celite o gel de sílice. 2. Encapsulación (por ejemplo, en camas de alginato o carragenina). 3. Enlace covalente a vehículos, por ejemplo, utilizando perlas de polímero funcionalizadas con epoxi. 4. Adsorción sobre portadores basados en polímeros. 5. Entrecruzamiento usando por ejemplo glutaraldehído (Christensen *et al.*, 2003). Al considerar la elección de metodologías de inmovilización para aplicaciones de lipasa inmovilizada a gran escala, se deben abordar varios aspectos: a) la inmovilización preferiblemente debería aumentar la estabilidad de la lipasa en términos de mayor estabilidad a la temperatura y también la productividad, con un mínimo de escape de enzima del portador. b) La enzima debe ser estable durante cada paso del proceso de inmovilización. c) El procedimiento de inmovilización debe ser preferiblemente robusto y reproducible. d) Proceso de inmovilización rentable. e) Logística de producción: optimizar el rendimiento de la producción. f) Desde un punto de vista reglamentario en aplicaciones alimentarias, los materiales y equipos deben aplicarse a las regulaciones de calidad alimentaria, g) Considerando la aplicación, la lipasa inmovilizada debe ser físicamente robusta y

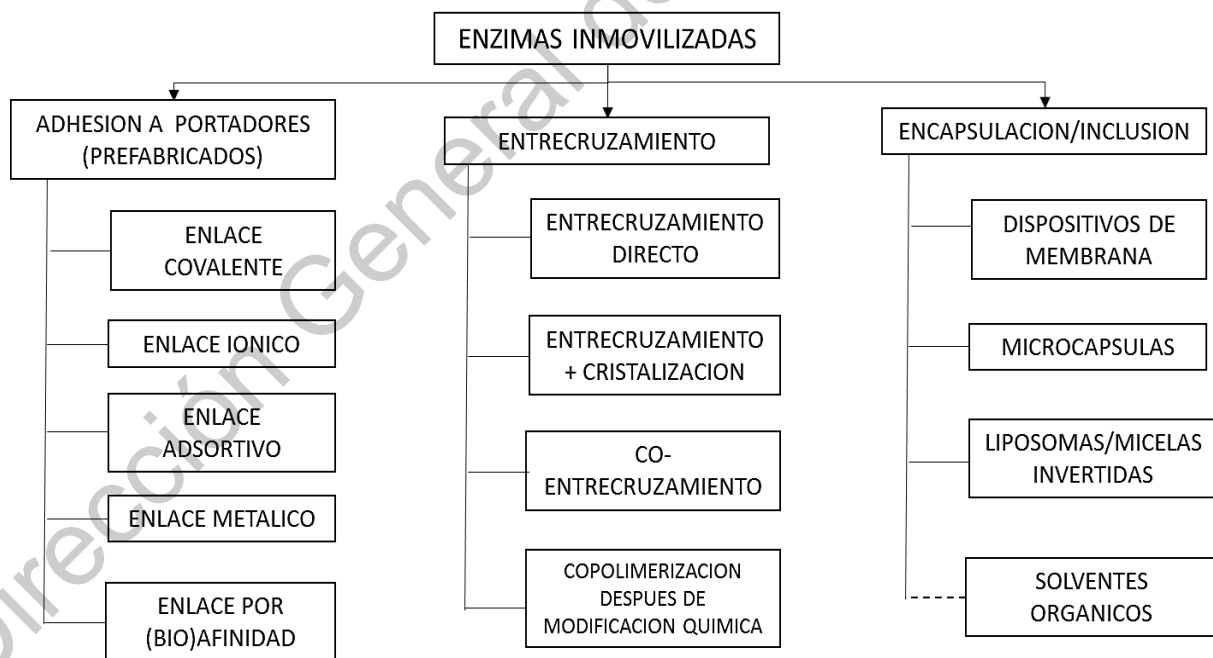
preferiblemente aplicable tanto en procesos discontinuos como en lecho fijo. En general, las lipasas inmovilizadas disponibles comercialmente se inmovilizan mediante adsorción en matrices basadas en polímeros (por ejemplo, la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en una matriz de tipo poliacrilato, disponible como Novozym 435® de la compañía Novozymes o Chirazyme L-2 ® de Roche). Para algunas aplicaciones de lipasas inmovilizadas, el costo relativamente alto de esos biocatalizadores se vuelve prohibitivo para una mayor explotación. El costo relativamente alto está asociado con el uso de un material de soporte costoso. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de una tecnología de proceso de inmovilización menos costosa para emerger en aplicaciones de bajo margen relativo tales como interesterificación de grasas en comparación con aplicaciones de alto margen relativo (Christensen *et al.*, 2003).

La razón de que los sistemas de reacción de lipasa son demasiado complejos, por lo general consisten en dos fases inmiscibles: una fase acuosa con enzima disuelta y una fase orgánica con sustrato disuelto; en otras palabras, a diferencia de otras hidrolasas que trabajan en fase acuosa, las lipasas se activan solo cuando se adsorben en una interfaz aceite/agua (Knežević *et al.*, 1998). Se ha desalentado la aplicación de lipasa en estos sistemas de reacción por el alto costo de las enzimas, la contaminación de los productos con proteína residual, la velocidad de reacción lenta y la falta de un sistema de reactor de emulsión ideal para abastecer la compleja hidrólisis heterogénea interfacial. La mayoría de los problemas anteriores podrían superarse usando lipasas inmovilizadas. La inmovilización de lipasas sobre portadores insolubles en agua, ayuda en su reutilización económica y en el desarrollo de bioprocesos continuos (Knezevic *et al.*, 2004).

La inmovilización también facilita la separación de los productos, mejora las propiedades de la lipasa, como la termoestabilidad y la actividad en medios no acuosos, y proporciona más flexibilidad con el contacto enzima/sustrato mediante el uso de diversas configuraciones de reactor. Por lo tanto, se han llevado a cabo

muchos trabajos de investigación para optimizar las técnicas y procedimientos de inmovilización en vista del desarrollo de un sistema inmovilizado de lipasa eficiente (Balcao *et al.*, 1996; Dhake *et al.*, 2013). El diseño de un sistema inmovilizado de lipasa eficiente es una tarea bastante difícil. Los criterios de selección para la técnica de inmovilización y portador dependen en gran medida del tipo de lipasa particular, el tipo de sistema de reacción (acuoso, disolvente orgánico o sistema bifásico), las condiciones del proceso (pH, temperatura y presión) y el objetivo de la inmovilización (Knezevic *et al.*, 2004).

En la Figura 5 se muestra una clasificación de los métodos de inmovilización según diferentes principios químicos y físicos. Mediante la inmovilización, se pueden inducir nuevas características para hacer que las enzimas sean tolerantes incluso en entornos de reacción agresivos. El procedimiento de inmovilización debe realizarse de una manera que permita a la enzima mantener su conformación activa y la flexibilidad catalítica necesaria (Tischer & Wedekind, 1999).



**Figura 5.** Clasificación de los métodos de inmovilización (Tischer & Wedekind, 1999).

### 2.3.1 Inmovilización covalente

La unión covalente de una enzima a un soporte es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina. En menor medida la metionina, el triptófano, la arginina, así como, el ácido aspártico y el glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, por lo que no pueden intervenir en la unión covalente (Arroyo, 1998).

Este método presenta las siguientes ventajas: la manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla; la carga de enzima permanece constante después de la inmovilización; los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado. Una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria. La inmovilización por enlace covalente también presenta una serie de inconvenientes: es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos. El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo. Para evitar esta posible alteración, se realiza la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo. La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc. (Arroyo, 1998).

La unión covalente de lipasas a diferentes vehículos inorgánicos y orgánicos presenta ventajas comparada con otros métodos, ya que las restricciones de difusión al sustrato o productos se reducen considerablemente. Además, la inmovilización covalente ofrece las mayores ventajas al aumentar la

estabilidad de la enzima y evitar que se difunda en la solución. Existen numerosos soportes inorgánicos y orgánicos disponibles para la inmovilización de lipasa, que incluyen alúmina porosa, óxidos metálicos, acero inoxidable y vidrio de poro controlado (CPG), celulosa, almidón, quitina, sefarosa y polímeros sintéticos. Sin embargo, estos soportes no poseen grupos reactivos para el acoplamiento directo de la enzima, sino grupos hidroxilo, amino, amida y carboxilo, que deben activarse para la inmovilización de enzimas. Los diversos métodos de activación de estos soportes se describen en la literatura (Taylor *et al.*, 1991). El enlace covalente generalmente está formado por moléculas puente activas, como CNBr, y reactivos bi o multifuncionales como el glutaraldehído. Los métodos más generales para la activación de soportes que contienen grupos carboxilo o amino involucran el uso de carbodiimidas y reactivos similares (Knezevic *et al.*, 2004). Aunque los portadores inorgánicos tienen muchas ventajas sobre los polímeros orgánicos tales como alta resistencia mecánica, estabilidad térmica y química, resistencia a los disolventes orgánicos y ataque microbiano, fácil manejo y fácil regenerabilidad mediante un simple proceso de pirólisis, su aplicación para la unión covalente es más limitada ya que se activan solo con unas pocas técnicas. Uno de los métodos de derivatización más populares de los portadores inorgánicos es el método de silanización, que implica el uso de derivados de trialcóxidosilano que contienen un grupo funcional orgánico. Estos grupos orgánicos se modifican adicionalmente para producir intermedios activados, que a su vez reaccionan con lipasas. Sin embargo, las condiciones de reacción requeridas son relativamente complicadas y agresivas, además de que la eficacia del procedimiento de inmovilización es a menudo bastante baja (Arroyo, 1998).

Se han descrito las propiedades de la lipasa unida covalentemente a algunos soportes inorgánicos activados con triclorotriazina, como el aluminio, el sílice y el vidrio de poro controlado (Moreno & Sinisterra, 1994). De acuerdo con este trabajo, la lipasa inmovilizada sobre sílice y aluminio exhibió una mayor actividad y estabilidad que su contraparte inmovilizada sobre poros controlados. Esta diferencia podría explicarse por las características morfológicas de los



materiales de soporte utilizados para la inmovilización.

Los soportes de polímeros basados en polisacáridos son muy populares porque contienen grupos hidroxilo que se pueden activar directamente mediante la introducción de un grupo electrófilo reactivo hacia la enzima, en el soporte. Sin embargo, tienden a hincharse y tienen poca estabilidad física, química, térmica y degradación microbiana. Las lipasas a menudo se han inmovilizado con polisacáridos epoxi o tresilados activados (Arroyo *et al.*, 1999).

En general, las condiciones requeridas para la unión covalente de una lipasa a un portador insoluble son tales que es inevitable cierta pérdida de actividad. Sin embargo, dado que las lipasas son glicoproteínas, algunos de estos problemas pueden obviarse por enlace covalente a través del resto carbohidrato que no es esencial para la actividad enzimática. En general, el grupo aldehído funcional se puede introducir en una glicoproteína oxidando el resto de carbohidrato por oxidación con per yodato sin afectar significativamente la actividad de la enzima. La enzima podría entonces unirse covalentemente a un soporte que contiene un grupo alquilamina a través de la reacción de base de Schiff. En este sentido, Arroyo *et al.* (1993) han inmovilizado la lipasa de *C. cylindracea* a los soportes activados por tosilo (agarosa y mazorca de maíz) por acoplamiento enzimático a través de grupos hidroxílicos del componente de azúcar y se obtuvo el biocatalizador con alta actividad y estabilidad. Es muy importante que la inmovilización de la lipasa mediante la unión covalente a un soporte deba implicar únicamente grupos funcionales de la lipasa que no son esenciales para su acción catalítica (Knezevic *et al.*, 2004).

Diferentes autores han centrado su atención en el estudio de la inmovilización de lipasa en Eudragit S-100, un copolímero aniónico de ácido metacrílico y metacrilato de metilo (Rodrigues *et al.*, 2002). Este polímero se caracteriza por una solubilidad reversible que experimenta cambios rápidos en su microestructura, al modificar las condiciones de reacción tales como el pH, la temperatura o la concentración de sal. Por lo tanto, la reacción catalítica puede

realizarse en una sola fase homogénea, libre de problemas de transferencia de masa sólido-líquido y limitaciones de difusión de poros con respecto al sustrato o producto.

La estructura física y la composición química del soporte también pueden influir en el microambiente de las lipasas inmovilizadas y, en consecuencia, en sus propiedades. La gráfica de actividad frente al pH de una lipasa inmovilizada puede ser más amplia (Bai & Zhou, 2004), más estrecha o idéntica a la de la enzima nativa (Adamczak & Bednarski, 2004). Tras la inmovilización, el pH óptimo para las reacciones catalizadas por las lipasas a menudo se desplaza a valores más alcalinos. Tal cambio en el pH óptimo puede ser tanto como de 2 a 3 unidades de pH y es causado por la carga de un soporte insoluble en agua o la modificación química de la enzima. Parecería que la inmovilización covalente es como cualquier otro tratamiento aleatorio para aumentar, disminuir o no tener ningún efecto sobre la estabilidad de la enzima. Sin embargo, si uno usa la inmovilización para realizar una estrategia de estabilización racional, entonces debería producir preparaciones enzimáticas más estables. Como ejemplo, la lipasa de *C. cylindracea* inmovilizada covalentemente sobre soporte de nailon fue bastante estable y retuvo aproximadamente un tercio de la actividad inicial después de repetidos experimentos en el transcurso de 72 días (Carta *et al.*, 1992).

### 2.3.2 Fisisorción

Pueden preverse varias vías para inmovilizar las enzimas en el material de acero inoxidable, el método más sencillo que consiste en su fisisorción directa no es muy utilizado, ya que esto puede inducir cambios en la conformación de la proteína, lo que posiblemente resulte en la pérdida de la actividad catalítica. También se puede emplear otra vía, utilizando enzimas genéticamente modificadas que incluyan una unión selectiva de la secuencia de aminoácidos a materiales inorgánicos, pero requieren producir altas cantidades de proteínas recombinantes, que pueden consumir mucho tiempo. Un método más accesible sería introducir funciones orgánicas reactivas en la superficie del acero inoxidable

a partir de las cuales las enzimas podrían unirse fácilmente por medios covalentes. Un enfoque más eficiente para introducir grupos amina en acero inoxidable aprovecha la fisisorción espontánea de polietilenimina ramificada (PEI) para producir una capa orgánica delgada que incluye una alta densidad de grupos de aminas primarias (Caro *et al.*, 2010), también se pueden considerar otros materiales como el quitosano para introducir esos grupos orgánicos a la superficie del acero.

La fisisorción, también llamada adsorción física, es un proceso en el cual la estructura electrónica del átomo o molécula apenas se perturba con la adsorción. La fisisorción se caracteriza por fuerzas muy débiles, como las fuerzas electrostáticas debido a la atracción dipolar, las fuerzas de Van der Waals y los puentes de hidrógeno. Estas fuerzas son importantes para una superficie de polímero, como una superficie fotoprotectora. La fuerza de interacción fundamental de la fisisorción es la fuerza de van der Waals. Aunque la energía de interacción es muy débil ( $\sim 10\text{--}100$  meV), la fisisorción juega un papel importante en la naturaleza. Por ejemplo, la atracción de van der Waals entre las superficies y los pelos de los geckos proporciona la extraordinaria capacidad de trepar paredes verticales (Johansson, 2007)

En comparación con la quimisorción, en la que se cambia la estructura electrónica de los átomos o moléculas de enlace y se forman enlaces covalentes o iónicos, la fisisorción, en general, solo se puede observar en el ambiente de baja temperatura (energía térmica a temperatura ambiente  $\sim 26$  meV). En la práctica, la categorización de una adsorción particular como fisisorción o quimisorción depende principalmente de la energía de unión del adsorbato al sustrato. Aunque la interacción de van der Waals es la más importante, a medida que el átomo adsorbido se acerca a la superficie, la función de onda del electrón comienza a superponerse con la de los átomos de la superficie. Además, la energía del sistema aumentará debido a la ortogonalidad de las funciones de onda del átomo que se aproxima y los átomos de la superficie (Johansson, 2007).

## 2.4 Materiales utilizados en la inmovilización

La elección del soporte y del tipo de enlace en la inmovilización resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además, el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado. Se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización de numerosas enzimas. Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente nos los encontramos en forma de cilindro, hojas, fibras y más corrientemente en forma de esferas. De acuerdo con Arroyo (1998) los soportes pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- Soportes inorgánicos. Dentro de este grupo tenemos una gran variedad de soportes, que pueden ser naturales (arcillas como la bentonita, piedra pómez, sílice, etc.) o materiales manufacturados (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.).
- Soportes orgánicos. Se pueden clasificar en: polímeros naturales, a su vez divididos en: polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, quitosano, etc.), proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc.). Polímeros sintéticos, divididos en: poliolefinas (como el poliestireno), polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.) y otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc.).

### 2.4.1 Acero inoxidable

El acero inoxidable es una aleación de hierro con un mínimo de 10.5 % de cromo. El cromo produce una capa delgada de óxido en la superficie del acero conocida como la "capa pasiva". Esto evita cualquier corrosión adicional de la superficie. El aumento de la cantidad de cromo da una mayor resistencia a la corrosión. También contiene cantidades variables de carbono, silicio y manganeso. Otros elementos, como el níquel y el molibdeno, pueden agregarse para impartir otras propiedades útiles, como una mejor conformabilidad y una mayor resistencia a la corrosión (British Stainless Steel Association, 2018).

El acero inoxidable se divide generalmente en 5 tipos: 1) Ferrítico: estos aceros se basan en cromo con pequeñas cantidades de carbono, generalmente menos del 0.10 %. Estos aceros tienen una microestructura similar a los aceros al carbono y de baja aleación. Por lo general, su uso está limitado a secciones relativamente delgadas debido a la falta de tenacidad en las soldaduras. No pueden ser endurecidos por tratamiento térmico. Los aceros con alto contenido de cromo con adiciones de molibdeno se pueden usar en condiciones bastante agresivas, como el agua de mar. Los aceros ferríticos también se eligen por su resistencia al agrietamiento por corrosión bajo tensión. No son tan conformables como los aceros inoxidables austeníticos. Son magnéticos. 2) Austenítico: estos aceros son los más comunes. Su microestructura se deriva de la adición de níquel, manganeso y nitrógeno. Es la misma estructura que ocurre en los aceros comunes a temperaturas mucho más altas. Esta estructura otorga a estos aceros su combinación característica de soldabilidad y conformabilidad. La resistencia a la corrosión se puede mejorar agregando cromo, molibdeno y nitrógeno. La composición de este tipo de acero se describe en la tabla 2. No se pueden endurecer con el tratamiento térmico, pero tienen la propiedad útil de poder endurecerse en el trabajo a niveles de alta resistencia, al tiempo que conservan un nivel útil de ductilidad y dureza. Los aceros austeníticos estándar son vulnerables al agrietamiento por corrosión bajo tensión. Los aceros austeníticos con mayor contenido de níquel tienen una mayor resistencia al agrietamiento por corrosión

bajo tensión. Nominalmente no son magnéticos, pero por lo general exhiben alguna respuesta magnética según la composición y el endurecimiento por trabajo del acero. 3) Martensítico: estos aceros son similares a los aceros ferríticos al estar basados en cromo, pero tienen niveles de carbono más altos hasta un 1 %. Esto les permite ser endurecidos y templados al igual que el carbono y los aceros de baja aleación. Se utilizan donde se requiere alta resistencia y resistencia a la corrosión moderada. Generalmente tienen una soldabilidad y una conformabilidad bajas. Son magnéticos. 4) Dúplex: estos aceros tienen una microestructura que es aproximadamente 50 % ferrítica y 50 % austenítica. Esto les da una mayor resistencia que los aceros ferríticos o austeníticos. Son resistentes al agrietamiento por corrosión bajo tensión. Los denominados aceros "dúplex magros" están formulados para tener una resistencia a la corrosión comparable a la de los aceros austeníticos estándar, pero con mayor resistencia y resistencia al agrietamiento por corrosión bajo tensión. Los aceros "superduplex" tienen una mayor resistencia y resistencia a todas las formas de corrosión en comparación con los aceros austeníticos estándar. Son soldables, pero necesitan cuidado en la selección de los consumibles de soldadura y la entrada de calor. 5) Endurecimiento por precipitación: estos aceros pueden desarrollar una resistencia muy alta al agregar elementos como cobre, niobio y aluminio al acero. Con un tratamiento térmico adecuado de "envejecimiento", se forman partículas muy finas en la matriz del acero que imparte resistencia. Estos aceros se pueden mecanizar para obtener formas bastante complejas que requieren buenas tolerancias antes del tratamiento de envejecimiento final, ya que hay una distorsión mínima del tratamiento final. La resistencia a la corrosión es comparable a los aceros austeníticos estándar (British Stainless Steel Association, 2018).

**Tabla 2.** Tablas de composición química de acero inoxidable austenítico, estándar europeo 10088-2 (British Stainless Steel Association, 2018).

Designación			% Composición química en masa máxima a menos que se indique									
Nombre del acero	Número del acero	AISI	C	Si	Mn	P	S	N	Cr	Mo	Ni	Otros
Aceros inoxidables austeníticos - grados estándar												
X10CrNi18-8	1.431	301	0.05/0.15	2	2	0.045	0.015	0.11	16./19	0.8	6.0/9.5	-
X2CrNi18-7	1.4318	301LN	0.03	1	2	0.045	0.015	0.1/0.2	16.5/18.5	-	6.0/8.0	-
X2CrNi18-9	1.4307	304L	0.03	1	2	0.045	0.015	0.11	17.5/19.5	-	8.0/10.5	-
X2CrNi19-11	1.4306	304L	0.03	1	2	0.045	0.015	0.11	18/20	-	10.0/12.0	-
X2CrNi18-10	1.4311	304LN	0.03	1	2	0.045	0.015	0.12/0.22	17.5/19.5	-	8.5/11.5	-
X5CrNi18-10	1.4301	304	0.07	1	2	0.045	0.015	0.11	17.5/19.5	-	8.0/10.5	-
X8CrNiS18-9	1.4305	303	0.1	1	2	0.045	0.15/0.35	0.11	17/19	-	8.0/10.0	Cu: 1.00
X6CrNiTi18-10	1.4541	321	0.08	1	2	0.045	0.015	-	17/19	-	9.0/12.0	Ti: 5C/0.70
X4CrNi18-12	1.4303	305	0.06	1	2	0.045	0.015	0.11	17/19	-	11.0/13.0	-
X2CrNiMo17-12-2	1.4404	316L	0.03	1	2	0.045	0.015	0.11	16.5/18.5	2.0/2.5	10.0/13.0	-
X2CrNiMoN17-11-2	1.4406	316LN	0.03	1	2	0.045	0.015	0.12/0.22	16.5/18.5	2.0/2.5	10.0/12.0	-
X5CrNiMo17-12-2	1.4401	316	0.07	1	2	0.045	0.015	0.11	16.5/18.5	2.0/2.5	10.0/13.0	-
X6CrNiMoTi17-12-2	1.4571	316Ti	0.08	1	2	0.045	0.015	-	16.5/18.5	2.0/2.5	10.5/13.5	Ti: 5C/0.70
X2CrNiMo17-12-3	1.4432	316L	0.03	1	2	0.045	0.015	0.11	16.5/18.5	2.5/3.0	10.5/13.0	-
X2CrNiMo18-14-3	1.4435	316L	0.03	1	2	0.045	0.015	0.11	17/19	2.5/3.0	12.5/15.0	-
X2CrNiMoN17-13-5	1.4439	317LMN	0.03	1	2	0.045	0.015	0.12/0.22	16.5/18.5	4.0/5.0	12.5/14.5	-
X1NiCrMoCu25-20-5	1.4539		0.02	0.7	2	0.03	0.01	0.15	19/21	4.0/5.0	24.0/26.0	Cu: 1.20/2

**Tabla 3.**Tipos de acabado superficial de acero inoxidable (British Stainless Steel Association, 2018).

Código de acabado de superficie (Acabados de molino)	Descripción
1D	Laminado en caliente, tratamiento térmico, decapado. El acabado laminado en caliente más común. Una superficie rugosa, no reflectante. Normalmente no se utiliza para aplicaciones decorativas.
2B	Laminado en frío, tratamiento térmico, decapado, pellizco pasado. El acabado laminado en frío más común. Acabado en gris opaco ligeramente reflectante. Se puede usar en esta condición o frecuentemente es el punto de partida para una amplia gama de acabados pulidos.
2D	Laminado en frío, tratamiento térmico, decapado.
2H	Trabajo endurecido por rodadura para dar mayor nivel de fuerza. Se ofrecen varios rangos de resistencia a la tracción o resistencia de prueba del 0,2 % en 10088-2 hasta 1300 MPa y 1100 MPa, respectivamente, dependiendo del grado
2Q	Laminado en frío endurecido y templado. Se aplica a los aceros martensíticos que responden a este tipo de tratamiento térmico.
2R	Laminado en frío y recocado brillante, todavía comúnmente conocido como BA. Un brillante acabado reflectante. Puede utilizarse en esta condición o como punto de partida para pulir u otros procesos de tratamiento de superficies, p. Ej. colorante

Hay muchos tipos diferentes de acabado de superficie en acero inoxidable. Algunos de estos se originan en el molino, pero muchos se aplican más tarde durante el procesamiento, por ejemplo, acabados pulidos, cepillados, arenado, grabados y coloreados. La importancia del acabado de la superficie para determinar la resistencia a la corrosión de la superficie de acero inoxidable no se puede enfatizar en exceso. Un acabado superficial rugoso puede reducir efectivamente la resistencia a la corrosión a la de un grado inferior de acero



inoxidable. Los estándares europeos para aceros inoxidable han intentado definir los acabados de superficie más comunes (Tabla 3). Sin embargo, debido a la naturaleza propietaria de los acabados de muchos proveedores, es poco probable que sea posible una estandarización completa (British Stainless Steel Association, 2018).

#### 2.4.2 Quitosano

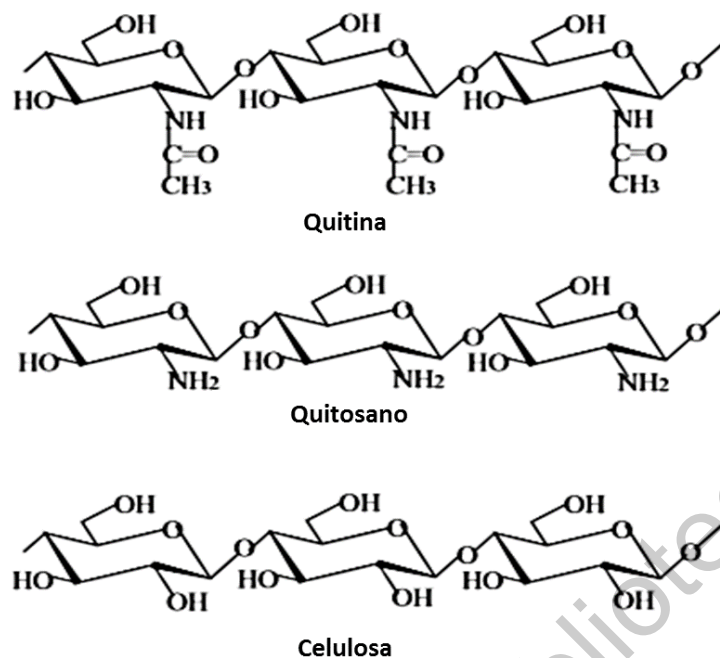
Como materiales funcionales, la quitina y el quitosano ofrecen un conjunto único de características: biocompatibilidad, biodegradabilidad a productos inocuos, no toxicidad, inercia fisiológica, propiedades antibacterianas, quelación de iones de metales pesados, propiedades de formación de gel e hidrofilia y afinidad notable a las proteínas. Debido a estas características que es posible su utilización como soportes de inmovilización de enzimas (Krajewska, 2004).

La quitina y el quitosano son poliaminosacáridos naturales, siendo la quitina uno de los recursos orgánicos renovables más abundantes del mundo. Es un constituyente importante de las conchas de crustáceos, los exoesqueletos de insectos y las paredes celulares de los hongos en donde proporciona fuerza y estabilidad. Se estima que al menos 10 Gt de quitina se sintetiza y degrada en la biosfera cada año. Químicamente, la quitina está compuesta de unidades de (2) acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucosa (o N-acetil-D-glucosamina), formando un polímero lineal de cadena larga (Fig. 6). Es insoluble en la mayoría de los solventes. El quitosano, el principal derivado de la quitina, se obtiene mediante N-desacetilación en una extensión variable que se caracteriza por el grado de desacetilación y, en consecuencia, es un copolímero de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina (Krajewska, 2004).

La quitina y el quitosano se pueden considerar químicamente como análogos de la celulosa, en la que el hidroxilo en el carbono-2 se ha reemplazado por acetamido y grupos amino, respectivamente. El quitosano es insoluble en agua, pero la presencia de grupos amino lo hace soluble en soluciones ácidas a

pH por debajo de 6.5. Es importante señalar que la quitina y el quitosano no son entidades químicas únicas, sino que varían en composición dependiendo del origen y el proceso de fabricación. El quitosano puede definirse como la quitina suficientemente desacetilada para formar sales de amina solubles, el grado de desacetilación necesario para obtener un producto soluble que es del 80-85 % o superior. (Krajewska, 2004).

El quitosano posee propiedades químicas y biológicas distintas. En sus cadenas lineales de poliglucosamina de alto peso molecular, el quitosano tiene grupos amino e hidroxilo reactivos, susceptibles de modificaciones químicas. Además, los grupos amino hacen que el quitosano sea un polielectrolito catiónico ( $pK_a \approx 6.5$ ), uno de los pocos que se encuentran en la naturaleza. Esta basicidad da propiedades singulares de quitosano: el quitosano es soluble en medios ácidos acuosos a  $pH < 6.5$  y cuando se disuelve posee una alta carga positiva en grupos  $NH_3^+$ , se adhiere a superficies cargadas negativamente, se agrega con compuestos polianiónicos y quelata iones de metales pesados. Tanto la solubilidad en soluciones ácidas como la agregación con polianiones imparten al quitosano excelentes propiedades de formación de gel. Fundamentalmente, como polímeros biodegradables y biodegradables, los materiales de quitina/quitosano son ecológicos, seguros para los seres humanos y el medio ambiente (Krajewska, 2004).



**Figura 6.** Estructura de la quitina, quitosano y celulosa (Krajewska, 2004).

### 2.4.3 Genipino

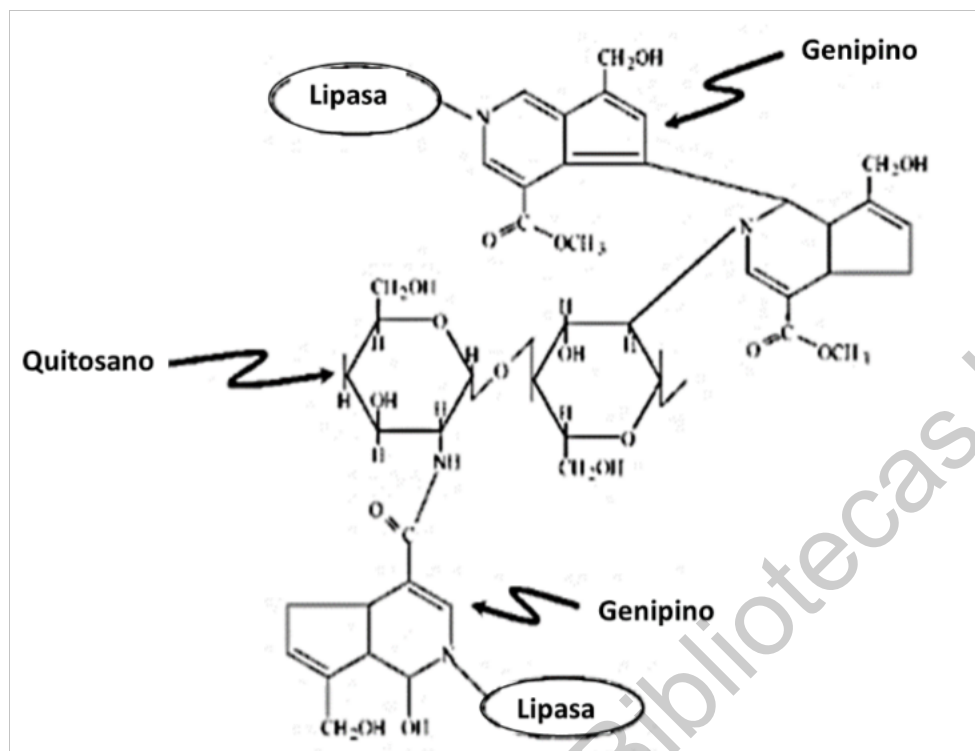
Uno de los numerosos enfoques para inmovilizar enzimas es la reticulación de los grupos amino en el soporte inerte y la proteína con glutaraldehído. Varias enzimas industrialmente relevantes, como la lipasa,  $\beta$ -galactosidasa, amilasa, invertasa, penicilina G acilasa, y celulasa se han inmovilizado en soportes o membranas por reticulación con glutaraldehído. Además de la pérdida indeseable en la actividad de la enzima para la participación de los grupos catalíticos en las interacciones responsables de la inmovilización, existe una preocupación creciente acerca de los posibles efectos adversos para la salud causados por el glutaraldehído (Chiou *et al.*, 2007). Se ha demostrado que induce irritación en los ojos, la piel y las vías respiratorias superiores, así como también dolores de cabeza, náuseas, fatiga y asma ocupacional (Burge, 1989; Goncalo *et al.*, 1984; Quirce *et al.*, 1999). Además, la mayoría de los reactivos de entrecruzamiento se sintetizan químicamente, utilizando procesos ambientalmente desfavorables. Por lo tanto, existe la necesidad de identificar reactivos de

reticulación alternativas no tóxicos y verdes para la inmovilización de enzimas a gran escala.

Se ha reportado el uso de genipino, un reactivo de reticulación natural y no tóxico, para la inmovilización de enzimas. El genipino (Fig. 7) se obtiene mediante la hidrólisis enzimática de genipósido, que se extrae de los frutos de *Gardenia jasminoides* (Fujikawa *et al.*, 1988; Fujikawa *et al.*, 1987). El genipino se ha utilizado con éxito para la reticulación eficiente de biomateriales para aplicaciones biomédicas, (Bigi *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2002; Chiou *et al.*, 2007; Mi *et al.*, 2000; Sung *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 2001) que revelan su nula toxicidad hacia materiales biológicos. Debido a estos hallazgos es que se está investigando la eficacia del genipino como un reticulante para la inmovilización de la lipasa (Chiou *et al.*, 2007). En la figura 8 se pueden observar las interacciones y enlaces hipotéticos de un sistema de inmovilización de lipasa conformado por una red de quitosano entrecruzado con genipino.



**Figura 7.** Estructura química del genipino, planta y fruto de *Gardenia jasminoides* de donde se extrae el genipósido.



**Figura 8.** Ilustración hipotética de la red de genipino entrecruzado con quitosano-lipasa (Chiou *et al.*, 2007).

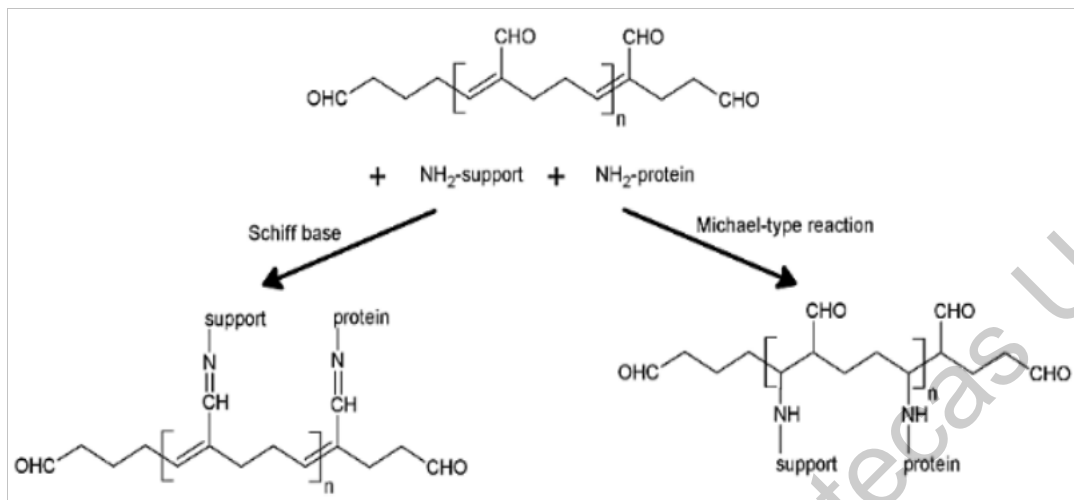
#### 2.4.4 Glutaraldehído

El glutaraldehído y los bis (imidoésteres) son los agentes de reticulación bifuncionales más utilizados. La naturaleza covalente de la interacción se refleja en la fuga mínima y la estabilidad operativa mejorada de las enzimas, mientras que el lado negativo es la posible modificación química de la superficie de la proteína. Las velocidades de difusión del sustrato / producto también pueden verse afectadas, y a menudo, es necesario el uso de reactivos tóxicos en condiciones de reacción complicadas (Zucca & Sanjust, 2014).

El glutaraldehído  $\text{OHC}-(\text{CH}_2)_3\text{-CHO}$  es un agente bifuncional muy popular en la reticulación de proteínas y en la inmovilización covalente, que necesita funciones  $-\text{NH}_2$  tanto en el vehículo como en la proteína. Las soluciones acuosas concentradas de glutaraldehído (25 % o 50 %) se encuentran fácilmente disponibles y son económicas, y el procedimiento es bastante simple, lo que

explica el gran éxito de este método. Dado que la reacción implica un aldehído bifuncional y moléculas aminadas, la formación de la base de Schiff entre el glutaraldehído y el soporte (en primer lugar), y el glutaraldehído y la proteína (más adelante) a menudo se describen erróneamente. Sin embargo, existe evidencia que sugiere lo contrario. (i) El enlace formado es típicamente irreversible; (ii) sólo el glutaraldehído produce dicha reacción, mientras que aldehídos bifuncionales similares (como malónico o succínico) reaccionan pobremente; (iii) a lo largo de la reacción, el soporte se vuelve intensamente coloreado; (iv) el HCl 6 M a 110 ° C durante 24 h no hidroliza los enlaces entre el glutaraldehído y las proteínas. Se ha demostrado que las soluciones comerciales de glutaraldehído contienen al menos 13 formas diferentes (dependiendo del pH, la concentración y la temperatura), incluidos los oligómeros que pueden evolucionar a aldehídos  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados después de la deshidratación (Barbosa *et al.*, 2014; Migneault, Dartiguenave, Bertrand, & Waldron, 2004).

En consecuencia, se han propuesto varios mecanismos en lugar de la formación de bases de Schiff. La más aceptada es la adición de tipo Michael de  $\text{-NH}_2$  a los enlaces dobles  $\alpha$ ,  $\beta$ , que produce una amina secundaria estable (Figura 9). Las formas heterocíclicas más raras de glutaraldehído podrían ser responsables del desarrollo del color durante la reacción. Sin embargo, el mecanismo exacto sigue siendo desconocido. En el protocolo típico, la reacción ocurre en neutral (usando tampón fosfato, es decir,) solución de glutaraldehído al 2,5 % que contiene 1 g de soporte por 100 ml de solución. Después de al menos 60 min, se utiliza el mismo tampón de fosfato para lavados exhaustivos. Una evaluación semicuantitativa del grado de activación podría estimarse observando el cambio de color del soporte a amarillo (activación baja) a naranja (moderado) a marrón rojizo (fuerte). Luego, el soporte activado está listo para el acoplamiento de proteínas a pH 6-8. A estos valores de pH, la función más reactiva es la proteína terminal  $\text{-NH}_2$  ( $\text{pK}_a \approx 7\text{--}8$ ). De hecho, este es uno de los pocos procedimientos de activación que se producen también con un pH ácido ligero (Barbosa *et al.*, 2013).



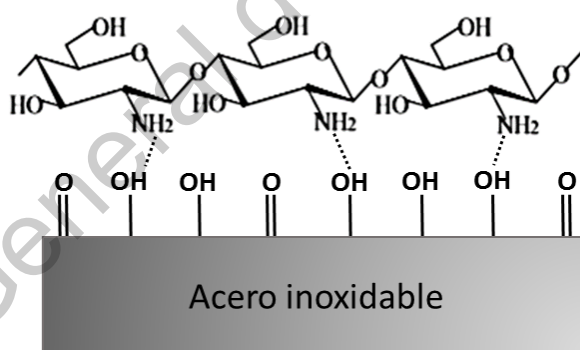
**Figura 9.** El glutaraldehído puede reaccionar teóricamente con los grupos  $\text{-NH}_2$  a través de dos mecanismos distintos: la base de Schiff y la adicción de tipo Michael. Sin embargo, el segundo es el más plausible. (Barbosa *et al.*, 2014; Migneault *et al.*, 2004).

Una ventaja importante de este método es la inserción de un espaciador molecular largo entre el soporte y la proteína, minimizando los problemas de impedimento estérico. Por otro lado, los soportes activados con glutaraldehído son portadores multifuncionales versátiles, que pueden proporcionar al menos dos tipos de interacciones (intercambio iónico y adsorción hidrófoba) además del enlace covalente. Por lo tanto, cuando se requiere la inmovilización covalente, se deben descartar cuidadosamente las interacciones débiles no específicas (es decir, el uso de detergentes catiónicos) (Barbosa *et al.*, 2012). Para este propósito, se deben preferir los soportes poco activados (es decir, usar bajas cantidades de glutaraldehído por soporte funciones amino). En algunos casos, la función multifuncional de los soportes activados con glutaraldehído puede ser una característica positiva, ya que las mezclas complejas resultantes de mecanismos de inmovilización (covalente, adsorción hidrofóbica, intercambio iónico, por ejemplo) dan como resultado una fuerte activación y estabilización de las enzimas.

También es posible un control estricto de los mecanismos de inmovilización deseados o no deseados, modulando, por ejemplo, la fuerza iónica o la presencia de detergentes para evitar interacciones no deseadas y promover los deseados. La mejora de la estabilidad y las características catalíticas utilizando el acoplamiento de glutaraldehído se ha descrito para varias enzimas, como proteasas, oxidasas, lipasas (Zucca & Sanjust, 2014).

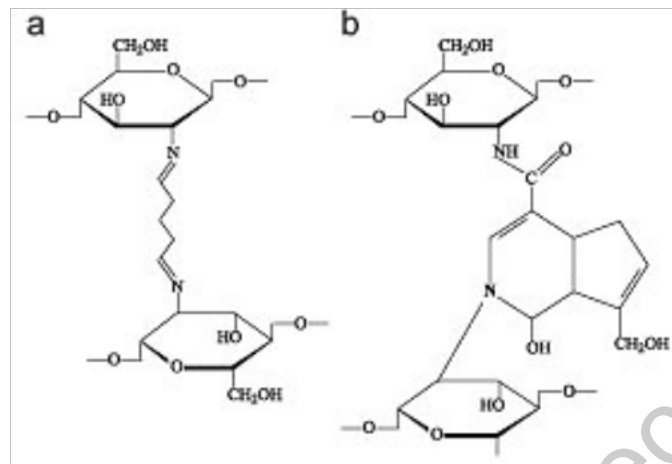
#### 2.4.5 Esquemas hipotéticos de la formación de enlaces e interacciones en el sistema de inmovilización

En las figuras 10, 11, 12 y 13 se ilustran los esquemas hipotéticos de las interacciones y los enlaces formados en las etapas de la inmovilización de una lipasa utilizando acero inoxidable austenítico 304 como soporte, funcionalizado con quitosano, formando una capa delgada de este material sobre la superficie del acero mediante fisorción, que posteriormente es entrecruzado con dos agentes, glutaraldehído y genipino.

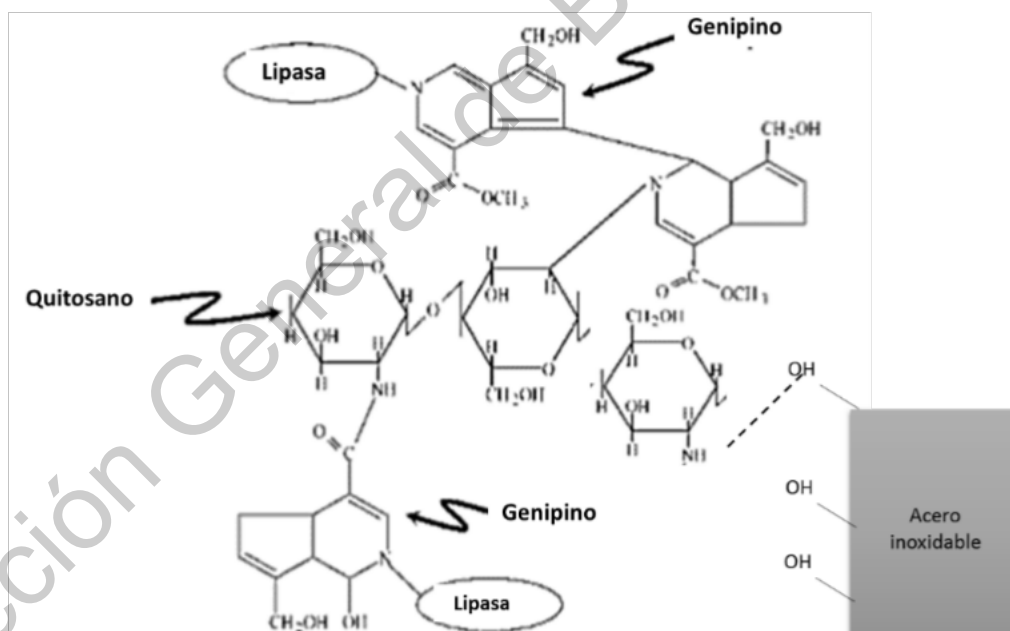


**Figura 10.** Enlaces formados al funcionalizar la superficie del acero inoxidable con una capa de quitosano.

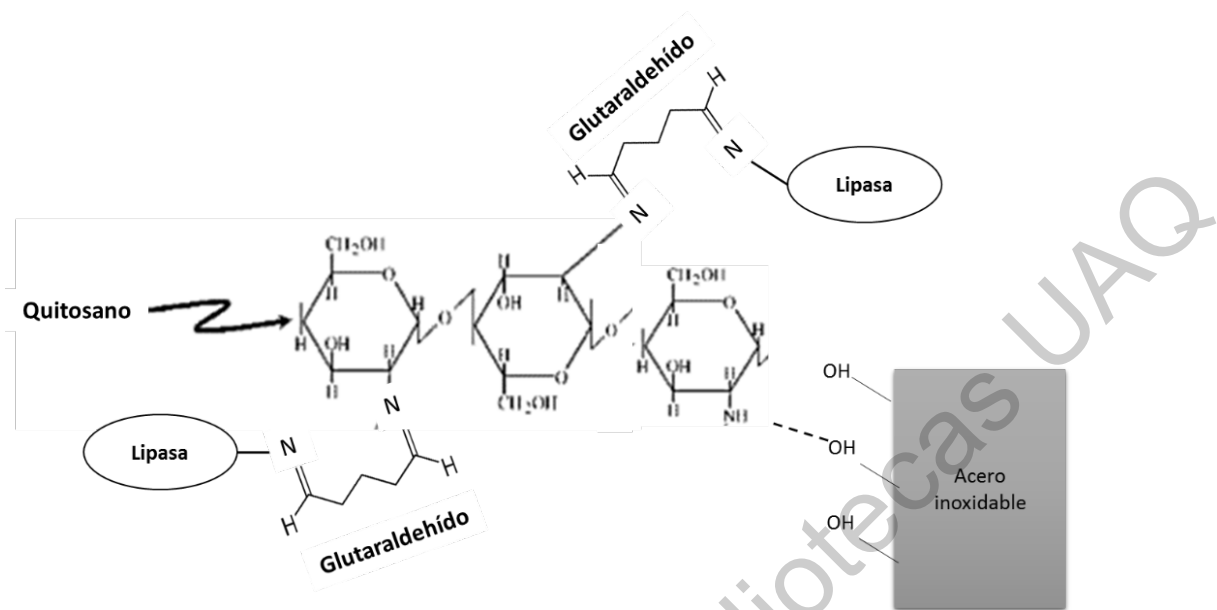




**Figura 11.** Entrecruzamiento de quitosano con a) glutaraldeído y b) genipino.



**Figura 12.** Enlaces formados en la inmovilización de lipasa en un soporte de acero inoxidable funcionalizado con quitosano y entrecruzado con genipino.



**Figura 13.** Enlaces formados en la inmovilización de lipasa en un soporte de acero inoxidable funcionalizado con quitosano y entrecruzado con glutaraldehído.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Evaluar la inmovilización de la enzima lipasa pancreática de cerdo en soportes de acero inoxidable para la producción de sabores enzimáticos lácteos.

#### 3.2 Objetivos Particulares

Establecer condiciones de pH y temperatura de mayor actividad enzimática para la enzima libre utilizando el sustrato específico *p*-nitrofenil palmitato.

Establecer una metodología para la inmovilización de lipasa pancreática de cerdo en placas de acero inoxidable 304 2B y evaluar la utilización de dos agentes entrecruzantes, además evaluar el efecto del tiempo y pH en la etapa de entrecruzamiento.

Evaluar el efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática, además del tiempo de almacenamiento y ciclos de reuso de la enzima inmovilizada, utilizando el sustrato específico *p*-nitrofenil palmitato y evaluar la actividad enzimática con sustrato lácteo, elaborando un sabor enzimático.

Determinar las interacciones entre la enzima, el soporte y el quitosano usado para facilitar el entrecruzamiento de la lipasa; así como la estructura superficial de la enzima inmovilizada mediante un análisis con microscopía electrónica de barrido.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales

Lipasa P comercial, descripción: es un sistema enzimático estandarizado, principalmente lipasa, extraída del páncreas de cerdo. Contiene amilasas y proteasas, presentación polvo amorfo de color crema. La muestra de lipasa fue proporcionada por la empresa RICAP S.A. de C.V.

Sustrato lácteo “queso fundido”, proporcionado por la empresa RICAP S.A. de C.V.

4-Nitrofenil palmitato (Sigma-Aldrich), sinónimos *p*-Nitrofenil palmitato.

Quitano (Sigma-Aldrich) mediano peso molecular, 375 kDa y desacetilación del 75 % y alto grado de pureza.

Genipino (Guangxi Shayun Biochemical Science and Technology Co.) extracto de *Gardenia Jasminoides*, pureza  $\geq 90$  %.

Glutaraldehído (Sigma-Aldrich) en solución al 25 % en agua, grado II.

Placas de acero inoxidable 304 terminado 2B, 2.5 cm largo por 2.5 cm de ancho y 1mm de grosor, calibre 18.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Contenido de proteína de la enzima comercial Lipasa P

Se determinó el contenido de proteína de la lipasa P, analizando la muestra proporcionado por la empresa RICAP S.A. de C.V., se realizó por método de Bradford, (1976), siguiendo el protocolo de Ausubel, (2002).

Se prepararon 5 muestras de lipasa P con un rango de 1 a 5 mg/mL disueltas en solución de cloruro de sodio 0.15 M, se agitaron en vortex durante 10 segundos cada 10 min a lo largo de una hora, y posteriormente se sonicaron durante 1 minuto a 70 % de amplitud. Las muestras se prepararon por duplicado. Se tomaron 100  $\mu$ L de solución y se colocaron en tubos Eppendorf. Se les agregó 1 mL de solución de azul de coomassie a cada una de las muestras de lipasa, blancos y estándar de BSA. Se agitaron en vortex y se dejan 2 min a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia  $A_{595}$ . Se determinó la concentración de la muestra analizada de lipasa a partir de la curva estándar.

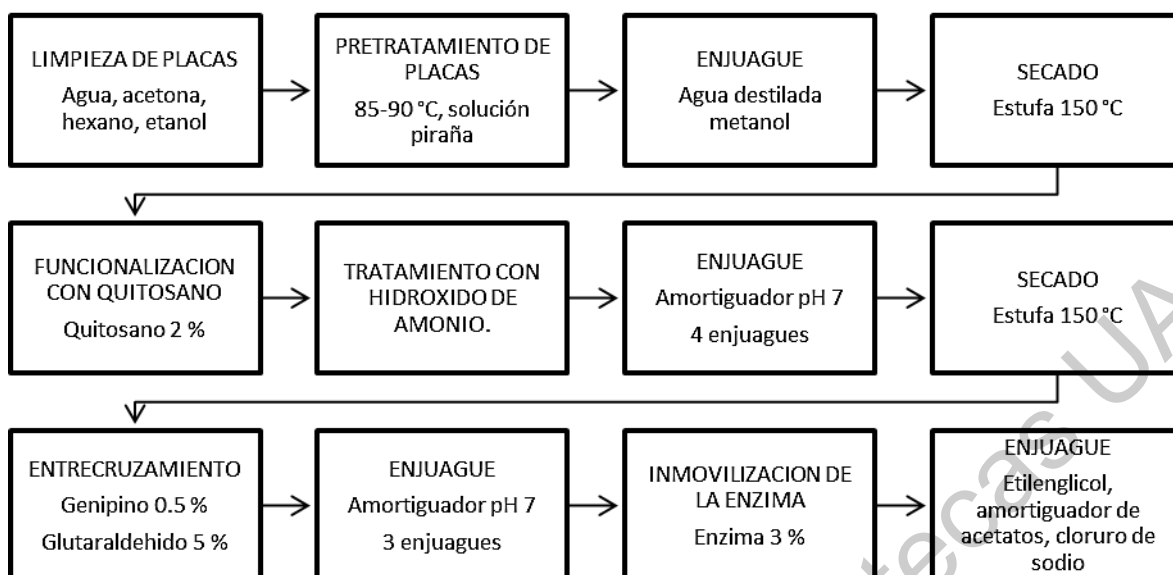
### 4.2.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

Para observar la separación de proteínas de la enzima comercial lipasa se realiza un análisis electroforético SDS-PAGE, ya que de acuerdo a la ficha técnica es una mezcla de enzimas. Para realizar el ensayo se siguió el protocolo de Ausubel (2002). Se prepararon los reactivos: acrilamida/ bisacrilamida, se diluyó 30 % acrilamida (7.5 g) y 8 % bis acrilamida (0.2 g) en agua destilada, se llevó a 25 mL de volumen y se filtró. Amortiguador 4x Tris-Cl/SDS, pH 6.8, se añadió 6.05 g de Tris base (0.5 M Tris Cl, final) y 0.4 g de SDS (0.4 % final) a 40 mL de agua, se ajustó el pH con HCl 1 N y se llevó a 100 mL de volumen. Se filtró la solución utilizando un filtro de 0.45  $\mu$ m, se conserva a 4 °C. Amortiguador 4x Tris-Cl/SDS, pH 8.8, se añadió 91 g de Tris base (1.5 M Tris Cl, final) y 2 g de SDS (0.4 % final) a 300 mL de agua, se ajustó el pH con HCl 1 N y se llevó a 500 mL de volumen. Se filtró la solución utilizando un filtro de 0.45  $\mu$ m, se conserva a 4 °C.

Amortiguador de carga SDS 2x, 25 mL de amortiguador 4x Tris-Cl/SDS pH 6.8, 20 mL de glicerol, 4 g de SDS 2 mL de 2-Mercaptoetanol o 3.1 g de DTT, 1 mg de azul de bromofenol, se llevó a 100 mL de volumen en agua destilada y desionizada. Se mezcló y separó en tubos alícuotas de 1 mL, se almacena a -70 °C. Amortiguador de corrida SDS 5x, 15.1 g de Tris base, 72.0 g de glicina, 5.0 g de SDS, se llevó a volumen de 100 mL en agua destilada y desionizada. Se diluyó a 1x antes de usar. Se almacena de 0 a 4 °C hasta su uso. Marcador de peso molecular, se utilizó un marcador de bajo peso molecular GE Healthcare LMW-SDS Marker Kit 17044601. Se utilizó persulfato de amonio al 10 % en agua. Se utilizó un kit de electroforesis vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell marca BioRad 165-8001. La muestra de lipasa (Enmex, LAP 6R190) a analizar se preparó disolviendo 5 mg/mL de la enzima en agua desionizada y se utilizó un gel 12 %. El gel obtenido de la separación electroforética se observó con el fotodocumentador Alpha Imager y para el análisis se utilizó el software Alpha view 3.4.0.0.

#### 4.2.3 Inmovilización de lipasa en placas de acero inoxidable

Se determinó la metodología de inmovilización de la lipasa sobre placas de acero inoxidable 304 acabado 2B, se siguió la metodología propuesta para la limpieza y el pretratamiento del acero inoxidable propuesta por Barbes *et al.*, (2008) y Benvenuto *et al.*, (2015) y posteriormente se funcionalizó el acero utilizando quitosano y una etapa de entrecruzamiento, donde se evaluaron dos agentes entrecruzantes, genipino y glutaraldehído, el proceso general se describe en el siguiente diagrama (Fig. 14). La variable de respuesta es la actividad enzimática de la enzima inmovilizada, además de que se evalúa la cantidad de enzima inmovilizada.



**Figura 14.** Diagrama general de proceso de inmovilización de lipasa en acero inoxidable.

#### 4.2.3.1 Limpieza y pretratamiento de superficie de acero inoxidable

La limpieza y pretratamiento de las placas de acero inoxidable se realizó siguiendo la metodología propuesta por Barbes *et al.*, (2008) y Benvenuto *et al.*, (2015). Se realizaron lavados utilizando diferentes solventes a una temperatura constante de 50°C y bajo sonicación con una amplitud de 70 %. El primer lavado se realizó con acetona durante 5 min, seguido de agua destilada durante 5 min, 15 min en hexano, 15 min en agua destilada, 20 min en etanol al 95 % y finalmente 20 min con agua destilada con el fin de eliminar contaminantes no polares y polares débilmente adsorbidos. Al finalizar los lavados, las placas se trataron en una solución piraña (2.7:1) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % manteniendo en baño María a 85-90 °C (Fig. 15), durante 30 min a temperatura constante (en campana de extracción con extremo cuidado).



**Figura 15.** Pretratamiento de las placas de acero inoxidable con solución piraña en baño María.

Finalmente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada y 3 enjuagues con metanol. El secado de las placas de acero, se realizó en una estufa a 150 °C durante 50 min. (Las placas se pueden conservar a temperatura ambiente no más de 2 días y 70 % humedad relativa (HR)).

#### 4.2.3.2 Funcionalización del acero inoxidable

Las placas de acero inoxidable se sumergieron en una solución de quitosano (2 %), preparado en ácido acético (0.35 M), durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizó un tratamiento de las placas poniéndolas en contacto con una solución de hidróxido de amonio (28 %  $\text{NH}_3$  en  $\text{H}_2\text{O}$ ) y etanol en una relación 4:1 durante 12 h en la campana de extracción. Posteriormente se realizaron 4 lavados de las placas, cada uno de 15 min, con amortiguador citrato-fosfato pH 7 0.05 M, seguido de un secado en estufa durante 50 min a 150 °C.





**Figura 16.** Placas de acero inoxidable después de la funcionalización con quitosano y el tratamiento con hidróxido de amonio.

#### 4.2.3.3 Entrecruzamiento con genipino

Se sumergieron las placas en una solución de genipino (0.05 %) disuelto en dimetilsulfoxido y diluido posteriormente con amortiguador de fosfato-citrato pH 7 0.05 M, a un pH y durante un tiempo definidos, posteriormente se lavaron las placas 3 veces con amortiguador de fosfato-citrato pH 7 0.05 M.

**Tabla 4.** Diseño experimental en la etapa de entrecruzamiento con genipino, para evaluar el efecto de pH y tiempo sobre la actividad enzimática.

Tratamiento	pH solución de genipino	Tiempo (h)
1	4.5	2
2	4.5	3
3	4.5	4
4	5.5	2
5	5.5	3
6	5.5	4
7	7.5	2
8	7.5	3
9	7.5	4

En esta etapa se realizó un diseño experimental bifactorial completamente aleatorizado ( $3^2$ ), con factores tiempo de entrecruzamiento y pH de entrecruzamiento. Los niveles para tiempo fueron 2, 3 y 4 h; los niveles para pH fueron 4.5, 5.5 y 7.5, con actividad enzimática como variable de respuesta, se realizó por duplicado (Tabla 4). Se utilizó el programa estadístico R para el análisis de los resultados obtenidos (R Core Team, 2018).

#### 4.2.3.4 Entrecruzamiento con glutaraldehído

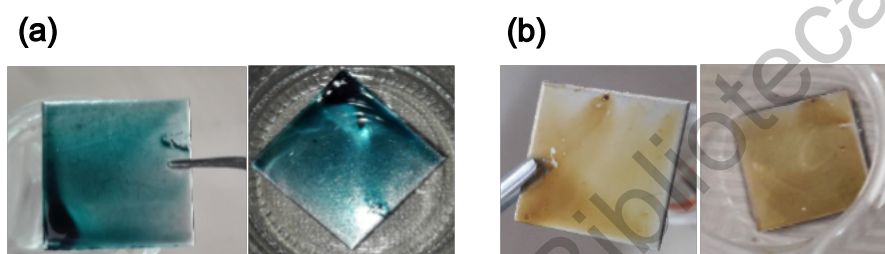
Se sumergieron las placas en una solución de glutaraldehído (5 %) en amortiguador de fosfato-citrato pH 7 0.05 M, a un pH y durante un tiempo definidos, posteriormente se lavaron las placas 3 veces con amortiguador de fosfato-citrato pH 7 0.05 M. En esta etapa se realizó un diseño experimental bifactorial completamente aleatorizado ( $3^2$ ), con factores tiempo de entrecruzamiento y pH de entrecruzamiento, los niveles para tiempo fueron 5, 6 y 7 h. Los niveles para pH fueron 5, 6 y 7, con actividad enzimática como variable de respuesta, se realizó por duplicado (Tabla 5). Se utilizó el programa estadístico R para el análisis de los resultados obtenidos (R Core Team, 2018).

**Tabla 5.** Diseño experimental en la etapa de entrecruzamiento con glutaraldehído, para encontrar las condiciones de pH y tiempo de máxima actividad enzimática.

Tratamiento	pH solución de glutaraldehído	Tiempo (h)
1	5	5
2	5	6
3	5	7
4	6	5
5	6	6
6	6	7
7	7	5
8	7	6
9	7	7

#### 4.2.3.5 Adición de lipasa

Se pusieron en contacto las placas con una solución de lipasa (3 %) disuelta en amortiguador de fosfato-citrato pH 7 0.05 M, durante 12 h a temperatura ambiente. Se realizó un último lavado en 3 etapas, etilenglicol al 30 % v/v, cloruro de sodio 1 M y amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4.5. Las placas con la enzima inmovilizada se almacenan en amortiguador fosfato-citrato pH 7 0.05 M a 4 °C.



**Figura 17.** Placa de acero con la lipasa inmovilizada (a) con genipino y (b) con glutaraldehído.

#### 4.2.4 Determinación de cantidad de enzima inmovilizada

La cantidad de lipasa inmovilizada se determinó por diferencia entre el contenido de proteína en la solución de enzima del sobrenadante después de inmovilizar y la solución de enzima inicial. Determinación de proteínas se realizó por método de Bradford, (1976), siguiendo el protocolo de ensayo de Ausubel (2002).

Se preparó el reactivo de Bradford (Coomassie brilliant blue solution) diluyendo 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol al 95 %; se agregó 100 mL de ácido fosfórico al 85 % y se llevó a 1 litro el volumen total. Posteriormente se filtró a través de un papel filtro Whatman no. 1, se almacena a 4 °C. Se preparó una solución de proteína estándar, utilizando albumina sérica bovina BSA (0.5 mg/mL) se pesó 0.5 mg y se disolvió en 1 mL de agua destilada, se pasó por el agitador vortex. Para la curva de calibración se prepararon

diluciones del BSA (0.5 mg/mL) con NaCl 0.15 M, por triplicado. Se agregó a cada tubo de estándar BSA y muestras de enzima a analizar 1 mL de solución de azul de coomassie. Se mezcló con ayuda del vortex y se dejan 2 min a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia  $A_{595}$ . Se elabora la curva estándar graficando los valores obtenidos de la absorbancia contra la concentración de proteína de las muestras estándar BSA, y con esta se determina la concentración de las muestras analizadas de lipasa.

#### 4.2.5 Ensayo de la actividad lipolítica

##### 4.2.5.1 Curvas estándar de p- nitrofenol

Se realizaron curvas estándar de p- nitrofenol, se prepararon 2 soluciones con concentraciones distintas de p- nitrofenol, se realizó una curva para cada una. Se mezcló agua, p-nitrofenol y NaOH 0.2 M en las cantidades que se muestran en la Tabla 6.

Se mezcló y agitó en vortex, se transfirió a una micro placa de pozos y se leyó a una absorbancia  $A_{415}$ . Se registran los datos y se realiza la curva estándar de calibración graficando la concentración de p-nitrofenol vs lectura de absorbancia; esta se utilizó para calcular el p- nitrofenol liberado en la reacción enzimática.

**Tabla 6.** Preparación de curvas estándar de p-nitrofenol, a)  $5 \times 10^{-5}$  M. b)  $1 \times 10^{-4}$  M.

a)	No. tubo	p-nitrofenol $5 \times 10^{-5}$ M (mL)	Agua (mL)	NaOH 0.2 M (mL)
	1	0	4.5	0.5
	2	0.5	4	0.5
	3	1	3.5	0.5
	4	2	2.5	0.5
	5	3	1.5	0.5
	6	4	0.5	0.5
	7	4.5	0	0.5

b)	No. tubo	$\rho$ -nitrofenol $1 \times 10^{-4}$ M (mL)	Agua (mL)	NaOH 0.2 M (mL)
	1	0	4.5	0.5
	2	0.5	4	0.5
	3	1	3.5	0.5
	4	2	2.5	0.5
	5	3	1.5	0.5
	6	4	0.5	0.5
	7	4.5	0	0.5

#### 4.2.5.2 Determinación de actividad lipolítica

El análisis de la actividad de la lipasa se realizó por un método colorimétrico de acuerdo a Winkler & Stuckmann (1979), se evaluó usando  $\rho$ -nitrofenil palmitato (Sigma) como sustrato. Para preparar 100 mL de sustrato 790  $\mu$ M se mezcló 10 mililitros de isopropanol que contienen 30 mg de  $\rho$ -nitrofenil palmitato y se le agregó 90 ml de tampón de fosfato 0.05 M pH 8, que contiene 207 mg de desoxicolato de sodio. Para los ensayos de actividad de enzima libre se utilizó una cantidad de 2.4 mL de esta solución de sustrato recién preparada precalentada a 37 °C y luego se mezcló con 0.1 mL de enzima al 3 %. Después de 15 min de incubación a 37 °C, se le agregó 50  $\mu$ L de tritón X-100 para clarificar el líquido a analizar y se detuvo la reacción con un baño de hielo (Gupta *et al.*, 2002). Se midió la absorbancia a 415 nm frente a un control libre de enzimas. Para los ensayos de la enzima inmovilizada se usaron 15 mL de sustrato en donde se sumergió la placa con la enzima inmovilizada y se siguió el resto del proceso descrito anteriormente. Una unidad de enzima se define como 1 nmol de  $\rho$ -nitrofenol liberado enzimáticamente del sustrato mL min<sup>-1</sup>. En las condiciones descritas, el coeficiente de extinción de  $\rho$ -nitrofenol es  $\epsilon_{410} = 15,000 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ .

Para evaluar la actividad enzimática utilizando sustrato lácteo se utilizó el sustrato “queso fundido” proporcionado por la empresa RICAP S.A. de C.V. En el proceso de elaboración del queso enzimático al sustrato lácteo se le adicionan 3 enzimas, utilizando además de la lipasa, dos proteasas, Neutrasa y Flavourzyme. Durante el proceso midió el pH, % de acidez y el aroma como indicadores del proceso enzimático. Se precalentó el sustrato a 50 °C en baño María. Para evaluar la enzima libre se tomaron 25 gramos de sustrato y se le agregó 0.01675 g de lipasa (0.067 %), 0.1925 g de neutrasa (0.077 %) y 0.012 g de flavourzyme (0.048 %), se agitó por 10 min, posteriormente se incubó a 50 °C. Para evaluar la enzima inmovilizada se tomaron 25 gramos de sustrato en un recipiente al cual se le agregaron 5 placas con lipasa, 2 placas con neutrasa y 2 placas con flavourzyme inmovilizadas, posteriormente se incubó a 50 °C. El proceso se continuó hasta obtener los valores especificados de pH (4.5-5.5), acidez (5-7 %, expresada en ácido láctico) y aroma característico del producto terminado “queso enzimático”. El producto final de la reacción enzimática se analizó para determinar los compuestos de sabor generados en un cromatógrafo de gases 7890A (Agilent Technologies, Inc., Wilmington, EUA), acoplado a un detector de ionización de flama FID, un espectrómetro de masas y utilizando una columna capilar DB-FFAP (30 m) (Agilent). Con los resultados obtenidos se hizo una comparación de los compuestos asociados al sabor lácteo (ácidos grasos) producidos con la enzima inmovilizada y con la enzima libre. Los análisis se realizaron en las instalaciones del Centro De Investigación En Ciencia Aplicada Y Tecnología Avanzada (CICATA-IPN), unidad Querétaro.

#### 4.2.6 Eficiencia de la inmovilización

La eficiencia de la inmovilización se calculó a partir de la diferencia entre las actividades enzimáticas de la enzima libre antes de inmovilizar y la enzima inmovilizada, recuperadas en el sobrenadante antes de la inmovilización y utilizando las placas con lipasa inmovilizada. La actividad enzimática se analizó por el método colorimétrico descrito anteriormente (Gupta *et al.*, 2002).

La eficiencia de inmovilización (EI) se calculó por la ecuación 1, previamente descrito por Sheldon & van Pelt, (2013):

$$EI = \frac{\text{Actividad observada}}{\text{Actividad inmovilizada}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

#### 4.2.7 Propiedades térmicas y cinéticas de la enzima libre e inmovilizada

Se evaluaron y compararon las propiedades de la enzima inmovilizada y libre, evaluando el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática, tiempo de reacción y se determinaron los parámetros cinéticos  $K_M$  y  $V_{MAX}$ .

##### 4.2.7.1 Evaluación de efecto de pH y temperatura sobre la enzima libre e inmovilizada

Para determinar el tiempo de la reacción enzimática se preparó sustrato p-nitrofenil palmitato 790  $\mu\text{M}$ , a pH 8 y se incubó a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Para la enzima libre se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de lipasa al 3 % y se mezcló con 2.4 mL de sustrato y para la enzima inmovilizada se tomó una placa y se sumergió en 15 mL de sustrato, se realiza por triplicado, se tomaron muestras del producto de la reacción cada determinado tiempo y se midió la actividad enzimática por el método colorimétrico descrito anteriormente (Gupta *et al.*, 2002).

Para la evaluación del efecto del pH se prepararon soluciones amortiguadoras con un rango de valores de pH entre 6 y 10 que posteriormente fueron utilizadas para preparar la solución de sustrato p-nitrofenil palmitato 790  $\mu\text{M}$ , después se agregó la enzima libre e inmovilizada, se incubó a 37  $^{\circ}\text{C}$  y se determinó la actividad enzimática por el método colorimétrico descrito anteriormente (Gupta *et al.*, 2002).

Para la evaluación del efecto de la temperatura se prepararon soluciones de sustrato p-nitrofenil palmitato 790  $\mu\text{M}$  con el pH encontrado en la etapa anterior

en el cual se observó la mayor actividad enzimática. Después se agregó la enzima libre e inmovilizada, se incubó en un rango de temperaturas de 25 a 80 °C y se determinó la actividad enzimática por el método colorimétrico descrito anteriormente (Gupta *et al.*, 2002).

#### 4.2.7.2 Determinación de parámetros cinéticos de la enzima libre e inmovilizada

Los parámetros cinéticos se determinaron a partir de la medición de la actividad enzimática utilizando sustrato *p*-nitrofenil palmitato preparado a concentraciones entre 0 y 1383  $\mu$ M, con tiempo de reacción, pH de sustrato y temperatura de incubación determinados en las etapas anteriores, tanto para la enzima libre como para la inmovilizada utilizando el método colorimétrico (Gupta *et al.*, 2002). Para la enzima libre se tomó 0.1 mL de lipasa 3 % y se agregó a 2.4 mL de sustrato, se incubó y se tomó una muestra del sobrenadante y se midió la absorbancia a 415 nm. Para la enzima inmovilizada se tomó una placa con lipasa inmovilizada y se sumergió en 15 mL de sustrato, se incubó, se tomó una muestra del sobrenadante y se midió la absorbancia a 415 nm.

#### 4.2.8 Ciclos de reuso con sustrato sintético

Los ciclos de reuso de la enzima inmovilizada se evaluaron utilizando el sustrato *p*-nitrofenil palmitato, se sumergieron las placas con lipasa inmovilizada en 15 mL de sustrato 790  $\mu$ M pH 10, preparado con amortiguador carbonato-bicarbonato pH 10 0.05 M y ajustado con NaOH. Se realizaron ciclos de 3 h cada uno con temperatura de incubación de 65°C, haciendo un enjuague de las placas con solución amortiguadora fosfato-citrato pH 7 0.05 M después de cada ciclo y reintroduciéndolas en sustrato recién preparado. El producto de la reacción después de cada ciclo se midió mediante el método colorimétrico descrito anteriormente (Gupta *et al.*, 2002). El proceso se repitió “n” veces hasta que la actividad enzimática disminuyera un 30 % respecto a la actividad inicial.

#### 4.2.9 Tiempo de almacenamiento de las placas con enzima inmovilizada

Se evaluó semanalmente la actividad enzimática de la lipasa inmovilizada,



utilizando *p*-nitrofenil palmitato 790  $\mu$ M como sustrato y analizando mediante el método colorimétrico (Gupta *et al.*, 2002). Las placas con lipasa inmovilizada se almacenaron en refrigeración a 4 °C en solución amortiguadora fosfato-citrato pH 7 0.05 M, la actividad se evaluó sumergiendo las placas en 15 mL de sustrato pH 10 e incubando a 65 °C, se tomaron muestras del sobrenadante para medir absorbancia a 415 nm, se continuó el almacenamiento hasta observar un decremento de más del 50 % de actividad enzimática.

#### 4.2.10 Interacciones entre los componentes de la inmovilización

Para evaluar la composición superficial de cada etapa del proceso de inmovilización se realizó un análisis elemental mediante la técnica de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), utilizando un espectrómetro K-Alpha™+ surface analysis (Thermo scientific, Massachusetts, EUA) en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ), ubicado en Pedro Escobedo, Querétaro. Las muestras analizadas se prepararon y separaron en cada etapa de la inmovilización: placa de acero inoxidable, capa de quitosano, después del entrecruzamiento e inmovilización final y se les realizó un secado a temperatura ambiente.

#### 4.2.11 Morfología superficial del sistema de inmovilización

Se observó la estructura superficial del sistema de inmovilización mediante microscopia electrónica de barrido, utilizando microscopio electrónico modelo EVO-50 (Carl Zeiss, Inglaterra, RU), las muestras analizadas fueron capa de quitosano, etapa de entrecruzamiento e inmovilización final, las muestras se secaron a temperatura ambiente y posteriormente fueron recubiertas con oro como se observa en la figura 18 (DESK II, Denton vacuum, New Jersey, EUA; EM ACE200, Leica, Wetzlar, Alemania; SC7620, Quórum, East Sussex, RU), se realizó en el laboratorio nacional de identificación y caracterización vegetal sede Querétaro, facultad de ciencias naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.



**Figura 18.** Preparación y recubrimiento con oro de las muestras a analizar por microscopia electrónica de barrido.

#### 4.2.12 Análisis estadístico

Todas las pruebas se realizaron por triplicado, y los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. En la etapa de entrecruzamiento de la inmovilización, se utilizó un diseño bifactorial completamente aleatorizado  $3^2$  para evaluar los efectos y las interacciones en los factores tiempo de contacto y pH de la solución. Como variable de respuesta se evalúa la actividad enzimática, haciendo un análisis de varianza y un gráfico de interacción, utilizando el programa estadístico R (R Core Team, 2018).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Caracterización de la enzima libre

La enzima comercial lipasa P reporta en su ficha técnica de especificación de producto, la descripción del producto como un sistema enzimático estandarizado, principalmente lipasa, extraída de páncreas de cerdo, que contiene amilasa y proteasa. Polvo amorfo color crema, libre de olores ofensivos y es normalmente usado para hidrolisis de lípidos. Al tratarse de un producto que no tiene un alto grado de pureza y es una mezcla de enzimas es importante determinar el contenido de proteína y el contenido de lipasa de la muestra, ya que es necesario poder hacer comparaciones entre la enzima libre e inmovilizada en función de la proteína y con el fin de determinar la cantidad de placas con lipasa inmovilizada que se utilizarán en la formulación del sabor enzimático.

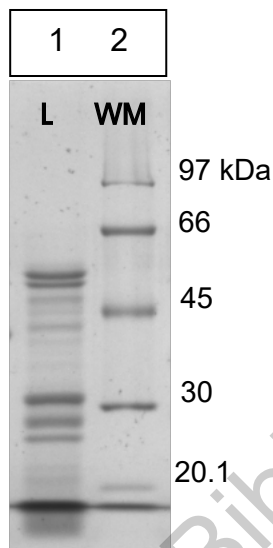
#### 5.1.1 Determinación de contenido de proteína

El contenido de proteína obtenido de la muestra de lipasa analizada fue de  $28.2 \pm 0.048$  %, el método de Bradford ha sido utilizado para cuantificar proteína de soluciones de enzimas comerciales, utilizándose como método de referencia respecto a otros métodos de análisis (Nicolás *et al.*, 2017). La cuantificación de proteína fue de utilidad para determinar la cantidad de proteína que se agrega en la formulación del queso enzimático en el proceso estándar con enzima libre, ya que solo estaba determinado por el peso del polvo y no en función de la cantidad de proteína. Para el cálculo de la cantidad de placas necesarias para la formulación del sabor enzimático se utilizó la determinación de  $\text{mg m}^{-2}$  de proteína inmovilizada comparando con la formulación estándar.

#### 5.1.2 Separación electroforética

En el gel SDS-PAGE se detectaron 10 bandas de proteínas que varían de 14 a 52 kDa en la muestra de lipasa (Fig. 19). El peso molecular reportado de la lipasa es de 50-52 kDa (Mendes *et al.*, 2012), se pueden observar dos bandas en ese rango de peso molecular, asumiendo por lo tanto que se trata de la lipasa.

Estas dos bandas representan el 29.92 % del total de la proteína separada, las bandas restantes corresponderían a las amilasa y proteasas, y alguna otra proteína presente en la muestra.



**Figura 19.** Gel de electroforesis obtenido. Carril 1 L= lipasa, carril 2 WM=marcador de peso molecular.

## 5.2 Inmovilización de lipasa en soporte de acero inoxidable

La metodología establecida para la inmovilización de lipasa pancreática de cerdo en placa de acero inoxidable 304 2B, permitió inmovilizar de manera exitosa  $169.04 \text{ mg m}^{-2}$  con el uso de glutaraldehído y  $131.9 \text{ mg m}^{-2}$  con el uso de genipino. Ha sido reportado el uso de glutaraldehído en la inmovilización de lipasas sobre soportes activados o funcionalizados, el uso de este agente entrecruzante ayuda a mejorar la estabilidad de la enzima (Barbosa *et al.*, 2014) y también en soportes de quitosano entrecruzado con glutaraldehído obteniendo  $287.2 \text{ } \mu\text{g}$  lipasa por g de quitosano (Hung *et al.*, 2003). El genipino es un reactivo de entrecruzamiento natural compatible con aplicaciones alimentarias y es una alternativa al glutaraldehído, que es el más usado tradicionalmente (Barbosa *et al.*, 2014). En el proceso el uso de genipino dio como resultado una menor cantidad de proteína inmovilizada, sin embargo, no se descarta su uso debido a su naturaleza no tóxica,

su origen natural y su extracción amigable con el ambiente. Además, en otros trabajos se ha reportado un mejor rendimiento comparado con el glutaraldehído en la inmovilización de otras enzimas (Klein *et al.*, 2016; Mi *et al.*, 2000) y su uso con quitosano para la inmovilización de lipasa (Chiou *et al.*, 2007).

**Tabla 7.** Cantidad de enzima y quitosano en la inmovilización sobre placas de acero inoxidable.

Componente	Con glutaraldehído / con genipino (mg m <sup>-2</sup> )
Lipasa	169.04 / 131.9
Quitosano	13600

### 5.3 Eficiencia de la inmovilización

La eficiencia de inmovilización (IE) calculada para la inmovilización utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante fue de 8.42 % y con genipino 7.80 %, Kilinç *et al.*, (2006) mencionan un rendimiento de actividad enzimática del 13.6 y 15.1 % en la inmovilización de lipasa pancreática de cerdo mediante adsorción en quitina y quitosano respectivamente, y utilizando glutaraldehído. La eficiencia obtenida es baja comparada con el trabajo mencionado, pero la inmovilización tiene una buena estabilidad y la capacidad de ser reutilizada en varios ciclos, además de que el uso de un soporte como el acero inoxidable le brinda la facilidad de manipulación.

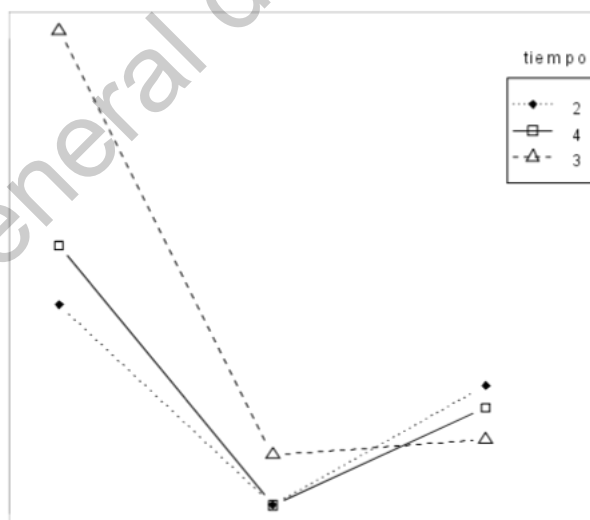
### 5.4 Diseño experimental: pH y tiempo de entrecruzamiento

El tratamiento de pH 4.5 y 3 h en la etapa de entrecruzamiento con genipino (Tabla 8) muestra la mayor actividad enzimática, no se encuentra una diferencia significativa estadísticamente, en el anexo 7 se muestra la tabla de ANDEVA. El valor P para el factor pH es 0.059, 0.88 para el factor tiempo y 0.71 para el efecto de interacción, por lo que se podría decir que el efecto del pH es el de mayor relevancia. De forma práctica, este análisis es de utilidad para

establecer las condiciones durante el proceso de inmovilización que nos proporcionen la mayor actividad enzimática posible. En la Figura 20 podemos observar la interacción de los dos factores del diseño, definiendo que el efecto es mayor para el factor pH.

**Tabla 8.** Resultados del diseño experimental en la etapa de entrecruzamiento con genipino, n=2.

Tratamiento	pH	Tiempo (h)	Actividad enzimática (nM min <sup>-1</sup> )
1	4.5	2	260.31 ± 3.49
2	4.5	3	404.44 ± 10.91
3	4.5	4	291.48 ± 5.67
4	5.5	2	155.06 ± 2.18
5	5.5	3	181.30 ± 2.62
6	5.5	4	154.75 ± 4.37
7	7.5	2	217.72 ± 6.11
8	7.5	3	189.32 ± 6.11
9	7.5	4	206.30 ± 1.31

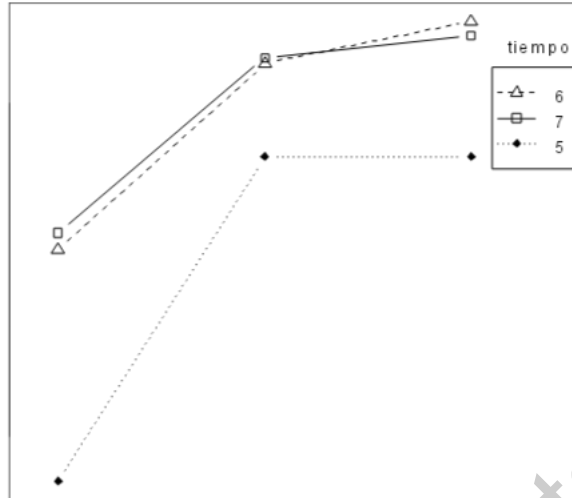


**Figura 20.** Gráfica de interacción de los factores tiempo y pH en la etapa de entrecruzamiento con genipino, (actividad enzimática expresada en nM min<sup>-1</sup> y tiempo en h).

El tratamiento de pH 7 y 6 h en la etapa de entrecruzamiento con glutaraldehído (Tabla 9) muestra la mayor actividad enzimática, se encontró diferencia significativa en ambos factores evaluados, no así en el efecto de la interacción, en el anexo 8 se muestra la tabla de ANDEVA. El valor P para el factor pH es 0.0000358, 0.00233 para el tiempo y 0.2357 para el efecto de la interacción. En la Figura 21 podemos observar la gráfica de interacción de los dos factores del diseño experimental, en donde se aprecia que aparentemente no existe efecto de la interacción como lo indica el análisis de varianza.

**Tabla 9.** Resultados del diseño experimental en la etapa de entrecruzamiento con glutaraldehído, n=2.

Tratamiento	pH	Tiempo (h)	Actividad enzimática (nM min <sup>-1</sup> )
1	5	5	230.06 ± 5.24
2	5	6	334.07 ± 2.18
3	5	7	341.79 ± 2.62
4	6	5	376.05 ± 3.93
5	6	6	417.72 ± 1.75
6	6	7	420.49 ± 5.67
7	7	5	376.05 ± 10.04
8	7	6	436.85 ± 6.11
9	7	7	430.37 ± 5.67



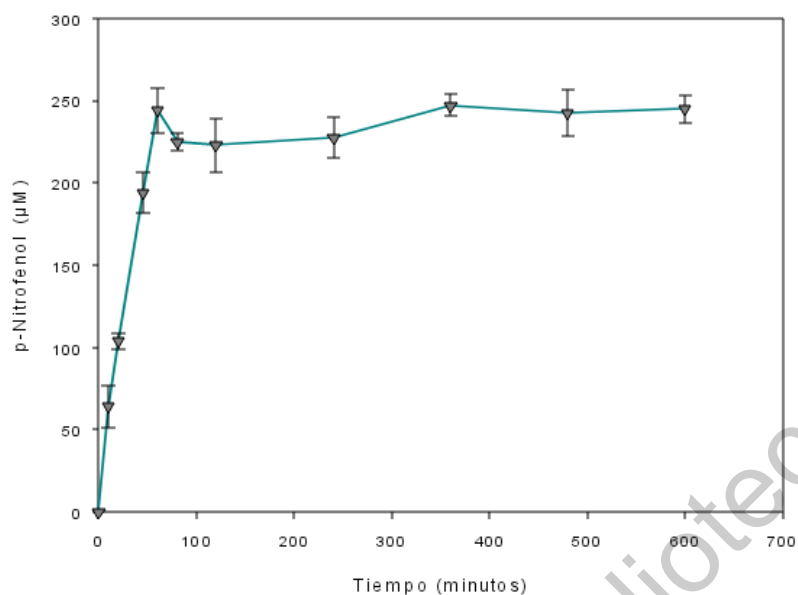
**Figura 21.** Gráfica de interacción de los factores tiempo y pH en la etapa de entrecruzamiento con glutaraldehído, (actividad enzimática expresada en nM min<sup>-1</sup> y tiempo en h).

### 5.5 Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática

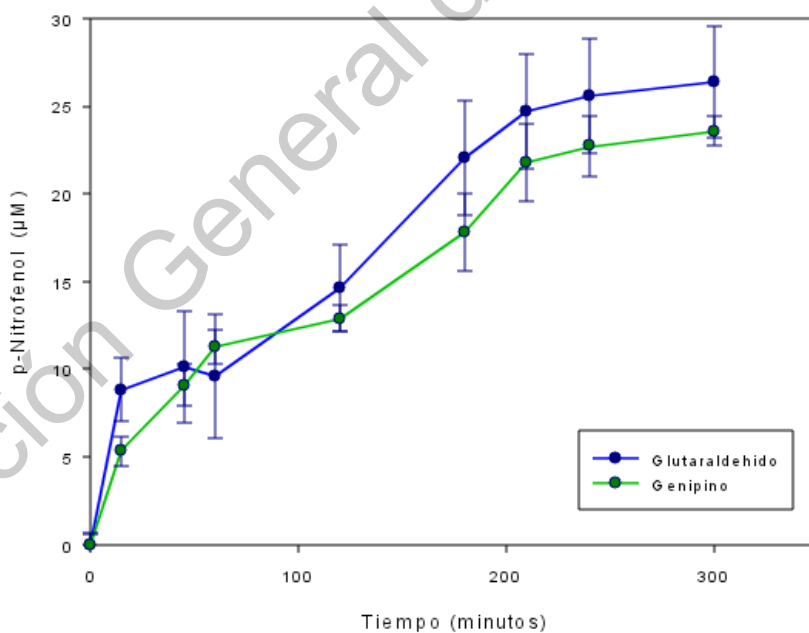
En la gráfica de la Figura 22 se puede observar el comportamiento de la reacción enzimática de la enzima libre, con la liberación de nitrofenol a través del tiempo, se determinó que el pico de máxima actividad es a los 60 min, por lo que se define el tiempo de reacción para los siguientes experimentos en 15 min, ya que se encuentra en la fase donde se observa la velocidad inicial (pendiente en la gráfica).

En la Figura 23 se puede observar la liberación de nitrofenol a través del tiempo en la reacción enzimática catalizada por la enzima inmovilizada, se determinó el pico máximo a los 240 min, aunque esta menos marcado que en la cinética de reacción de la enzima libre, se define el tiempo de reacción en 180 min para los siguientes experimentos, tanto para el entrecruzamiento con glutaraldehído como con genipino.



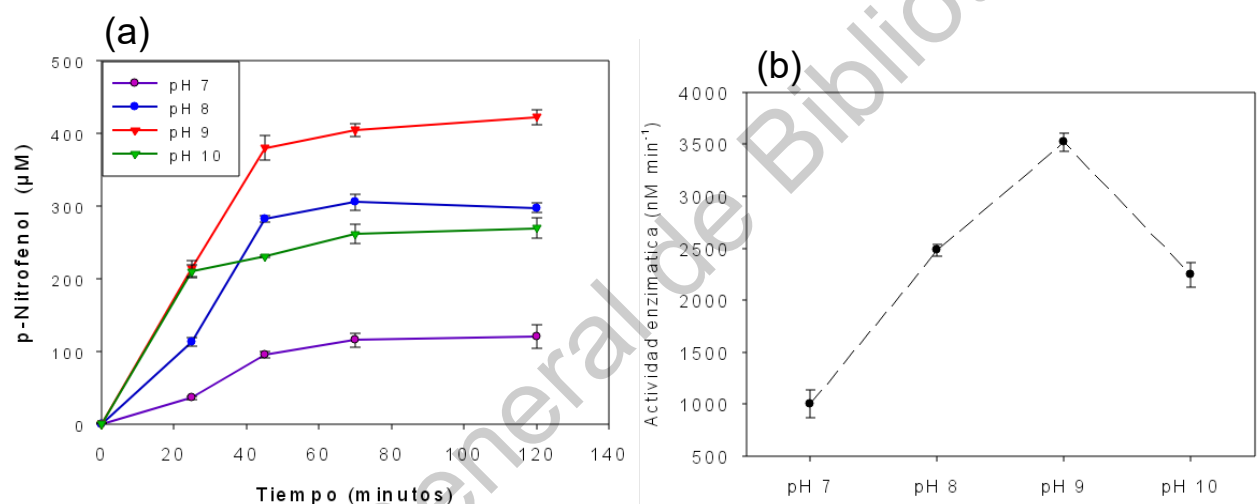


**Figura 22.** Liberación de p- nitrofenol ( $\mu\text{M}$ ) a través del tiempo, utilizando lipasa libre,  $n=3$ .

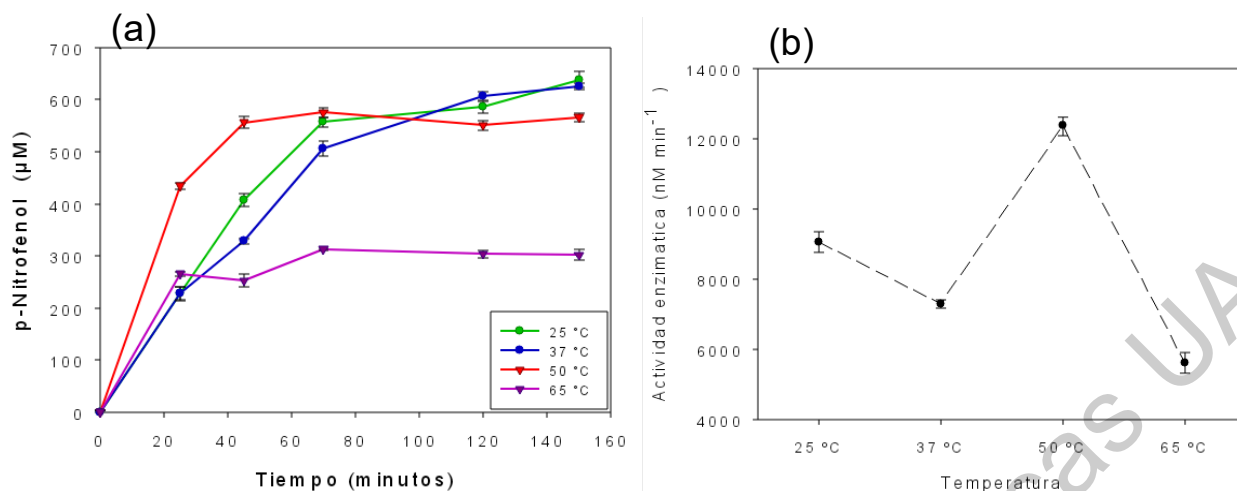


**Figura 23.** Liberación de p- nitrofenol ( $\mu\text{M}$ ) a través del tiempo, utilizando lipasa inmovilizada con ambos agentes entrecruzantes,  $n=3$ .

En la figura 24 se observa el comportamiento de la actividad enzimática de la lipasa libre en los diferentes pH evaluados, la mayor actividad se obtiene en pH 9. El comportamiento observado en la figura 25 corresponde a la evaluación de las diferentes temperaturas de incubación para la enzima libre, obteniendo la mayor actividad en 50 °C. A los 150 min de reacción las temperaturas en el rango de 25-50 °C tienen un perfil de actividad muy similar, siendo diferente la temperatura de 65 °C donde hay una menor liberación de nitrofenol, probablemente la enzima sufrió una desnaturalización por efecto de la temperatura elevada. Ya han sido reportadas temperaturas y pH óptimos similares para la enzima pancreática de cerdo (Balcão *et al.*, 1996; Kılınç *et al.*, 2006).

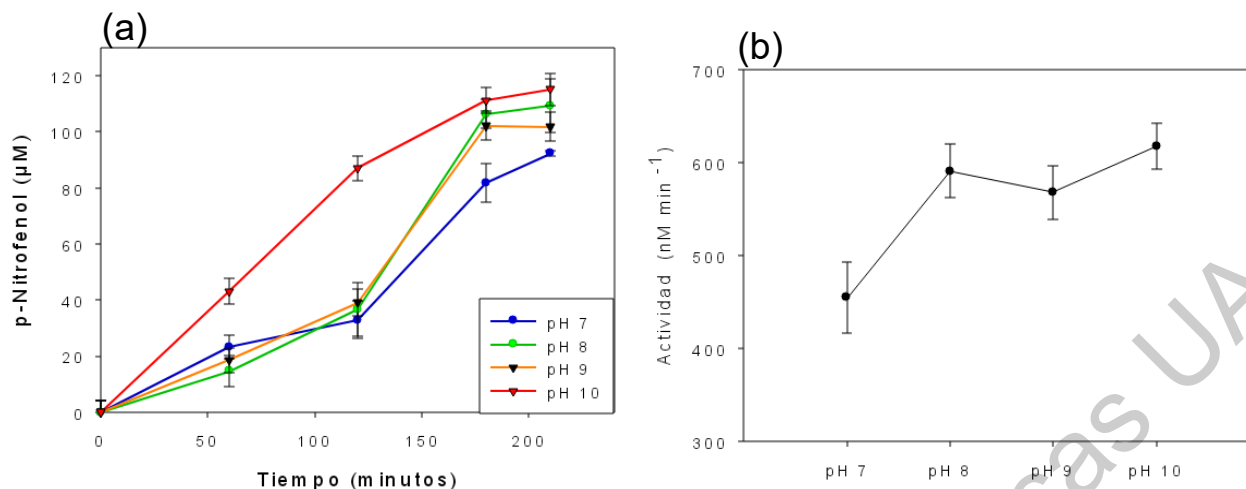


**Figura 24.** Determinación del efecto del pH sobre la actividad enzimática de la enzima libre,  $n=3$ . (a) p- nitrofenol liberado en sustrato preparado a diferentes valores de pH. (b) Actividad enzimática en sustrato preparado a diferentes valores de pH.

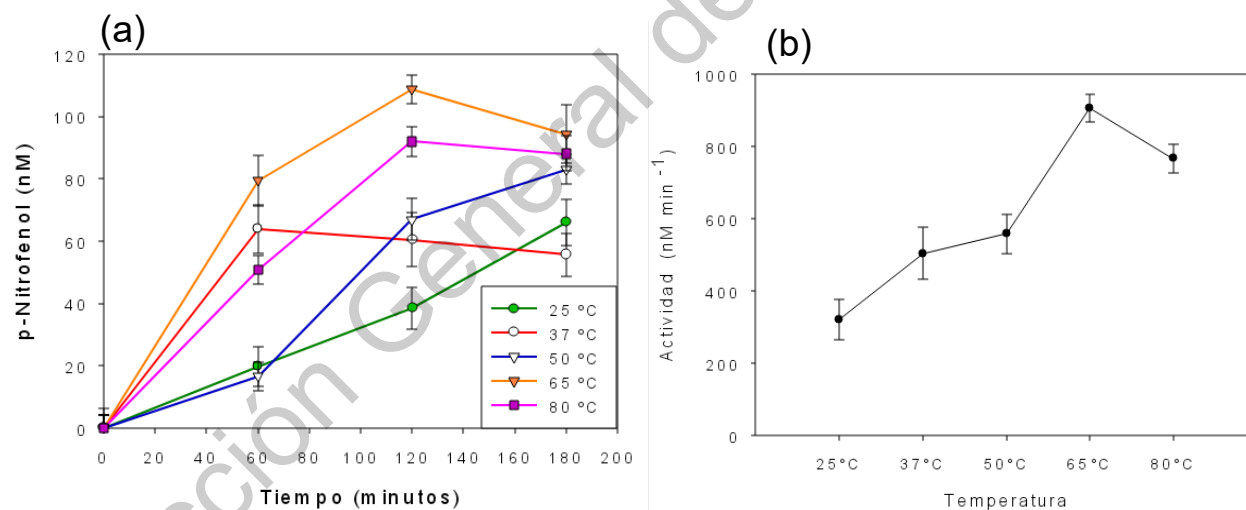


**Figura 25.** Determinación del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la enzima libre, n=3. (a) p- nitrofenol liberado en la reacción incubada diferentes temperaturas. (b) Actividad enzimática en la reacción incubada diferentes temperaturas.

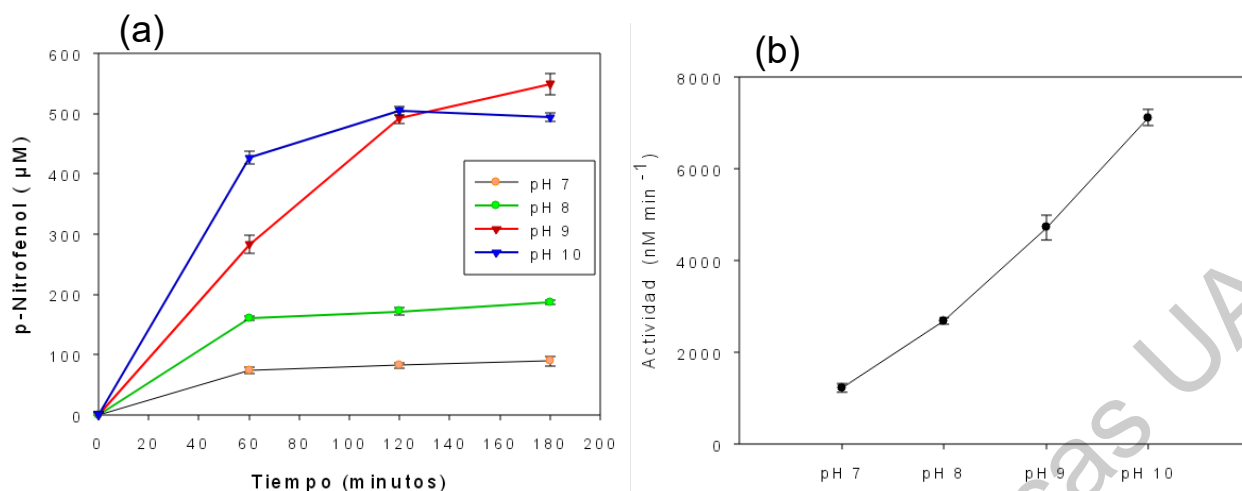
En cuanto a la lipasa inmovilizada, como se observa en las figuras 26 y 27, donde se utilizó glutaraldehído como agente entrecruzante, se obtuvo la mayor actividad enzimática en pH 10 y 65 °C. En las figuras 28 y 29 se obtuvo el mismo comportamiento utilizando genipino como agente entrecruzante. El comportamiento de la reacción catalizada por la enzima inmovilizada, entrecruzada con glutaraldehído, mostró estabilidad en el rango de pH 7-10, ya que la liberación de nitrofenol es muy similar. En la inmovilización con entrecruzamiento con genipino se observa una mayor estabilidad en el rango de temperaturas de incubación evaluado de 25-80 °C; en cuanto al pH, en los valores de 7 y 8 se nota una marcada disminución de la actividad. Otros autores han reportado pH óptimos similares para la enzima pancreática de cerdo después de la inmovilización, aunque en el caso de la temperatura es un poco mayor que lo reportado (Balcão *et al.*, 1996; Kılınç *et al.*, 2006), es posible que esto se deba al uso de un soporte de acero inoxidable y la estabilidad de la capa de quitosano unida por fisisorción, que permita una mayor estabilidad térmica de la lipasa inmovilizada.



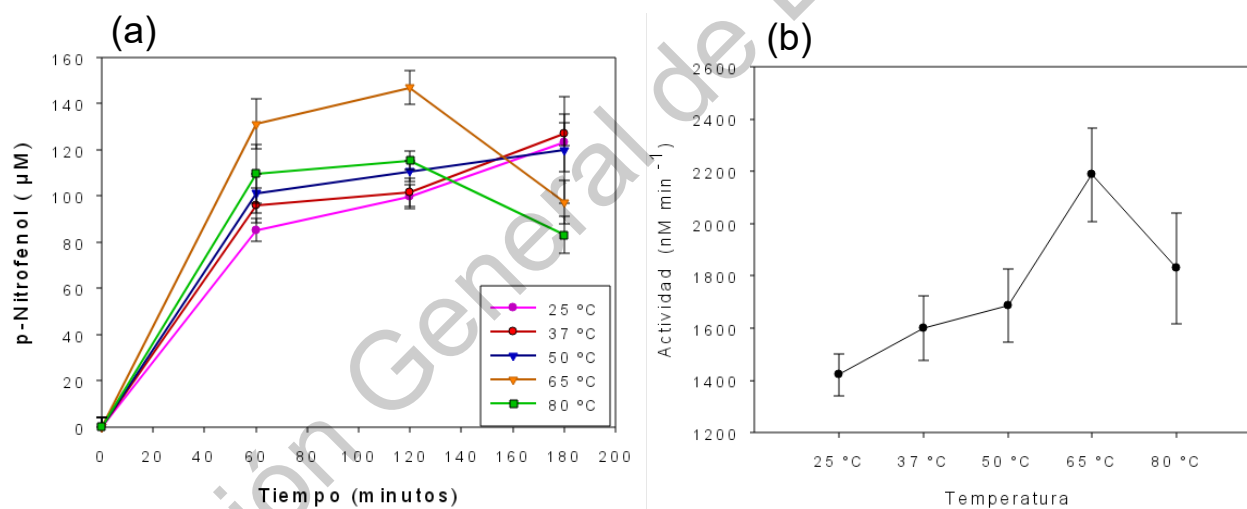
**Figura 26.** Determinación del efecto del pH sobre la actividad enzimática de la enzima inmovilizada, con glutaraldehído como agente entrecruzante,  $n=3$ . (a) p-nitrofenol liberado en sustrato preparado a diferentes valores de pH. (b) Actividad enzimática en sustrato preparado a diferentes valores de pH.



**Figura 27.** Determinación del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la enzima inmovilizada, utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante,  $n=3$ . (a) p-nitrofenol liberado en la reacción incubada a diferentes temperaturas. (b) Actividad enzimática en la reacción incubada a diferentes temperaturas.



**Figura 28.** Determinación del efecto del pH sobre la actividad enzimática de la enzima inmovilizada, con genipino como agente entrecruzante, n=3. (a) p-nitrofenol liberado en sustrato preparado a diferentes valores de pH. (b) Actividad enzimática en sustrato preparado a diferentes valores de pH.



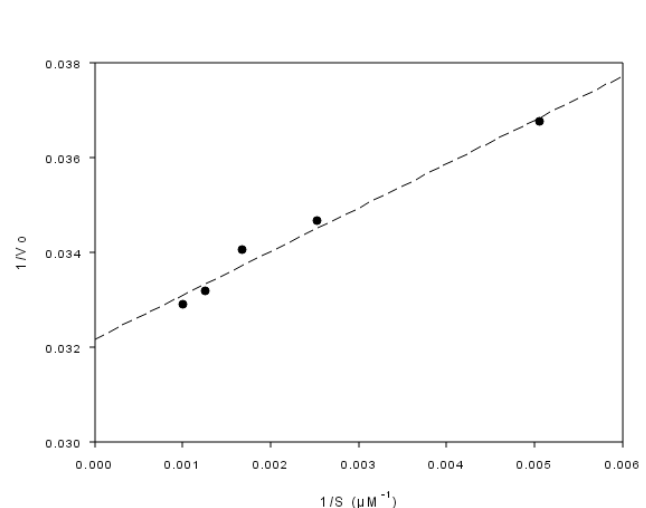
**Figura 29.** Determinación del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la enzima inmovilizada, con genipino como agente entrecruzante, n=3. (a) p-nitrofenol liberado en la reacción incubada a diferentes valores temperatura. (b) Actividad enzimática en la reacción incubada a diferentes valores temperatura.

## 5.6 Parámetros cinéticos $K_M$ y $V_{MAX}$

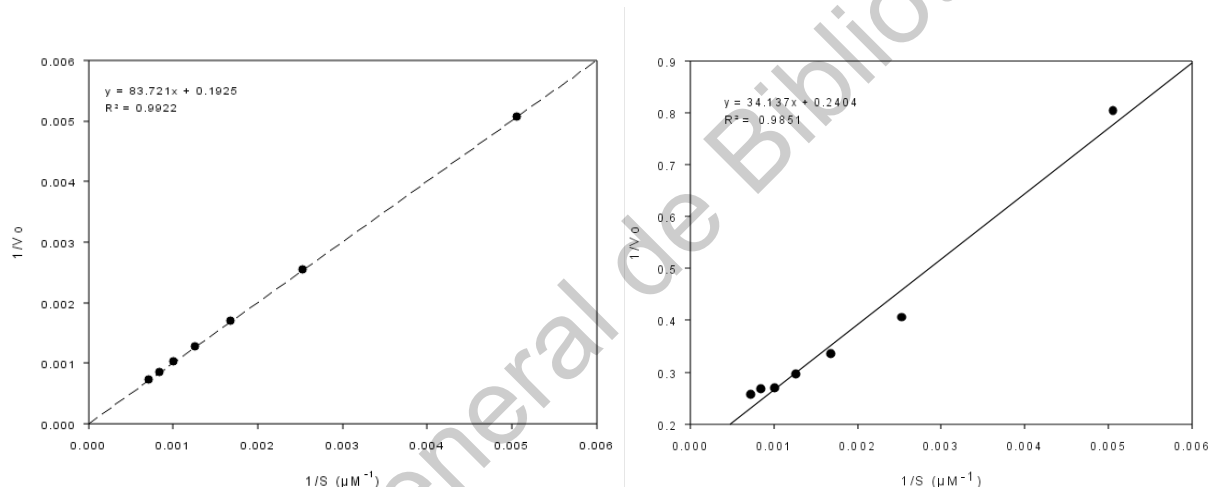
Los parámetros cinéticos  $K_M$  y  $V_{MAX}$  se calcularon a partir de un gráfico de doble recíproco en la Figura 30 para la enzima libre y en la Figura 31 para la enzima inmovilizada. El  $K_M$  de la lipasa libre fue de 28.8  $\mu\text{M}$  y de la inmovilizada fue de 142  $\mu\text{M}$  y 427  $\mu\text{M}$ , con genipino y glutaraldehído, respectivamente. En consecuencia, los valores de  $V_{MAX}$  fueron 31  $\mu\text{M min}^{-1}$  para la lipasa libre y 4.16 y 5.19  $\mu\text{M min}^{-1}$  para el uso de genipino y glutaraldehído, respectivamente. El aumento en  $K_M$  de enzima inmovilizada indicó que la enzima inmovilizada tiene una afinidad aparentemente menor por el sustrato. Este cambio fue causado por la inmovilización, que condujo a la pérdida de la flexibilidad enzimática necesaria para la unión del sustrato (Wang *et al.*, 2006), disminuyendo el  $V_{MAX}$  de la lipasa inmovilizada. Además, es posible que la unión de la enzima al soporte de inmovilización dificulte el acceso del sustrato y la unión con el sitio activo de la enzima. Wang *et al.*, (2015) reporta un comportamiento similar en los valores de  $K_M$  y  $V_{MAX}$  de la enzima libre e inmovilizada. Chiou & Wu,(2004) mencionan un comportamiento similar en el aumento de  $K_M$  en la enzima inmovilizada utilizando perlas de quitosano, y reportan diferencias muy notables entre sus dos sistemas de inmovilización, mostrando que la accesibilidad del sustrato a la enzima tiene gran relevancia (Tabla 10).

**Tabla 10.**  $K_M$  y  $V_{MAX}$  de lipasa libre e inmovilizada.

Parámetro	L. Libre	L. Inmovilizada (genipino)	L. Inmovilizada (glutaraldehído)
$V_{MAX}$ ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )	31.0	4.16	5.19
$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	28.8	142	427.0



**Figura 30.** Gráfica Lineweaver-Burk de la enzima libre, n=3.



**Figura 31.** Gráfica Lineweaver-Burk de la enzima inmovilizada, n=3, (a) con glutaraldehído (b) con genipino, como agentes entrecruzantes.

### 5.7 Elaboración de sabor enzimático lácteo

El sustrato lácteo utilizado para la elaboración del sabor enzimático se analizó para entender su composición, sobre todo el contenido de grasa, ya que es la materia grasa la que se hidroliza con la lipasa inmovilizada y partir de esta se obtienen los ácidos grasos relacionados con el sabor. En la Tabla 11 se observan los resultados de contenido de lípidos, proteína total, cenizas y humedad, destacando el alto contenido de grasa y proteína de la muestra analizada.

**Tabla 11.** Resultados de análisis bromatológico realizado al sustrato lácteo.

Ensayo	Método	Resultado (g/100 g de producto)
Lípidos	NMX-F-100-1984	10.23 +- 0.77
Proteína total	AOAC 954.01	17.40 +- 0.59
Cenizas	AOAC 923.03	3.93 +- 0.05
Humedad	Análisis termo gravimétrico NMX-F-428-1982	51.78 +-0.01

El proceso de elaboración del sabor enzimático incluyó la utilización de enzimas lipolíticas y proteolíticas, en las proporciones encontradas durante la experimentación, el producto final obtenido de esta hidrólisis fue analizado obteniendo un rango de pH de 4-5 y una acidez de 5- 6 %, además del aroma característico del producto. Se tomaron muestras de sustrato lácteo (base), un queso enzimático comercial y 2 muestras de sabores enzimáticos producidos con las enzimas inmovilizadas, esto con el fin de realizar una comparación del perfil de ácidos grasos contenidos en las muestras (Tabla 12). Regado *et al.*, (2007) obtuvieron una producción de ácidos grasos de 4 a 18 carbonos, siendo estos los de relevancia para el perfil de sabor lácteo. En el sabor enzimático producido se puede destacar la presencia, en cantidades superiores al enzimático comercial, el ácido butanoico y el ácido oleico, y una producción elevada de ácido acético, lo que podría cambiar el perfil del sabor final, sin embargo, a nivel sensorial no se detectaba este compuesto. Peng *et al.*, (2014) mencionan que la producción elevada de ciertos ácidos grasos mediante el uso de las enzimas en la grasa de leche, podría producir un sabor distintivo y con nuevas aplicaciones en alimentos, lo que podría decirse también de este sabor enzimático producido con las enzimas inmovilizadas en este trabajo.



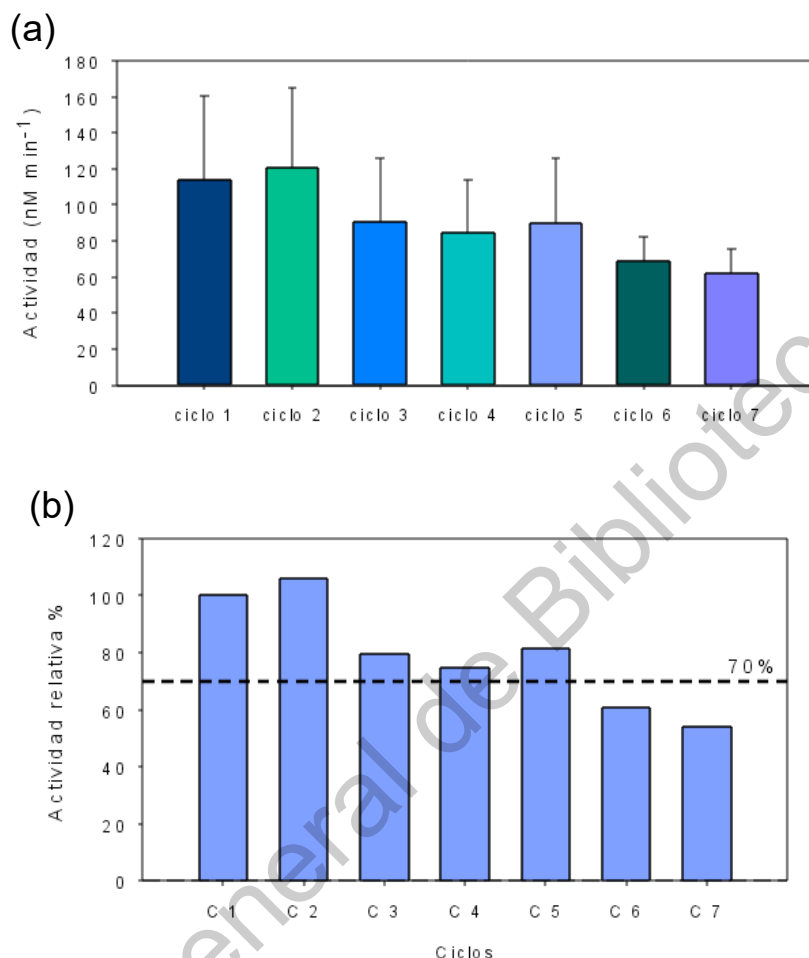
**Tabla 12.** Resultados del análisis de cuantificación de ácidos grasos presentes en las muestras de sabor enzimático y sustrato lácteo mediante cromatografía de gases, expresado en ppm.

Ácido graso	Sustrato lácteo	Queso enzimático comercial	Queso enzimático 1	Queso enzimático 2
Acético	1,160.45	2,072.65	50,106.05	35,312.48
Butanoico	7.41	1,570.83	6,109.09	9,199.38
Hexanoico	6.54	762.02	290.19	348.77
Octanoico	2.68	95.79	153.11	332.81
Decanoico	5.26	710.60	227.00	295.71
Dodecanoico	7.34	478.35	135.70	227.98
Tetradecanoico	16.22	1,178.06	294.57	456.76
Hexadecanoico	71.47	4,232.63	852.18	3,047.54
Palmitoleico	7.17	198.36	38.98	112.60
Octadecanoico	30.98	1,862.67	505.61	1,130.97
Oleico	127.35	3,693.79	1,931.04	5,089.42
Linoleico	0.00	162.67	103.19	277.23
Linolenico	0.00	0.00	0.00	0.00

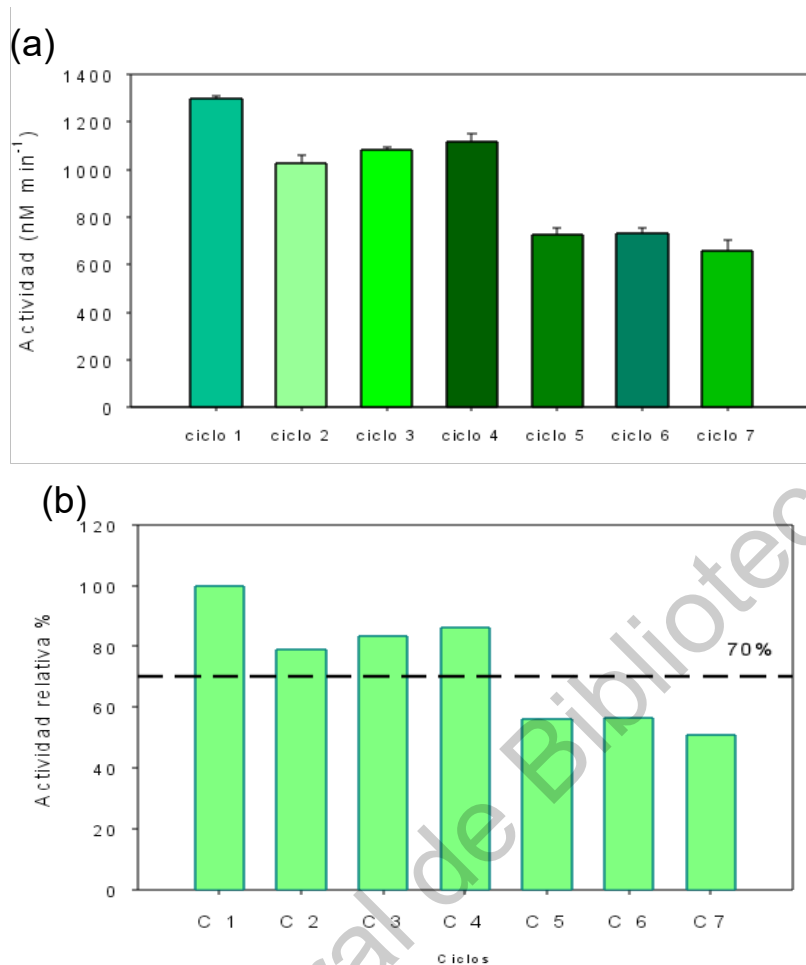
### 5.8 Ciclos de reuso

La estabilidad de la lipasa inmovilizada en los ciclos de reuso se determinó midiendo la actividad para la hidrólisis de p-nitrofenil palmitato. Como se ve en la Figura 32, la lipasa inmovilizada con glutaraldehído como agente entrecruzante retuvo más del 70 % de su actividad inicial después de 5 veces su reutilización y 4 veces utilizando genipino (Figura 33). Tal reutilización es ventajosa para el uso continuo de esta enzima en aplicaciones biotecnológicas (Kılınç *et al.*, 2006). Gao *et al.*, (2010) menciona el mantenimiento del 80.5 % de la actividad inicial de la lipasa después de 6 ciclos en 48 h, utilizando sílica mesoporosa, quitosano y glutaraldehído en su sistema de inmovilización. Chiou & Wu, (2004) mencionan un mantenimiento del 78 % y el 85 % de su actividad inicial después de 10 ciclos hidrolíticos discontinuos, utilizando en la inmovilización de la lipasa perlas de quitosano. Baghban *et al.*, (2017) inmovilizaron lipasa pancreática unida covalentemente a magnetita a base de ditiocarbamato / quitosano, y mencionan

una reutilización de al menos 6 ciclos sin perder actividad significativamente, estos resultados son muy similares a los reportados en este trabajo.



**Figura 32.** Ciclos de reuso de la lipasa inmovilizada con glutaraldehído, n=3. (a) Actividad remanente después de cada ciclo y (b) actividad relativa.

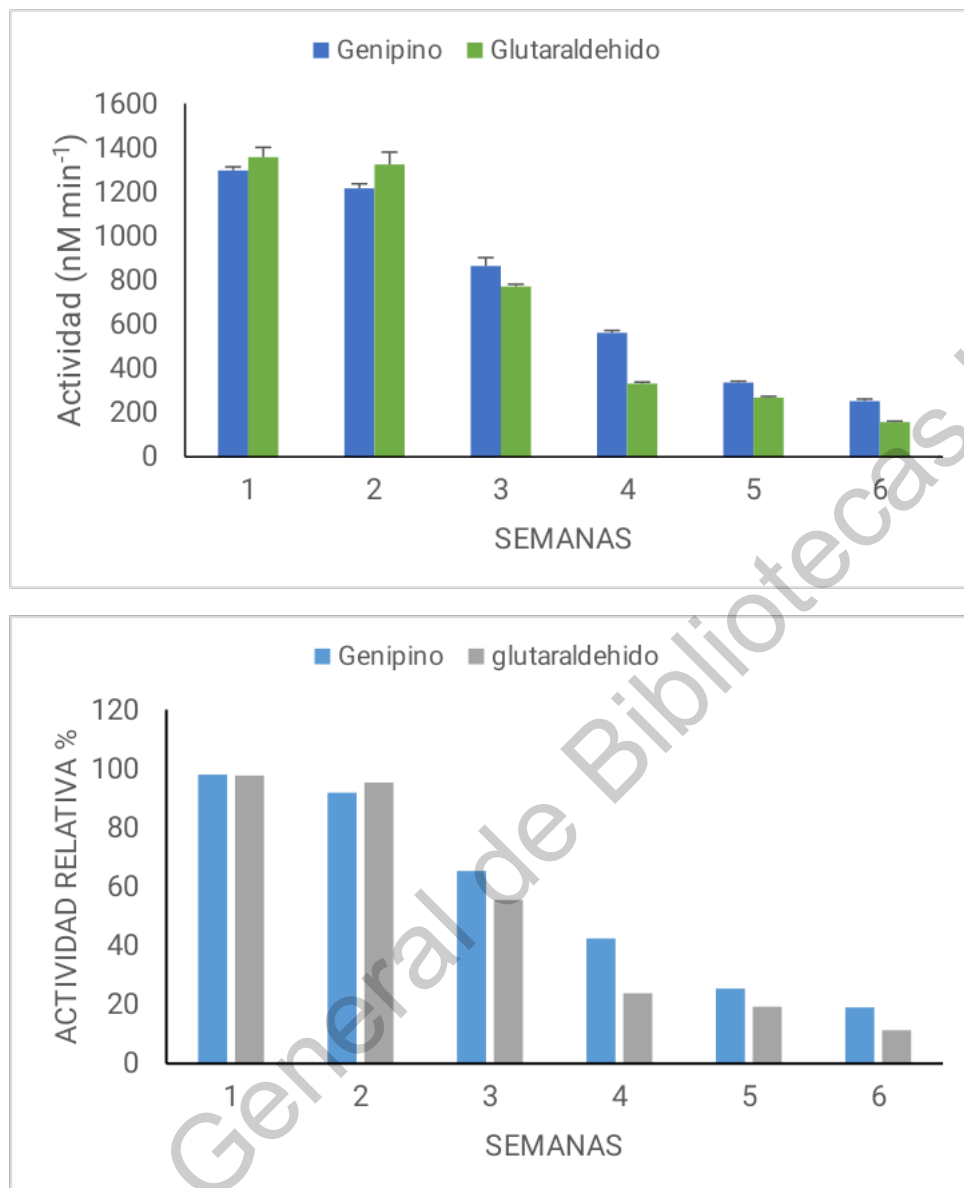


**Figura 33.** Ciclos de reuso de la lipasa inmovilizada con genipino, n=3.

(a) Actividad remanente después de cada ciclo y (b) actividad relativa.

### 5.9 Almacenamiento de la enzima inmovilizada

La lipasa inmovilizada fue almacenada en refrigeración a 4 °C. Como se observa en la Figura 34, la enzima retuvo el 55.5 % y 65.3 % de su actividad inicial, con glutaraldehído y con genipino, respectivamente, después de 3 semanas de almacenamiento. Kılınç *et al.*, (2006) reporta que la lipasa pancreática inmovilizada se almacenó a 4 °C, la enzima inmovilizada en quitina retuvo el 86.5 % y en quitosano el 67 % de sus actividades originales durante aproximadamente 45 días. Varios informes confirman que la estabilidad de almacenamiento de la enzima inmovilizada depende del método de inmovilización aplicado y las condiciones de almacenamiento (Krajewska *et al.*, 2007; Vaillant *et al.*, 2000).

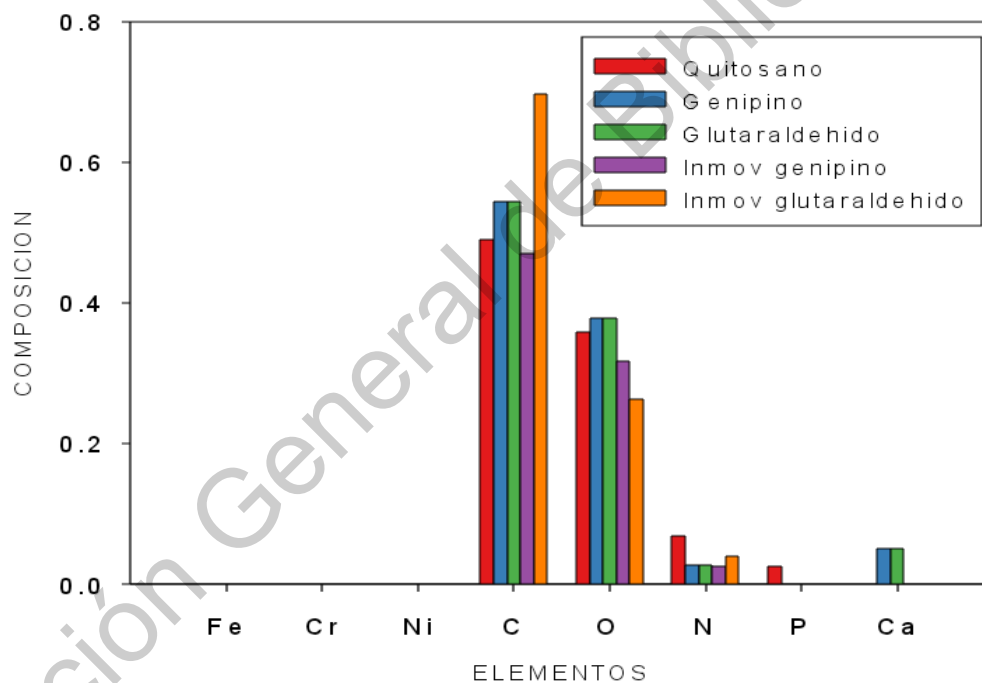
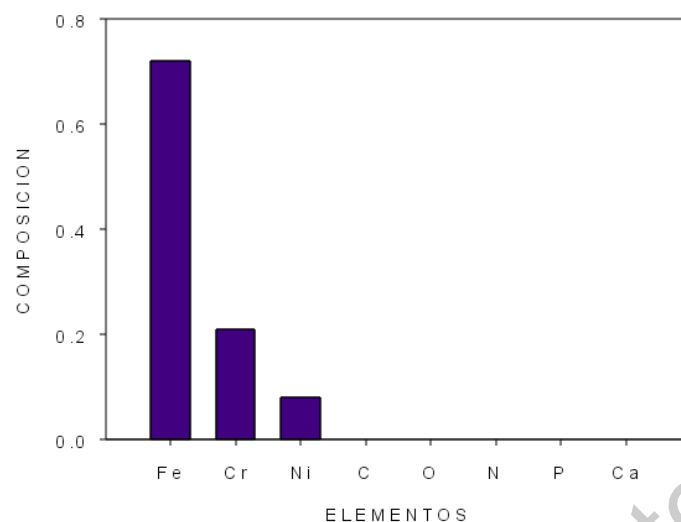


**Figura 34.** Grafica de estabilidad durante el almacenamiento (a) Retención de la actividad enzimática de la lipasa inmovilizada con genipino y con glutaraldehído, durante 6 semanas, (b) actividad relativa, n=2.

## 5.10 Análisis de la composición y estructura superficial de la inmovilización

### 5.10.1 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La evaluación de la composición superficial de cada etapa del proceso de inmovilización que se realizó mediante la técnica de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), dio como resultado la cuantificación de los elementos que se encuentran en la superficie de las muestras. En la Figura 35, el análisis de la placa de acero inoxidable muestra la presencia de hierro, cromo y níquel, siendo el hierro el principal componente, tal como se menciona en la Tabla 2 de composición del acero inoxidable (British Stainless Steel Association, 2018), en los resultados del análisis de las etapas posteriores de la inmovilización: funcionalización con quitosano, después del entrecruzamiento e inmovilización final, se observa la presencia de los elementos orgánicos carbono, oxígeno y nitrógeno, además de fósforo y calcio. Esto podría ser un indicador de la presencia de los compuestos de la inmovilización unidos a la placa de acero inoxidable utilizada como soporte, evidenciando en cada etapa analizada. El fósforo solamente se identificó en la muestra de funcionalización con quitosano y el calcio después del entrecruzamiento con ambos agentes. Orrego *et al.*, (2010) evaluó de manera similar la inmovilización de lipasa en membranas de quitosano y con el uso de glutaraldehído, para evidenciar la presencia de la enzima inmovilizada.

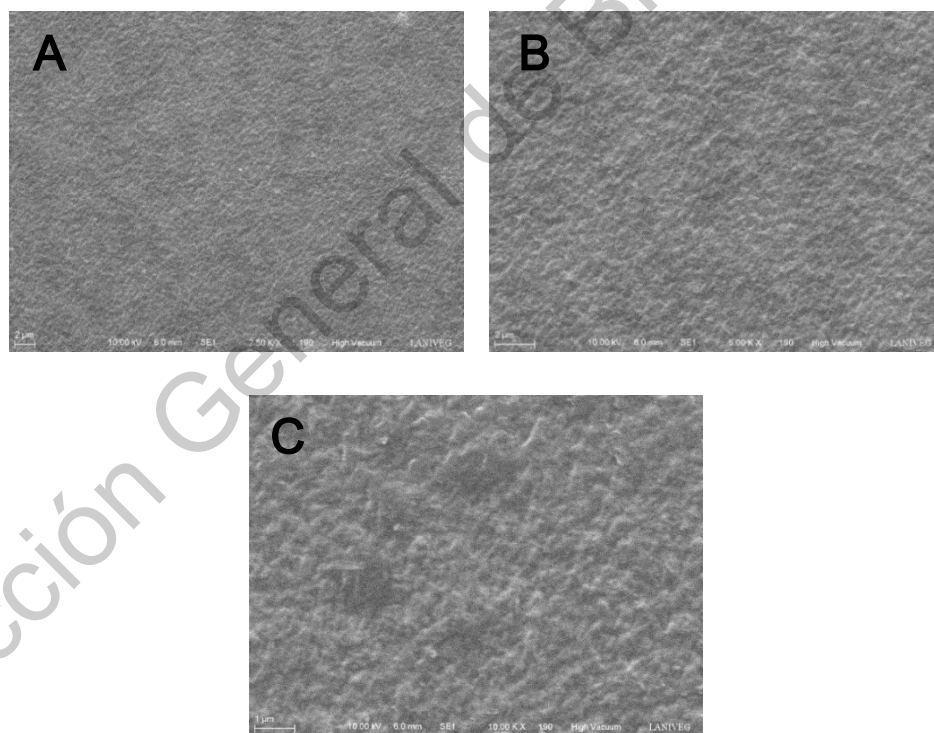


**Figura 35.** Análisis elemental XPS de la placa de acero inoxidable y las etapas de inmovilización, n=3.

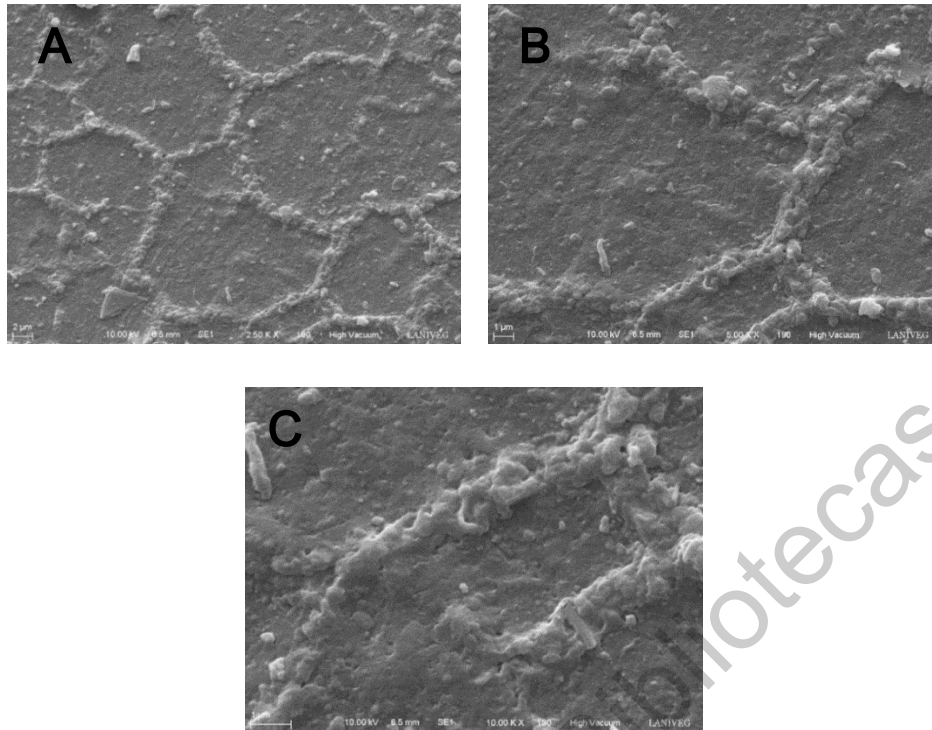
### 5.10.2 Microscopía electrónica de barrido SEM

Las imágenes (Fig. 36-40) obtenidas mediante la observación de la estructura superficial del sistema de inmovilización, que incluyen la

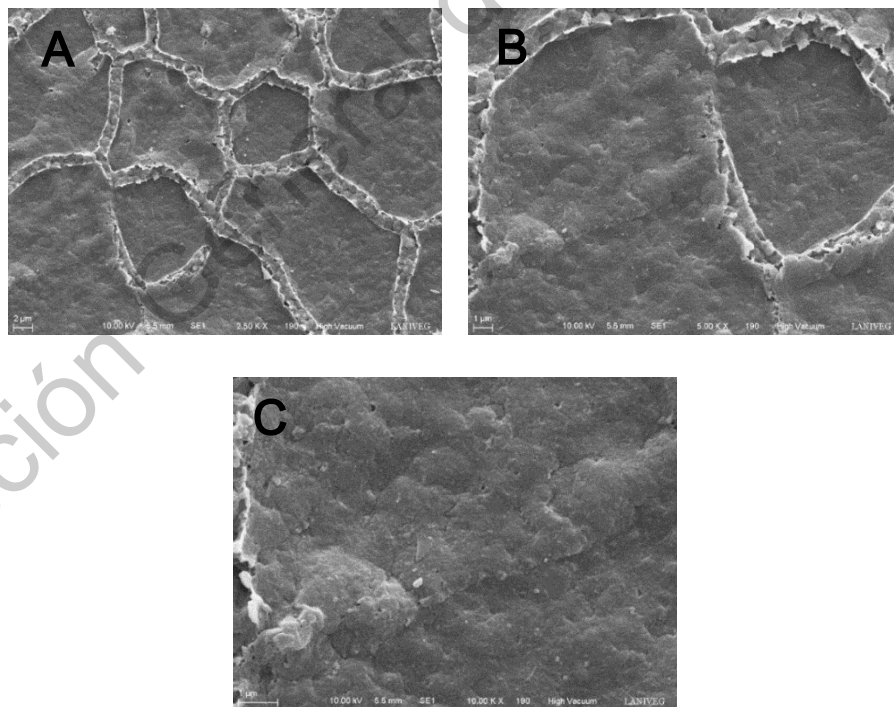
funcionalización con quitosano, el entrecruzamiento con ambos agentes, genipino y glutaraldehído, y la inmovilización final de la lipasa muestran morfologías que corresponden a un compuesto (Baghban *et al.*, 2017). Además, la muestra de la capa de quitosano (Fig. 36) tiene una superficie homogénea y lisa, a diferencia de la etapa de entrecruzamiento (Fig. 37 y 38), donde se puede observar una estructura rugosa que forma una red, la cual, es mucho más densa y homogénea utilizando glutaraldehído que con genipino. En la imagen de la lipasa inmovilizada (fig. 39 y 40) se observa que cubre la superficie totalmente y se dejan de observar las estructuras del entrecruzamiento de la etapa anterior, nuevamente en el caso de uso de glutaraldehído se observa una mayor densidad y homogeneidad comparando con el genipino. Esto podría evidenciar la presencia de mayor cantidad de lipasa inmovilizada con glutaraldehído y su actividad enzimática ligeramente superior.



**Figura 36.** Micrografías obtenidas mediante SEM de la etapa de funcionalización con quitosano, A) 2500 X, B) 5000 X, C) 10000 X.

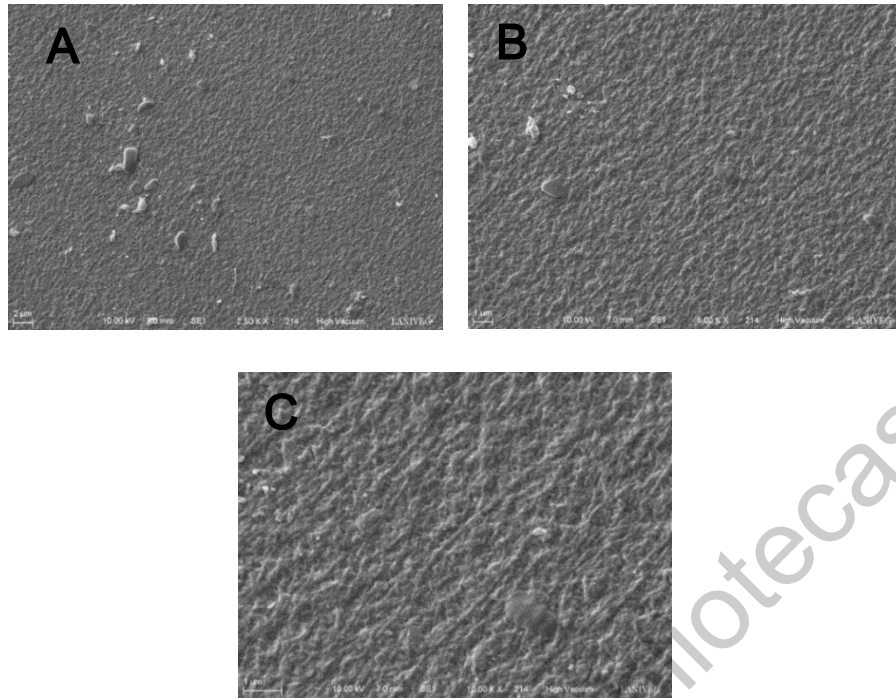


**Figura 37.** Micrografías obtenidas mediante SEM de la etapa de entrecruzamiento con genipino. A) 2500 X, B) 5000 X, C) 10000 X.

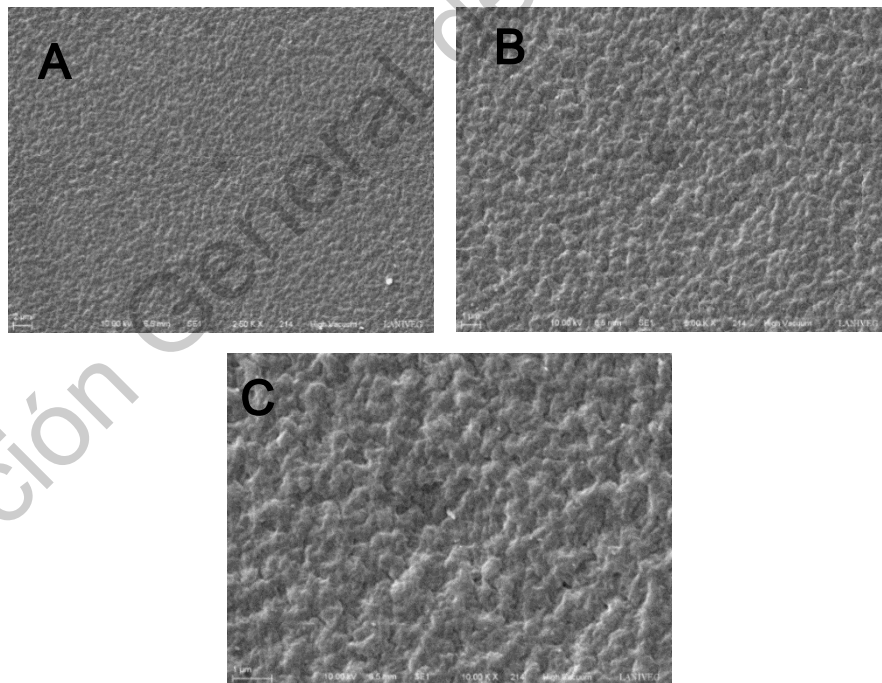


**Figura 38.** Micrografías obtenidas mediante SEM de la etapa de entrecruzamiento con glutaraldehído. A) 2500 X, B) 5000 X, C) 10000 X.





**Figura 39.** Micrografías obtenidas mediante SEM de la inmovilización de lipasa utilizando genipino. A) 2500 X, B) 5000 X, C) 10000 X.



**Figura 40.** Micrografías obtenidas mediante SEM de la inmovilización de lipasa utilizando glutaraldehído. A) 2500 X, B) 5000 X, C) 10000 X.

## 6. CONCLUSIONES

La lipasa se inmovilizó exitosamente sobre las placas de acero inoxidable, obteniéndose  $169.04 \text{ mg m}^{-2}$  con el uso de glutaraldehído y  $131.9 \text{ mg m}^{-2}$  con el uso de genipino, mostrando que el acero puede ser funcionalizado con grupos amina utilizando quitosano y el posterior entrecruzamiento con ambos agentes. El glutaraldehído mostró ser más efectivo para la inmovilización, sin embargo, sigue siendo una alternativa viable el uso de genipino debido a su nula o baja toxicidad y su obtención natural y amigable con el ambiente. La efectividad del uso de glutaraldehído también se vio evidenciada en una actividad enzimática ligeramente superior en la enzima inmovilizada, así como en el análisis de las estructuras superficiales mediante la microscopía electrónica de barrido, donde se observa una mayor densidad y homogeneidad de la superficie del sistema de inmovilización.

Se mostró que el pH y el tiempo de contacto con la solución de glutaraldehído y genipino en la etapa de entrecruzamiento afecta la inmovilización final, mostrándose indirectamente con la medición de la actividad enzimática.

La enzima inmovilizada con ambos agentes entrecruzantes mostró la capacidad de ser reutilizada en varios ciclos, 4 con uso de genipino y 5 con glutaraldehído, sin mostrar un daño visible a la superficie inmovilizada durante su manipulación. Las placas con enzima inmovilizada pueden ser almacenadas durante 14 días en refrigeración sin alterar notablemente su actividad enzimática, permitiendo una aplicación industrial al hacer más eficientes los procesos de producción del sabor enzimático. Además, la enzima inmovilizada presenta estabilidad en un rango de temperaturas y pH más amplios, comparado con la enzima libre, permitiendo mayor flexibilidad de la operación o incluso evaluar la posibilidad de llevar a cabo el proceso a temperaturas superiores para determinar si el proceso de hidrólisis se logra en menor tiempo. Se determinó el efecto del pH y temperatura sobre la actividad enzimática, obteniendo la mayor actividad enzimática para la enzima libre en pH 9 y  $50^{\circ}\text{C}$  y para la enzima inmovilizada,

utilizando ambos agentes entrecruzantes, en pH 10 y 65 °C.

La lipasa comercial evaluada es una mezcla de varias enzimas, incluyendo lipasa, que representa el 30 % del contenido, además de proteasas y amilasas, por esto, no es posible decir con exactitud que todo lo que se inmovilizó era solamente lipasa, sin embargo, se evidenció la presencia de esta al evaluar la actividad hidrolítica con el sustrato sintético y con el sustrato lácteo. Se podría evaluar la opción de purificación de la enzima, aunque esto podría significar un incremento en el costo.

Con la lipasa inmovilizada se obtuvo un sabor enzimático lácteo donde se identificaron ácidos grasos relacionados al sabor, destacando el ácido butírico en una proporción 6 veces mayor comparado con un sabor enzimático comercial. El sabor enzimático obtenido mediante la modificación del sustrato lácteo con la lipasa inmovilizada tiene el potencial de ser utilizado como ingrediente en la industria de alimentos, por lo que se puede aprovechar su perfil único de ácidos grasos libres (tanto cualitativos como cuantitativos), para impartir notas de sabor específicas al producto final.

Desde el punto de vista de una aplicación industrial, la inmovilización de la lipasa en las placas de acero inoxidable es una opción atractiva debido a la estabilidad, capacidad de reuso, fácil manipulación y su capacidad de hidrolizar la grasa láctea y producir un perfil de sabor lácteo. En los procesos industriales de fabricación de sabores enzimáticos, uno de los materiales utilizados de mayor costo son las enzimas, por lo que si se pueden reutilizar se podría estar disminuyendo ese costo hasta un 400 %.

## 7. REFERENCIAS

- Ansari, S. A., & Husain, Q. (2012). Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology Advances*, 30(3), 512–523. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.005>
- Ausubel, F. M. (2002). *Short protocols in molecular biology 5th edition*. (R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, & K. Struhl, Eds.) (5th ed.). John Wiley & Sons Inc.
- Baghban, A., Heidarizadeh, M., Doustkhah, E., Rostamnia, S., & Rezaei, P. F. (2017). Covalently bonded pancreatic lipase onto the dithiocarbamate/chitosan-based magnetite: Stepwise fabrication of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@CS/NHCS-Lip as a novel and promising nanobiocatalyst. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 1194–1200. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.159>
- Balcão, V. M., Paiva, A. L., & Xavier Malcata, F. (1996). Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(6), 392–416. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00125-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00125-5)
- Barbes, L., Salmain, M., & Stanciu, G. (2008). A technique to immobilize trypsin on stainless steel in order to prevent biofilms formation. *Scientific Study and Research, Pubs.Ub.Ro*, IX(June), 25–29. Retrieved from <http://www.pubs.ub.ro/dwnl.php?id=CSCC6200809V04S01A0004>
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2014). Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Adv.*, 4(4), 1583–1600. <https://doi.org/10.1039/C3RA45991H>
- Barbosa, O., Torres, R., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2013). Heterofunctional supports in enzyme

immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. *Biomacromolecules*, 14(8), 2433–2462. <https://doi.org/10.1021/bm400762h>

Barbosa, O., Torres, R., Ortiz, C., & Fernandez-Lafuente, R. (2012). Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. *Process Biochemistry*, 47(8), 1220–1227. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.04.019>

Benvenuto, P., Neves, M. A. D., Blaszykowski, C., Romaschin, A., Chung, T., Kim, S. R., & Thompson, M. (2015). Adlayer-mediated antibody immobilization to stainless steel for potential application to endothelial progenitor cell capture. *Langmuir*, 31(19), 5423–5431. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00812>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

British Stainless Steel Association. (2018). Retrieved April 29, 2019, from <https://www.bssa.org.uk>

Caro, A., Humblot, V., Méthivier, C., Minier, M., Barbes, L., Li, J., ... Pradier, C. M. (2010). Bioengineering of stainless steel surface by covalent immobilization of enzymes. Physical characterization and interfacial enzymatic activity. *Journal of Colloid and Interface Science*, 349(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.12.001>

Castillo, E., Pezzotti, F., Navarro, A., & López-Munguía, A. (2003). Lipase-catalyzed synthesis of xylitol monoesters: solvent engineering approach. *Journal of Biotechnology*, 102(3), 251–259. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00050-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00050-6)

- Chiou, S. H., Hung, T. C., Giridhar, R., & Wu, W. T. (2007). Immobilization of lipase to chitosan beads using a natural cross-linker. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 37(3), 265–275. <https://doi.org/10.1080/10826060701386752>
- Chiou, S., & Wu, W. (2004). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups, 25, 197–204. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00482-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00482-4)
- Christensen, M. W., Andersen, L., Husum, T. L., & Kirk, O. (2003). Industrial lipase immobilization. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(6), 318–321. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200390062>
- Flores, M. V., Sewalt, J. J. W., Janssen, A. E. M., & van der Padt, A. (2000). The nature of fatty acid modifies the equilibrium position in the esterification catalyzed by lipase. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(3), 364–371. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000205\)67:3<364::AID-BIT13>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000205)67:3<364::AID-BIT13>3.0.CO;2-R)
- Gao, S., Wang, Y., Diao, X., Luo, G., & Dai, Y. (2010). Bioresource Technology Effect of pore diameter and cross-linking method on the immobilization efficiency of *Candida rugosa* lipase in SBA-15. *Bioresource Technology*, 101(11), 3830–3837. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.023>
- Gargouri, M., Drouet, P., & Legoy, M.-D. (2002). Synthesis of a novel macrolactone by lipase-catalyzed intra-esterification of hydroxy-fatty acid in organic media. *Journal of Biotechnology*, 92(3), 259–266. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00374-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00374-1)
- Gupta, N., Rathi, P., & Gupta, R. (2002). Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Analytical Biochemistry*, 311(1), 98–99. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00379-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00379-2)

- He, X., Chen, B., & Tan, T. (2002). Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl esters of fatty acids by immobilized lipase from *Candida* sp. 99–125. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 18(4–6), 333–339. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00114-5](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00114-5)
- Hiol, A., Jonzo, M. D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L., & Comeau, L. C. (2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(5–6), 421–430. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00173-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00173-8)
- Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D. (2004). Lipases and their industrial applications: An overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118(1–3), 155–170. <https://doi.org/10.1385/ABAB:118:1-3:155>
- Hung, T.-C., Giridhar, R., Chiou, S.-H., & Wu, W.-T. (2003). Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26(1–2), 69–78. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00167-X](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00167-X)
- IUPAC. (1997). *Pure Appl Chem*, 69, 1613–1632.
- Johansson, I. P. S. (2007). *Handbook for Cleaning/Decontamination of Surfaces* (first edit). Netherlands: Elsevier B.V. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-044451664-0/50028-0>
- Kanwar, S. S., Srivastava, M., Chimni, S. S., Ghazi, I. A., Kaushal, R. K., & Joshi, G. K. (2004). Properties of an immobilized lipase of *Bacillus coagulans* BTS-1. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 51(1–2), 57–73. <https://doi.org/10.1556/AMicr.51.2004.1-2.4>
- Kılınç, A., Teke, M., Önal, S., & Telefoncu, A. (2006). Immobilization of Pancreatic Lipase on Chitin and Chitosan. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*,

36(2), 153–163. <https://doi.org/10.1080/10826060500533976>

Klein, M. P., Hackenhaar, C. R., Lorenzoni, A. S. G., Rodrigues, R. C., Costa, T. M. H., Ninow, J. L., & Hertz, P. F. (2016). Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and  $\beta$ -d-galactosidase immobilization. *Carbohydrate Polymers*, 137, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.069>

Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2–3), 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.013>

Krajewska, B., Leszko, M., & Zaborska, W. (2007). Urease immobilized on chitosan membrane: Preparation and properties. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 48(3), 337–350. <https://doi.org/10.1002/jctb.280480309>

Li, X., Wang, X., Ye, G., Xia, W., & Wang, X. (2010). Polystyrene-based diazonium salt as adhesive: A new approach for enzyme immobilization on polymeric supports. *Polymer*, 51(4), 860–867. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.12.036>

Marilley, L. (2003). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*, 90(2), 139–159. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00304-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00304-0)

Mendes, A. A., Oliveira, P. C., & Castro, H. F. De. (2012). Journal of molecular catalysis B: Enzymatic properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 78, 119–134. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.03.004>

Mi, F. L., Sung, H. W., & Shyu, S. S. (2000). Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker.



*Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 38, 2804–2814.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1099-0518\(20000801\)38:15<2804::AID-POLA210>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1099-0518(20000801)38:15<2804::AID-POLA210>3.0.CO;2-Y)

Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., & Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37(5), 790–802.  
<https://doi.org/10.2144/04375RV01>

Nelson, J. H. (1972). Enzymatically produced flavors for fatty systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 49, 559–562.

Nicolás, P., Lassalle, V. L., & Ferreira, M. L. (2017). Quantification of immobilized *Candida antarctica* lipase B (CALB) using ICP-AES combined with Bradford method. *Enzyme and Microbial Technology*, 97, 97–103.  
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.11.009>

Noel, M., & Combes, D. (2003). Effects of temperature and pressure on *Rhizomucor miehei* lipase stability. *Journal of Biotechnology*, 102(1), 23–32.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00359-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00359-0)

Orrego, C. E., Salgado, N., Valencia, J. S., Giraldo, G. I., Giraldo, O. H., & Cardona, C. A. (2010). Novel chitosan membranes as support for lipases immobilization: Characterization aspects. *Carbohydrate Polymers*, 79(1), 9–16.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.06.015>

Pahujani, S., Kanwar, S. S., Chauhan, G., & Gupta, R. (2008). Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability. *Bioresource Technology*, 99(7), 2566–2570.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.042>

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., & Soccol, V. T. (1999). Realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology Applied*

*Biochemistry*, 29, 131–199. <https://doi.org/10.1111/j.1470-8744.1999tb00541>

Peng, Q., Wang, X., Shang, M., Huang, J., Guan, G., Li, Y., & Shi, B. (2014). Isolation of a novel alkaline-stable lipase from a metagenomic library and its specific application for milkfat flavor production. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-1>

R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.r-project.org/>

Regado, M. A., Cristóvão, B. M., Moutinho, C. G., Balcão, V. M., Aires-Barros, R., Ferreira, J. P. M., & Malcata, F. X. (2007). Flavour development via lipolysis of milkfats: Changes in free fatty acid pool. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(8), 961–968. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01317.x>

Shahani, K. M., Harper, W. J., Jensen, R. G., Parry, R. M., & Zittle, C. A. (1973). Enzymes in bovine milk: A review. *Journal of Dairy Science*, 56(5), 531–543. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(73\)85216-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(73)85216-6)

Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223–6235. <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>

Spinelli, D., Coppi, S., Basosi, R., & Pogni, R. (2014). Biosynthesis of ethyl butyrate with immobilized *Candida rugosa* lipase onto modified Eupergit® C, 1–12. <https://doi.org/10.2478/boca-2014-0001>

Stehr, F., Kretschmar, M., Kröger, C., Hube, B., & Schäfer, W. (2003). Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22(5–6), 347–355. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00049-3](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00049-3)

- Tischer, W., & Wedekind, F. (1999). Biocatalysis - From Discovery to Application. In *Topics in Current Chemistry* (Vol. 200, pp. 95–126). <https://doi.org/10.1007/3-540-68116-7>
- Torres-Salas, P., Del Monte-Martinez, A., Cutiño-Avila, B., Rodriguez-Colinas, B., Alcalde, M., Ballesteros, A. O., & Plou, F. J. (2011). Immobilized biocatalysts: Novel approaches and tools for binding enzymes to supports. *Advanced Materials*, 23(44), 5275–5282. <https://doi.org/10.1002/adma.201101821>
- Vaillant, F., Millan, A., Millan, P., Dornier, M., Decloux, M., & Reynes, M. (2000). Co-immobilized pectinlyase and endocellulase on chitin and Nylon supports. *Process Biochemistry*, 35(9), 989–996. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00131-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00131-X)
- Wang, X., Jiang, X., Li, Y., Zeng, S., & Zhang, Y. (2015). Preparation Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@chitosan magnetic particles for covalent immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.020>
- Wang, Z.-G., Wang, J.-Q., & Xu, Z.-K. (2006). Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on electrospun polysulfone nanofibrous membranes by adsorption. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 42(1–2), 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.06.004>
- Wang, Z. G., Wan, L. S., Liu, Z. M., Huang, X. J., & Xu, Z. K. (2009). Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56(4), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.05.005>
- Winkler, U. K., & Stuckmann, M. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 138(3), 663–670. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000300030>

Wu, J.-Y., & Liu, S.-W. (2000). Influence of alcohol concentration on lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic naproxen in isooctane: under controlled water activity☆. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2–4), 124–130. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00154-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00154-4)

Xavier Malcata, F., Reyes, H. R., Garcia, H. S., Hill, C. G., & Amundson, C. H. (1990). Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils-A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67(12), 890–910. <https://doi.org/10.1007/BF02541845>

Zucca, P., & Sanjust, E. (2014). Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules190914139>

## 8. APENDICES

**Apéndice 1.** Tablas de composición química de acero inoxidable, estándar europeo 10088-2 (British Stainless Steel Association, 2018).

Designación			% Composición química en masa máxima a menos que se indique									
Nombre del acero	Número del acero	AISI	C	Si	Mn	P	S	N	Cr	Mo	Ni	Otros
Aceros inoxidables ferríticos - grados estándar.												
X2CrNi12	1.4003		0.03	1	1.5	0.04	0.015	0.03	10.5/12.5	-	0.30/1.00	-
X2CrTi12	1.4512	409	0.03	1	1	0.04	0.015	-	10.5/12.5	-	-	Ti: 6(C+N)/0.65
X6CrNiTi12	1.4516		0.08	0.7	1.5	0.04	0.015	-	10.5/12.5	-	0.50/1.50	Ti: 0.05/0.35
X6Cr13	1.4	410S	0.08	1	1	0.04	0.015	-	12.0/14.0	-	-	-
X6CrAl13	1.4002	405	0.08	1	1	0.04	0.015	-	12.0/14.0	-	-	Al: 0.10/0.30
X6Cr17	1.4016	430	0.08	1	1	0.04	0.015	-	16.0/18.0	-	-	-
X3CrTi17	1.451	439	0.05	1	1	0.04	0.015	-	16.0/18.0	-	-	Ti: 4(C+N)+0.15/0.80
X3CrNb17	1.4511	430Nb	0.05	1	1	0.04	0.015	-	16.0/18.0	-	-	Nb: 12C/1.00
X6CrMo1	1.411	434	0.08	1	1	0.04	0.015	-	16.0/	0.90	-	-

7-1	3								18.0	/1.4 0		
X2CrMoTi18-2	1.4521	444	0.025	1	1	0.04	0.015	0.03	17.0/ 20.0	1.80 /2.5 0	-	Ti: 4(C+N)+0.15 /0.80
Aceros inoxidables ferríticos - grados especiales.												
X2CrMnTi12	1.46		0.03	1	1.00 /2.5 0	0.04	0.015	0.025	11.0/ 13.0	0.5	0.30/ 1.00	Ti: 6C/0.35
X2CrSiTi15	1.463		0.03	0.2 0/1. 50	1	0.05	0.05	-	13.0/ 16.0		0.5	Ti: [4(C+N)+0.1 5]/0.80
X2CrTi17	1.452		0.025	0.5	0.5	0.04	0.015	0.015	16.0/ 18.0		-	Ti: 0.30/0.6
X1CrNb15	1.4595		0.02	1	1	0.025	0.015	0.02	14.0/ 16.0	-	0.20/ 0.60	-
X2CrMoTi17-1	1.4513		0.025	1	1	0.04	0.015	0.015	16.0/ 18.0		-	Ti: 0.30/0.60
X6CrNi17-1	1.4017		0.08	1	1	0.04	0.015	-	16.0/ 18.0	0.5	1.20/ 1.60	-
X5CrNiMoTi15-2	1.4589		0.08	1	1	0.04	0.015	-	13.5/ 15.5		1.00/ 2.50	Ti: 0.30/0.50
X6CrMoNb17-1	1.4526	436	0.08	1	1	0.04	0.015	0.04	16.0/ 18.0		-	Nb:7(C+N)+ 0.10/1.00
X2CrNbZr17	1.459		0.03	1	1	0.04	0.015	-	16.0/ 17.5	-	-	Zr: ≥7(C+N) +0.15 Nb: 0.35/0.55
X2CrTiNb18	1.4509	441	0.03	1	1	0.04	0.015	-	17.5/ 18.5	-	-	Ti: 0.10/0.60 Nb:

												3C+0.30/1.00
X2CrNbTi20	1.4607		0.03	0.20/1.50	1	0.05	0.05	-	17.5/18.5	0.5	0.05	Nb: 3C+0.30/1.00 Al: 0.20/1.50 Cu: 0.50
X2CrTi21	1.4611		0.03	1	1	0.04	0.015	0.03	18.5/20.5	-	-	Ti: 4 × (C+N) + 0.15/0.80 Nb: 1.00
X2CrTi24	1.4613		0.03	1	1	0.05	0.05	-	19.0/22.0	0.5	0.05	Ti: 4 × (C+N) + 0.20/1.00 Cu: 0.50 Al: 0.05
X2CrMoTi29-4	1.4592		0.03	1	1	0.04	0.015	-	20.0/21.5	-	-	-
X2CrNbCu21	1.4621		0.03	1	1	0.05	0.05	-	22.0/25.0	0.5	0.05	Ti: 4 × (C+N) + 0.20/1.00 Cu: 0.50 Al: 0.05
X2CrTiNbVCu22	1.4622		0.025	1	1	0.03	0.01	0.045	28.0/30.0	3.50/4.50	-	Ti: 4(C+N)+0.15/0.80
Aceros inoxidables martensíticos - grados estándar												
X12Cr13	1.4006	410	0.08/0.15	1	1.5	0.04	0.015	-	11.5/13.5	-	0.75	-
X15Cr13	1.4024	420	0.12/0.17	1	1	0.04	0.015	-	12.0/14.0	-	-	-
X20Cr13	1.4021	420	0.16/0.25	1	1.5	0.04	0.015	-	12.0/14.0	-	-	-
X30Cr13	1.4028	420	0.26/0.35	1	1.5	0.04	0.015	-	12.0/14.0	-	-	-

X39Cr13	1.403 1	420	0.36/ 0.42	1	1	0.04	0.015	-	12.5/ 14.5	-	-	-
X46Cr13	1.403 4	420	0.43/ 0.50	1	1	0.04	0.015	-	12.5/ 14.5	-	-	-
X38CrMo 14	1.441 9		0.36/ 0.42	1	1	0.04	0.015	-	13.0/ 14.5	0.60 /1.0 0	-	-
X55CrMo 14	1.411		0.48/ 0.60	1	1	0.04	0.015	-	13.0/ 15.0	0.50 /0.8 0	-	V: 0.15
X50CrMo V15	1.411 6		0.45/ 0.55	1	1	0.04	0.015	-	14.0/ 15.0	0.50 /0.8 0	-	V: 0.10/0.20
X39CrMo 17-1	1.412 2		0.33/ 0.45	1	1.5	0.04	0.015	-	15.5/ 17.5	0.80 /1.3 0	1	-
X3CrNiM o13-4	1.431 3		0.05	0.7	1.5	0.04	0.015	≥0. 020	12.0/ 14.0	0.30 /0.7 0	3.5/4. 5	-
X4CrNiM o16-5-1	1.441 8		0.06	0.7	1.5	0.04	0.015	≥0. 020	15.0/ 17.0	0.80 /1.5 0	4.0/6. 0	-
Aceros inoxidables austeníticos - grados estándar												
X10CrNi 18-8	1.431	301	0.05/ 0.15	2	2	0.0 45	0.015	0.11	16.0/ 19.0	0.8	6.0/9. 5	-
X2CrNiN 18-7	1.431 8	301L N	0.03	1	2	0.0 45	0.015	0.10 /0.2 0	16.5/ 18.5	-	6.0/8. 0	-
X2CrNi1 8-9	1.430 7	304L	0.03	1	2	0.0 45	0.015	0.11	17.5/ 19.5	-	8.0/1 0.5	-



X2CrNi1 9-11	1.430 6	304L	0.03	1	2	0.0 45	0.015	0.11	18.0/ 20.0	-	10.0/ 12.0	-
X2CrNiN 18-10	1.431 1	304L N	0.03	1	2	0.0 45	0.015	0.12 /0.2 2	17.5/ 19.5	-	8.5/1 1.5	-
X5CrNi1 8-10	1.430 1	304	0.07	1	2	0.0 45	0.015	0.11	17.5/ 19.5	-	8.0/1 0.5	-
X8CrNiS 18-9	1.430 5	303	0.1	1	2	0.0 45	0.15/ 0.35	0.11	17.0/ 19.0	-	8.0/1 0.0	Cu: 1.00
X6CrNiTi 18-10	1.454 1	321	0.08	1	2	0.0 45	0.015	-	17.0/ 19.0	-	9.0/1 2.0	Ti: 5C/0.70
X4CrNi1 8-12	1.430 3	305	0.06	1	2	0.0 45	0.015	0.11	17.0/ 19.0	-	11.0/ 13.0	-
X2CrNiM o17-12-2	1.440 4	316L	0.03	1	2	0.0 45	0.015	0.11	16.5/ 18.5	2.00 /2.5 0	10.0/ 13.0	-
X2CrNiM oN17-11- 2	1.440 6	316L N	0.03	1	2	0.0 45	0.015	0.12 /0.2 2	16.5/ 18.5	2.00 /2.5 0	10.0/ 12.0	-
X5CrNiM o17-12-2	1.440 1	316	0.07	1	2	0.0 45	0.015	0.11	16.5/ 18.5	2.00 /2.5 0	10.0/ 13.0	-
X6CrNiM oTi17-12- 2	1.457 1	316T i	0.08	1	2	0.0 45	0.015	-	16.5/ 18.5	2.00 /2.5 0	10.5/ 13.5	Ti: 5C/0.70
X2CrNiM o17-12-3	1.443 2	316L	0.03	1	2	0.0 45	0.015	0.11	16.5/ 18.5	2.50 /3.0 0	10.5/ 13.0	-
X2CrNiM o18-14-3	1.443 5	316L	0.03	1	2	0.0 45	0.015	0.11	17.0/ 19.0	2.50 /3.0 0	12.5/ 15.0	-

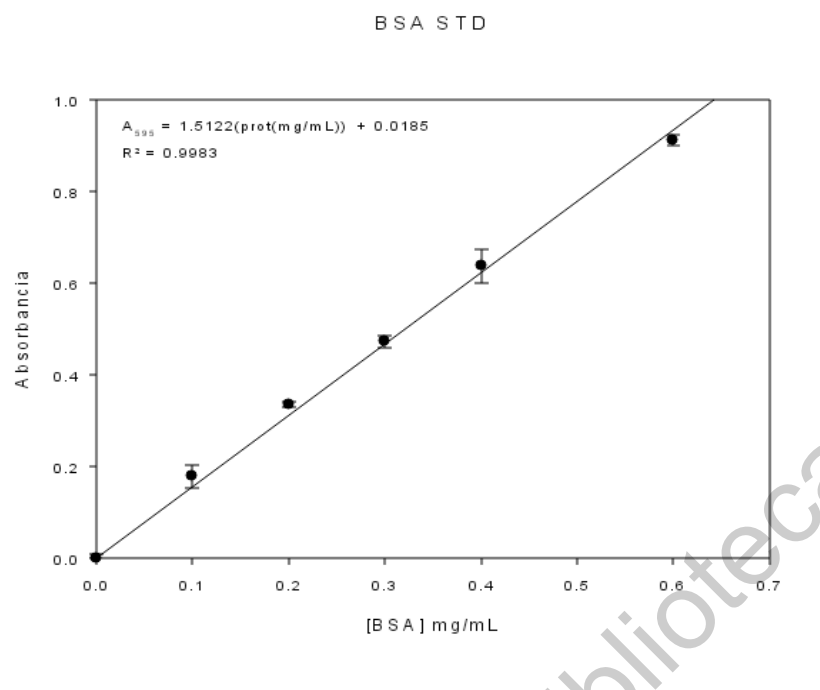
X2CrNiMoN17-13-5	1.4439	317L MN	0.03	1	2	0.045	0.015	0.12/0.22	16.5/18.5	4.0/5.0	12.5/14.5	-
X1NiCrMoCu25-20-5	1.4539		0.02	0.7	2	0.03	0.01	0.15	19.0/21.0	4.0/5.0	24.0/26.0	Cu: 1.20/2.00
Aceros inoxidables austeníticos - grados especiales												
X5CrNi17-7	1.4319		0.07	1	2	0.045	0.03	0.11	16.0/18.0	-	6.0/8.0	-
X5CrNiN19-9	1.4315		0.06	1	2	0.045	0.015	0.12/0.22	18.0/20.0	-	8.0/11.0	-
X5CrNiCu19-6-2	1.464		0.030/0.08	0.5	1.50/4.0	0.045	0.015	0.03/0.11	18.0/19.0	-	5.5/6.9	Cu: 1.30/2.00
X1CrNi25-21	1.4335	310L	0.02	0.25	2	0.025	0.01	0.11	24.0/26.0	0.2	20.0/22.0	-
X6CrNiNb18-10	1.455	347	0.08	1	2	0.045	0.015	-	17.0/19.0	-	9.0/12.0	Nb: 10xC/1.00
X1CrNiMoN25-22-2	1.4466	310 MoLN	0.02	0.7	2	0.025	0.01	0.10/0.16	24.0/26.0	2.00/2.50	21.0/23.0	-
X6CrNiMoNb17-12-2	1.458		0.08	1	2	0.045	0.015	-	16.5/18.5	2.00/2.50	10.5/13.5	Nb: 10xC/1.00
X2CrNiMoN17-3-3	1.4429	316LN	0.03	1	2	0.045	0.015	0.12/0.22	16.5/18.5	2.50/3.00	11.0/14.0	-
X3CrNiMo17-13-3	1.4436	316	0.05	1	2	0.045	0.015	0.11	16.5/18.5	2.50/3.00	10.5/13.0	-

X2CrNiMoN18-12-4	1.4434	317LN	0.03	1	2	0.045	0.015	0.10/0.20	16.5/19.5	3.0/4.0	10.5/14.0	-
X2CrNiMo18-15-4	1.4438	317L	0.03	1	2	0.045	0.015	0.11	17.5/19.5	3.0/4.0	13.0/16.0	-
X1CrNiMoCuN24-22-8	1.4652		0.02	0.5	2.00/4.0	0.03	0.005	0.45/0.55	23.0/25.0	7.0/8.0	21.0/23.0	Cu: 0.30/0.60
X1CrNiSi18-15-4	1.4361	306	0.015	3.7/4.5	2	0.025	0.01	0.11	16.5/18.5	0.2	14.0/16.0	-
X11CrNiMnN19-8-6	1.4369		0.02/0.10	1	10.5/12.5	0.05	0.015	0.20/0.30	17.0/19.0	-	3.5/4.5	Cu: 1.50/3.00
X6CrMnNiCuN18-12-4-2	1.4646		0.07/0.15	0.50/1.00	5.0/7.5	0.03	0.015	0.20/0.31	17.5/19.5	-	6.5/8.5	-
X12CrMnNiN17-7-5	1.4372	201	0.1	1	5.0/8.0	0.045	0.015	0.3	17.0/20.5	-	2.00/4.5	-
X2CrMnNiN17-7-5	1.4371	201L	0.15	1	5.5/7.5	0.045	0.015	0.05/0.25	16.0/18.0	-	3.5/5.5	-
X9CrMnNiCu17-8-5-2	1.4618		0.03	1	6.0/8.0	0.045	0.015	0.15/0.20	16.0/17.0	-	3.5/5.5	-
X12CrMnNiN18-9-5	1.4373	202	0.1	1	5.5/9.5	0.07	0.01	0.15	16.5/18.5	-	4.5/5.5	Cu: 1.50/2.50
X9CrMnCuNB17-8-3	1.4597	204Cu	0.15	1	7.5/10.5	0.045	0.015	0.05/0.25	17.0/19.0	-	4.0/6.0	-

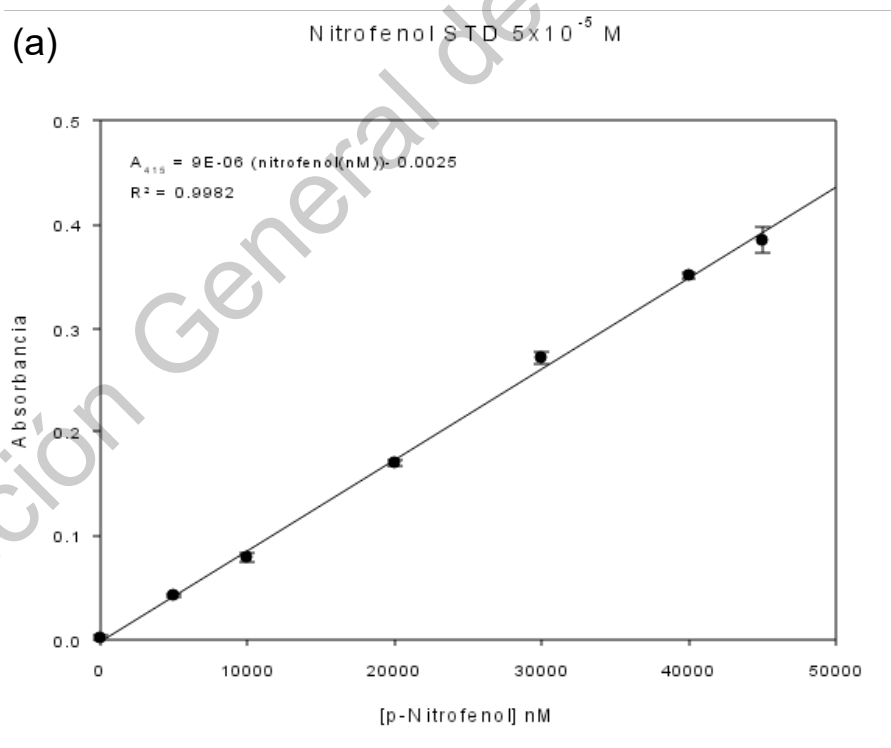
X8CrMnNi19-6-3	1.4376		0.1	2	6.5/8.5	0.04	0.03	0.15/0.30	16.0/18.0	1	2	B:0.0005/0.0050 Cu: 2.00/3.5
X1NiCrMo31-27-4	1.4563		0.02	0.7	2	0.03	0.01	0.11	26.0/28.0	3.0/4.0	30.0/32.0	Cu: 0.70/1.50
X1CrNiMoCuN25-25-5	1.4537		0.02	0.7	2	0.03	0.01	0.17/0.25	24.0/26.0	4.7/5.7	24.0/27.0	Cu: 1.00/2.00
X1CrNiMoCuN20-18-7	1.4547		0.02	0.7	1	0.03	0.01	0.18/0.25	19.5/20.5	6.0/7.0	17.5/18.5	Cu: 0.50/1.00
X1CrNiMoCuNW24-22-6	1.4659		0.02	0.7	2.00/4.0	0.03	0.01	0.35/0.50	23.0/25.0	5.5/6.5	21.0/23.0	Cu: 1.00/2.00 W: 1.50/2.50
X1NiCrMoCuN25-20-7	1.4529		0.02	0.5	1	0.03	0.01	0.15/0.25	19.0/21.0	6.0/7.0	24.0/26.0	Cu: 0.50/1.50
X2CrNiMnMoN25-18-6-5	1.4565		0.03	1	5.0/7.0	0.03	0.015	0.30/0.60	24.0/26.0	4.0/5.0	16.0/19.0	Nb: 0.15
Acero inoxidable austenítico-ferrítico (dúplex) - grados estándar												
X2CrNiN23-4	1.4362		0.03	1	2	0.035	0.015	0.05/0.20	22.0/24.0	0.10/0.60	3.5/5.5	Cu 0.10/0.60
X2CrNiMoN12-5-3	1.4462		0.03	1	2	0.035	0.015	0.10/0.22	21.0/23.0	2.50/3.50	4.5/6.5	
Aceros inoxidables austenítico-ferríticos (dúplex) - grados especiales												
X2CrNiN22-2	1.4062		0.03	1	2	0.04	0.01	0.16/0.28	21.5/24.0	0.45	1.00/2.90	-

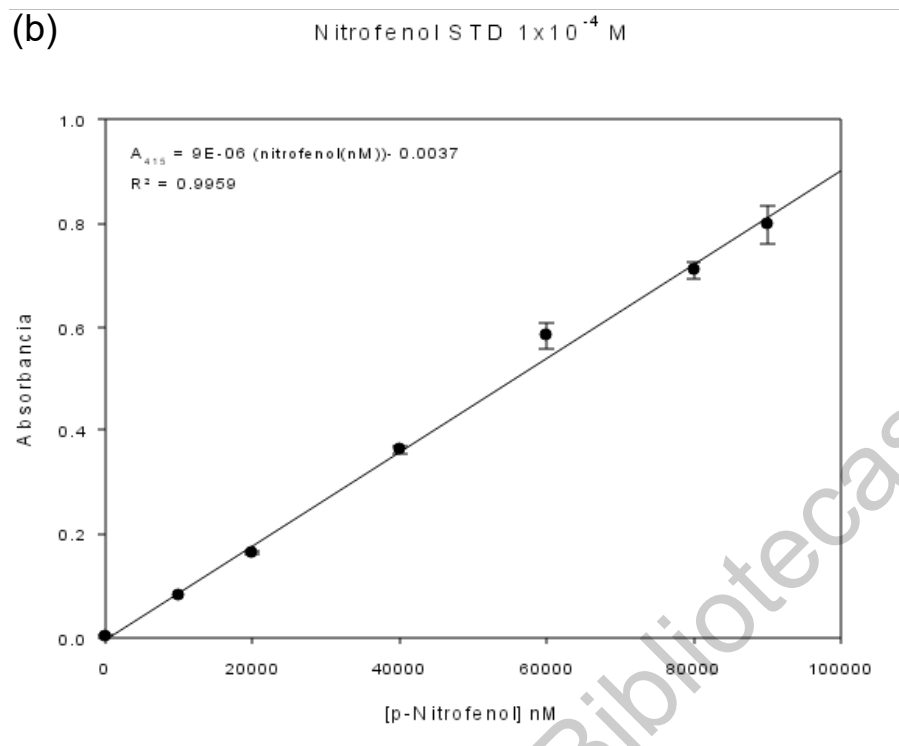
X2CrNiCuN23-4	1.4655		0.03	1	2	0.035	0.015	0.05/0.20	22.0/24.0	0.10/0.60	3.5/5.5	Cu: 1.00/3.00
X2CrMnNiN21-5-1	1.4162		0.04	1	4.0/6.0	0.04	0.015	0.20/0.25	21.0/22.0	0.10/0.80	1.35/1.90	Cu: 0.10/0.80
X2CrMnNiMoN21-5-3	1.4482		0.03	1	4.0/6.0	0.035	0.03	0.05/0.20	19.5/21.5	0.10/0.60	1.50/3.50	Cu: 1.00
X2CrNiMnMoCuN24-4-3-2	1.4662		0.03	0.7	2.50/4.0	0.035	0.005	0.20/0.30	23.0/25.0	1.00/2.00	3.0/4.5	Cu; 0.10/0.80
X2CrNiMnCoN29-7-2	1.4477		0.03	0.5	0.80/1.50	0.03	0.015	0.30/0.40	28.0/30.0	1.50/2.60	5.8/7.5	Cu: 0.80
X2CrNiMnCoCuN25-6-3	1.4507		0.03	0.7	2	0.035	0.015	0.20/0.30	24.0/26.0	3.0/4.0	6.0/8.0	Cu: 1.00/2.50
X2CrNiMnCoN25-7-4	1.441		0.03	1	2	0.035	0.015	0.24/0.35	24.0/26.0	3.0/4.5	6.0/8.0	-
X2CrNiMnCoCuWN25-7-4	1.4501		0.03	1	1	0.035	0.015	0.20/0.30	24.0/26.0	3.0/4.0	6.0/8.0	Cu: 0.50/1.00 W: 0.50/1.00
X2CrNiMnCoSi18-5-3	1.4424		0.03	1.40/2.00	1.20/2.00	0.035	0.015	0.05/0.10	18.0/19.0	2.50/3.0	4.5/5.2	-

**Apéndice 2.** Curva estándar de calibración utilizando BSA.



**Apéndice 3.** Curvas estándar de p- nitrofenol (a)  $5 \times 10^{-5}$  M y (b)  $1 \times 10^{-4}$  M.





**Apéndice 4.** Actividad enzimática y cálculo de la eficiencia de la inmovilización.

	Actividad ( $\text{nM min}^{-1}$ )	Eficiencia %
Glutaraldehído	436.85	8.42
Genipino	404.44	7.80
Enzima libre	5183.52	

**Apéndice 5. Resultados del diseño experimental en la etapa de entrecruzamiento con genipino.**

Tratamiento	Tiempo	A <sub>415</sub> 1	A <sub>415</sub> 2	A <sub>415</sub> corregida 1	A <sub>415</sub> corregida 2	Actividad 1 (nM min <sup>-1</sup> )	Actividad 2 (nM min <sup>-1</sup> )
	0	0.058	0.06	0.059	0	0.00	0.00
1	60	0.136	0.133	0.077	0.074	149.44	143.89
	120	0.325	0.334	0.266	0.275	249.72	258.06
	180	0.473	0.481	0.414	0.422	257.84	262.78
2	60	0.155	0.147	0.096	0.088	184.63	169.81
	120	0.555	0.576	0.496	0.517	462.69	482.13
	180	0.698	0.723	0.639	0.664	396.73	412.16
3	60	0.135	0.128	0.076	0.069	147.59	134.63
	120	0.448	0.467	0.389	0.408	363.61	381.20
	180	0.534	0.521	0.475	0.462	295.49	287.47
4	60	0.098	0.101	0.039	0.042	79.07	84.63
	120	0.122	0.131	0.063	0.072	61.76	70.09
	180	0.304	0.31	0.245	0.25	153.52	156.60
5	60	0.101	0.112	0.042	0.053	84.63	105.00
	120	0.135	0.128	0.076	0.069	73.80	67.31
	180	0.346	0.352	0.287	0.293	179.44	183.15
6	60	0.121	0.118	0.062	0.059	121.67	116.11
	120	0.151	0.163	0.092	0.104	88.61	99.72
	180	0.301	0.311	0.242	0.252	151.67	157.84
7	60	0.087	0.096	0.028	0.037	58.70	75.37
	120	0.208	0.213	0.149	0.154	141.39	146.02
	180	0.401	0.415	0.342	0.356	213.40	222.04
8	60	0.091	0.099	0.032	0.04	66.11	80.93
	120	0.159	0.167	0.1	0.108	96.02	103.43
	180	0.369	0.355	0.31	0.296	193.64	185.00
9	60	0.101	0.11	0.042	0.051	84.63	101.30
	120	0.165	0.154	0.106	0.095	101.57	91.39
	180	0.388	0.391	0.329	0.332	205.37	207.22

**Apéndice 6. Resultados del diseño experimental en la etapa de entrecruzamiento**



con glutaraldehído.

Tratamiento	Tiempo	A <sub>415</sub> 1	A <sub>415</sub> 2	A <sub>415</sub> corregida 1	A <sub>415</sub> corregida 2	Actividad 1 (nM min <sup>-1</sup> )	Actividad 2 (nM min <sup>-1</sup> )
	0	0.057	0.059	0.058	0	0	0
1	60	0.136	0.141	0.078	0.083	151.296296	160.555556
	120	0.225	0.212	0.167	0.154	158.055556	146.018519
	180	0.433	0.421	0.375	0.363	233.765432	226.358025
2	60	0.165	0.174	0.107	0.116	205	221.666667
	120	0.445	0.462	0.387	0.404	361.759259	377.5
	180	0.598	0.593	0.54	0.535	335.617284	332.530864
3	60	0.175	0.189	0.117	0.131	223.518519	249.444444
	120	0.419	0.427	0.361	0.369	337.685185	345.092593
	180	0.605	0.611	0.547	0.553	339.938272	343.641975
4	60	0.198	0.221	0.14	0.163	266.111111	308.703704
	120	0.422	0.417	0.364	0.359	340.462963	335.833333
	180	0.659	0.668	0.601	0.61	373.271605	378.82716
5	60	0.212	0.208	0.154	0.15	292.037037	284.62963
	120	0.565	0.581	0.507	0.523	472.87037	487.685185
	180	0.733	0.729	0.675	0.671	418.950617	416.481481
6	60	0.221	0.208	0.163	0.15	308.703704	284.62963
	120	0.551	0.563	0.493	0.505	459.907407	471.018519
	180	0.729	0.742	0.671	0.684	416.481481	424.506173
7	60	0.283	0.295	0.225	0.237	423.518519	445.740741
	120	0.488	0.491	0.43	0.433	401.574074	404.351852
	180	0.652	0.675	0.594	0.617	368.950617	383.148148
8	60	0.291	0.299	0.233	0.241	438.333333	453.148148
	120	0.499	0.512	0.441	0.454	411.759259	423.796296
	180	0.769	0.755	0.711	0.697	441.17284	432.530864
9	60	0.251	0.261	0.193	0.203	364.259259	382.777778
	120	0.465	0.454	0.407	0.396	380.277778	370.092593
	180	0.758	0.745	0.7	0.687	434.382716	426.358025

**Apéndice 7.** Resultados del análisis de varianza del diseño experimental, genipino

como agente entrecruzante.

GENIPINO					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F <sub>c</sub>	Valor P
pH	1	24777	24777	4.513	0.0519
Tiempo	1	126	126	0.023	0.8817
pH: Tiempo	1	784	784	0.143	0.7111
Residuales	14	76858	5490		

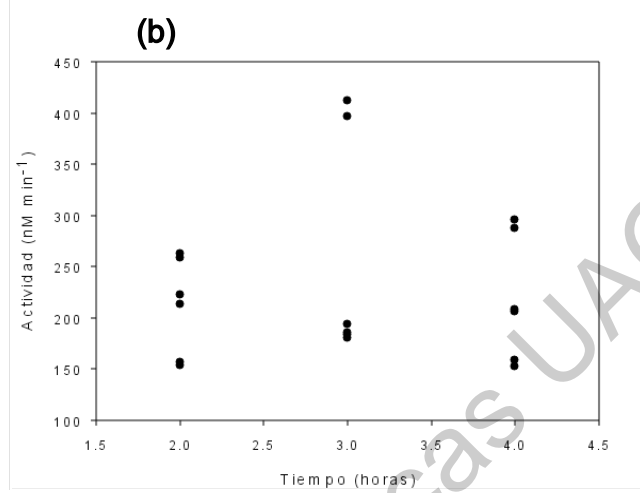
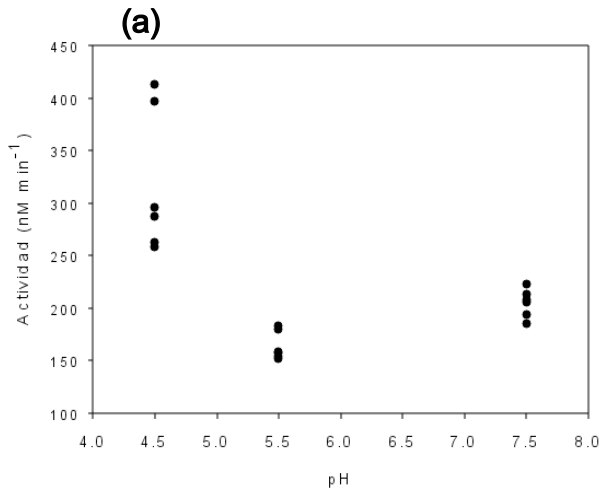
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

**Apéndice 8.** Resultados del análisis de varianza del diseño experimental, glutaraldehído como agente entrecruzante.

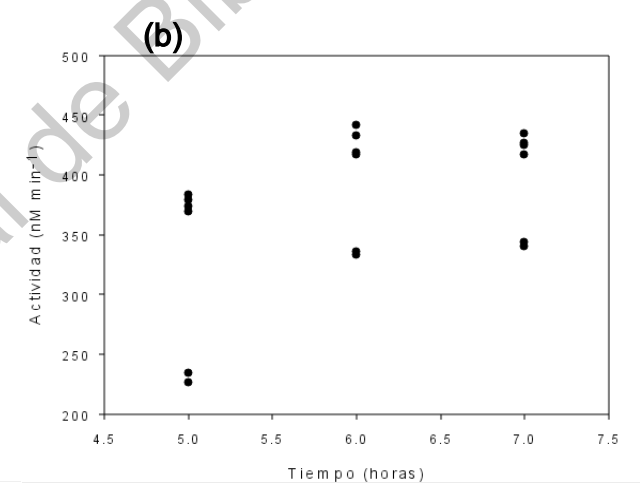
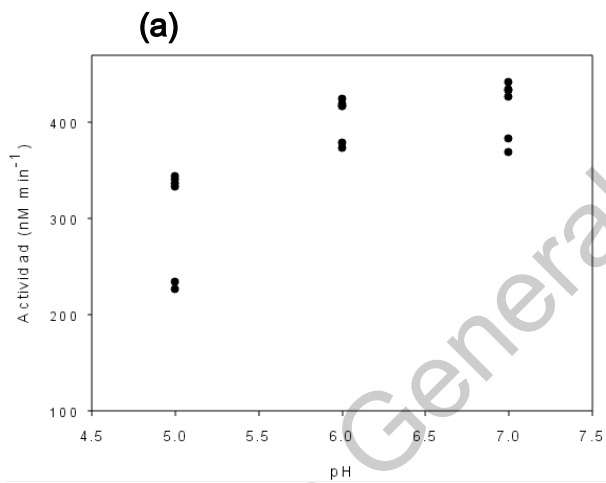
GLUTARALDEHIDO					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F <sub>c</sub>	Valor P
pH	1	37934	37934	35.345	3.58e-05 ***
Tiempo	1	14769	14769	13.761	0.00233 **
pH: Tiempo	1	1648	1648	1.535	0.23568
Residuales	14	15025	1073		

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

**Apéndice 9.** Gráficas de actividad enzimática en función de los dos factores del diseño experimental con genipino, a) pH y b) tiempo.

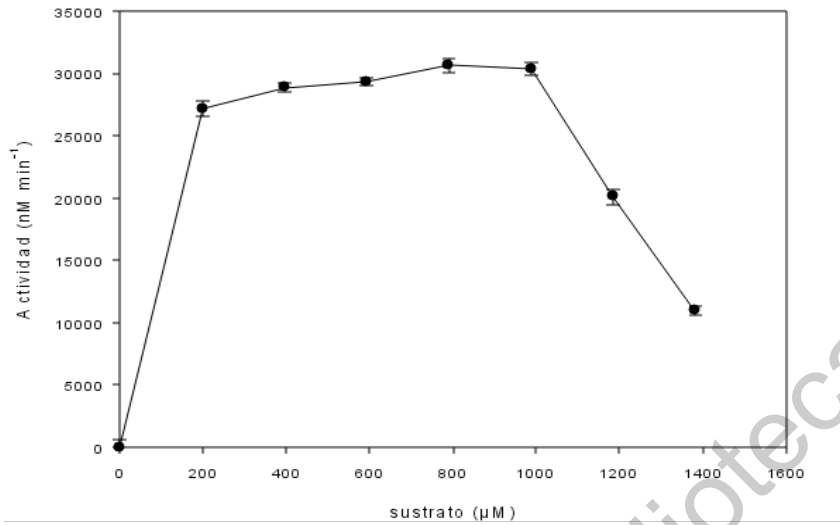


**Apéndice 10.** Gráficas de actividad enzimática en función de los dos factores del diseño experimental con glutaraldehído, a) pH y b) tiempo.

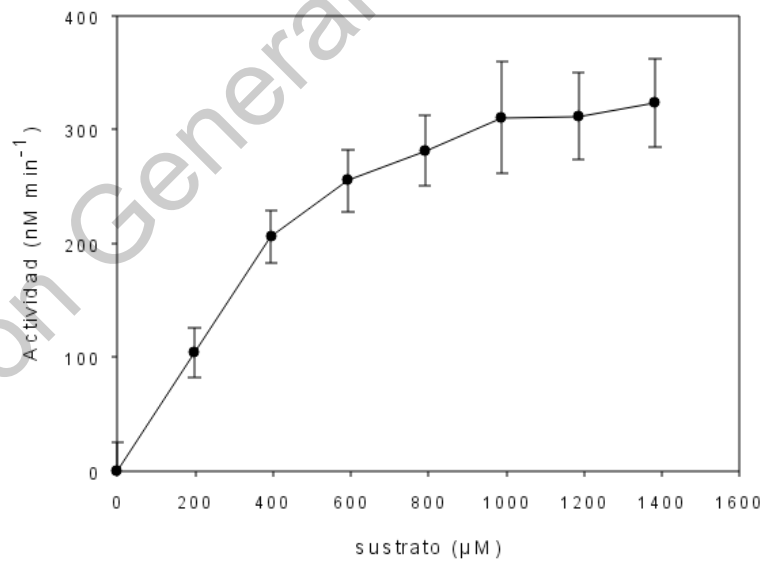


**Apéndice 11.** Evaluación de actividad enzimática de la lipasa libre en diferentes

concentraciones de sustrato.

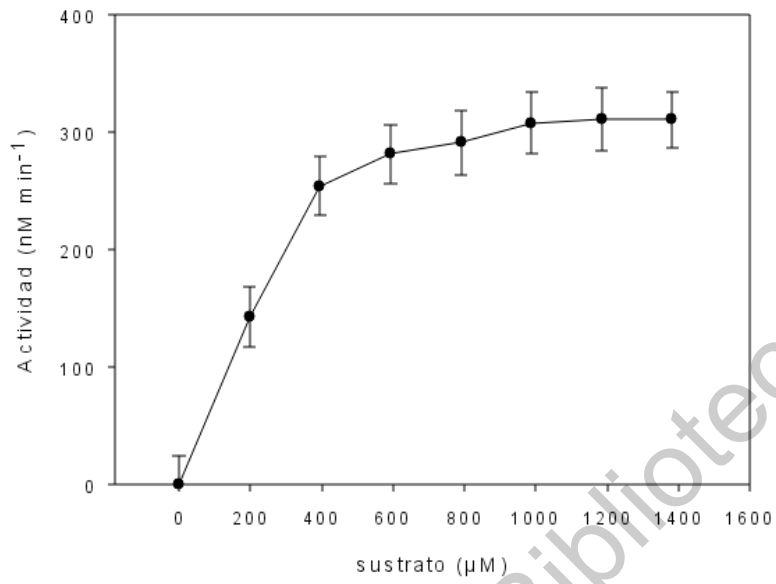


**Apéndice 12.** Evaluación de actividad enzimática de la lipasa inmovilizada en diferentes concentraciones de sustrato, utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante.



**Apéndice 13.** Evaluación de actividad enzimática de la lipasa inmovilizada en diferentes concentraciones de sustrato, utilizando genipino como agente

entrecruzante.



Dirección General de Bibliotecas UAQ