

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

“Evaluación de la capacidad y eficiencia de enzimas lipasas encapsuladas para degradación de grasas”

VIDA-466

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Bióloga

Presentado por:

Celine Suaney Perero Segarra

Guayaquil - Ecuador

Año: 2025

Dedicatoria

El presente proyecto se lo dedico en primer lugar, a Dios, por brindarme la fortaleza, la sabiduría y la perseverancia necesaria para culminar esta etapa de mi formación académica, a mi mamá, a mi hermano y a mis perritos Ellie, Zoe y Aquiles por ser mis acompañantes y soporte durante todo mi proceso estudiantil. A mi abuelo y a mi abuelita que a pesar de no estar físicamente sé que me acompañó y nunca me dejó sola durante este largo proceso. A mi mejor amiga Giuliana Burbano por su amistad sincera, apoyo constante y palabras de aliento en los momentos de dificultad, siendo una fuente invaluable de motivación durante este proceso. A mi novio Jorge Rodríguez por su paciencia, comprensión y acompañamiento incondicional, quien con su apoyo y confianza hizo más llevadero este camino. A mis profesores y tutores por ser las personas que me supieron guiar y llevar a donde estoy actualmente. Gracias a todos ellos por la paciencia y confianza, los tendré siempre en mi corazón. Esto es por y para ustedes.

Agradecimientos

Expreso mi más sincero agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la ejecución de este proyecto gracias a su apoyo, confianza y valiosa colaboración. De manera especial, al Laboratorio de Proteómica por brindarme el espacio y los recursos necesarios, así como a mi tutora, la PhD Nardy del Valle Diez, por su guía, conocimientos y acompañamiento constante a lo largo de este proceso. Agradezco también al Ing. Jeffrey Vargas por su paciencia, disposición y apoyo técnico, y a la Bióloga Marisa Arias por sus aportes y colaboración.

Asimismo, extendo mi gratitud al CIBE y a la ESPOL por facilitar sus instalaciones, equipos y recursos, los cuales fueron fundamentales para mi formación profesional y para el desarrollo exitoso de este trabajo, contribuyendo significativamente a mi crecimiento académico y al avance en el cumplimiento de mis metas profesionales.

Declaración Expresa

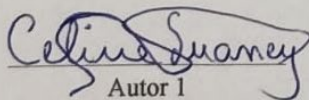
Yo Celine Suaney Perero Segarra estoy de acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al autor que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 12 de octubre del 2025


Autor 1

Evaluadores

Diego Gallardo

Nardy del Valle Diez

RESUMEN

El presente proyecto de investigación abordó el desarrollo y la evaluación de un sistema de encapsulamiento de lipasas para la degradación de grasas, aceites y sebos (FOG) en aguas residuales. Se utilizaron tres cepas bacterianas mesófilas nativas (TG3, TG5 y TG16) aisladas de trampas de grasa de la ESPOL, las cuales fueron caracterizadas por su actividad lipolítica, destacando la cepa TG3 por su alto rendimiento (5.93 U/mL) y la TG16 por su estabilidad. A partir de estas cepas se conformó un consorcio bacteriano cuyo extracto enzimático fue inmovilizado mediante gelificación iónica en matrices de alginato de sodio. La estandarización del protocolo determinó que la concentración al 1.0% de alginato es la óptima, logrando una actividad de 6.67 U/mL, superior a la del consorcio libre (4.44 U/mL). Este sistema no solo optimizó la transferencia de masa y evitó la lixiviación enzimática, sino que proporcionó un microambiente protector que facilita la reutilización del biocatalizador, ofreciendo una solución biotecnológica viable y sostenible para la gestión de efluentes industriales y domésticos.

Abstract

This research project focused on the development and evaluation of a lipase encapsulation system for the degradation of fats, oils, and greases (FOG) in wastewater. Three native mesophilic bacterial strains (TG3, TG5, and TG16), isolated from grease traps at ESPOL, were characterized for their lipolytic activity. Strain TG3 stood out for its high yield (5.93 U/mL), while TG16 showed high stability. From these strains, a bacterial consortium was formed, and its enzymatic extract was immobilized through ionic gelation in sodium alginate matrices. Protocol standardization determined that a 1.0% alginate concentration is optimal, achieving an activity of 6.67 U/mL, which is superior to the free consortium (4.44 U/mL). This system not only optimized mass transfer and prevented enzyme leaching but also provided a protective microenvironment that facilitates biocatalyst reuse, offering a viable and sustainable biotechnological solution for managing industrial and domestic effluents

Índice General

Contenido

RESUMEN.....	6
Abstract.....	7
1.1. Introducción.....	10
1.2. Descripción del Problema.....	11
1.3. Justificación del Problema.....	12
1.4. Objetivos	13
1.4.1. Objetivo General	14
1.4.2. Objetivos Específicos.....	14
1.5. Marco Teórico	14
1.5.1. Grasas, Aceites y Sebos (FOG) en Aguas Residuales.....	14
1.5.2. Problemáticas Asociadas	15
1.5.3. Fundamentos de la Biorremediación Enzimática con Lipasas.....	16
1.5.4. Ventajas Biotecnológicas	16
1.5.5. Tecnologías de Encapsulamiento e Inmovilización de Enzimas.....	17
1.5.6. Métodos de Encapsulamiento Seleccionado:	17
3.2.2. Cálculo de la Actividad Lipolítica por Réplica.....	34
3.2.3. Actividad Lipolítica Promedio Final	34
3.6. Análisis Estadístico de los Resultados	38
3.7. Discusión de la Concentración Óptima	39
Tabla 1 Valores correspondientes al Día 3- 15:00:00 (punto máximo de biomasa) después de la corrección por el blanco	32
Tabla 2 Promedios de U/mL (réplicas) de cada cepa	35
Ilustración 1 Modelo Anova.....	38
Ilustración 2 Gráfica de Tukey.....	39

Capítulo 1

1.1. Introducción

El crecimiento demográfico e industrial sostenido ha generado una presión sin precedentes sobre los sistemas de gestión de aguas residuales. Entre los contaminantes más complejos de gestionar en los sistemas de aguas residuales, las grasas, aceites y sebos (FOG, del inglés Fats, Oils, and Greases) representan un desafío crucial para la infraestructura de saneamiento y para la protección del medio ambiente (Husain et al., 2014). Estos residuos, generados principalmente por la actividad doméstica, la industria alimentaria y el procesamiento de cárnicos, son vertidos frecuentemente a la red de alcantarillado sin un tratamiento previo adecuado, lo que desencadena una serie de problemáticas sistémicas.

Las consecuencias de este vertido no controlado son de doble impacto, con una marcada repercusión económica y operativa en los sistemas municipales:

A nivel de infraestructura, la acumulación y solidificación de FOG reduce drásticamente la capacidad de flujo, provocando obstrucciones y costosos fallos en las estaciones de bombeo y las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) (Fluence Corporation, 2024). Las intervenciones de limpieza y mantenimiento por desbordamientos causados por FOG son altamente costosas para las operadoras de saneamiento. Los gastos asociados al funcionamiento y conservación de las PTAR en la región son considerables. De manera específica, los rubros destinados a insumos mecánicos, piezas de repuesto y combustibles para la conservación de las plantas de tratamiento, debido a la complejidad en el procesamiento de residuos como el FOG, pueden alcanzar hasta el 45% del presupuesto operativo y de mantenimiento total cada año (ETAPA EP, 2021). Este porcentaje demuestra la alta ineficiencia económica.

Un dato clave del contexto nacional es que solo aproximadamente 24% del volumen total de agua distribuida es dirigido posteriormente a plantas de tratamiento (INEC, 2023). Este bajo porcentaje de cobertura de saneamiento hace indispensable que las PTAR en funcionamiento mantengan su máxima capacidad operativa, lo que se ve comprometido por las pérdidas de eficiencia inherentes al manejo de la carga de FOG.

Ante este panorama de urgencia operativa y ambiental, la biorremediación se perfila como una estrategia inherentemente sostenible. Dentro de este campo, el empleo de lipasas (enzimas con la capacidad de hidrolizar triglicéridos) proporciona un método de degradación de grasas que es limpio y de alta especificidad. No obstante, el principal obstáculo reside en que las lipasas en su estado libre son extremadamente vulnerables a las condiciones ambientales desfavorables (pH, fluctuaciones de temperatura y agentes inhibidores), lo cual restringe significativamente su implementación viable a escala industrial (Biomedica, 2020).

Por consiguiente, este proyecto se enmarca en la búsqueda de soluciones biotecnológicas para la gestión de FOG, proponiendo el desarrollo de un sistema de encapsulamiento de lipasas. La encapsulación busca proteger el biocatalizador de la inactivación, prolongar su vida útil efectiva, y posibilitar su reuso en condiciones controladas de biorremediación. Esto establece un alcance alineado con la pertinencia de la carrera de Biología, al aplicar principios de ingeniería de bioprocesos para resolver un problema ambiental de alto impacto.

1.2. Descripción del Problema

El desafío técnico central radica en la inestabilidad de la enzima lipasa de interés, la cual, a pesar de su alta eficiencia catalítica, experimenta una rápida pérdida de actividad en

entornos simulados de aguas residuales. La descarga de efluentes grasos se caracteriza por fluctuaciones en temperatura (entre 20 °C y 40 °C), variaciones de pH (típicamente entre 5 y 9) y la presencia de detergentes o metales que actúan como desnaturalizantes o inhibidores enzimáticos (Márquez y colaboradores, 2015).

La solución biológica propuesta, es decir, el uso de la lipasa, queda inviabilizada económicamente debido a su consumo acelerado y la necesidad de dosificación constante. Por ello, el ámbito de acción de este proyecto se delimita a la creación de una matriz polimérica o estructural que funcione como medio de encapsulamiento protector. Las variables clave a considerar incluyen:

1. **Protección Estructural:** La matriz debe ser capaz de aislar la enzima de los estresores ambientales, manteniendo la conformación tridimensional esencial para su actividad.
2. **Difusión de Substrato:** El medio de encapsulamiento debe permitir el acceso eficiente de las moléculas de grasa (substrato) a la enzima, garantizando una alta tasa de degradación.
3. **Retención de Actividad:** La métrica crítica es la capacidad del sistema encapsulado de retener la actividad catalítica a lo largo de ciclos repetidos de uso, lo cual es fundamental para la reusabilidad en biorremediación.

La necesidad se concreta en el desarrollo de un protocolo de encapsulación que optimice la actividad de degradación de grasas bajo condiciones que simulan escenarios reales de efluentes, limitando así el problema al ámbito de la biotecnología enzimática aplicada.

1.3. Justificación del Problema

Abordar el desarrollo y la evaluación de lipasas encapsuladas es imperativo por razones ambientales, económicas y de innovación tecnológica:

1. Sostenibilidad Ambiental: El método propuesto ofrece una alternativa biológica a los tratamientos fisicoquímicos que emplean productos químicos (ej. floculantes) o métodos térmicos de alto consumo energético. La biorremediación de FOG resulta en subproductos más benignos (glicerol y ácidos grasos) que pueden ser revalorizados o tratados con menor impacto ecológico.

2. Eficiencia y Viabilidad Económica: La principal limitación de la enzimología industrial es el alto costo de la enzima libre, sumado a su corta vida útil. Al lograr un sistema encapsulado estable y reusable, se reduce significativamente el consumo de biocatalizador y los costos operativos asociados al tratamiento de aguas residuales, impulsando la adopción de esta tecnología a nivel industrial.

3. Innovación y Estado del Arte: Existe una necesidad continua de mejorar las matrices de encapsulación. Este trabajo contribuye al estado del arte mediante la estandarización de un protocolo específico, que busca una relación óptima entre estabilidad y capacidad de reacción, proporcionando datos concretos sobre la degradación de grasas con el sistema desarrollado. Este conocimiento es valioso para el diseño futuro de biorreactores enzimáticos.

En resumen, la presente investigación no solo ofrece una solución a un problema de contaminación crítica, sino que también genera conocimiento aplicado y viable, fortaleciendo la capacidad de la ESPOL en el campo de la biotecnología ambiental.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad y eficiencia de enzimas lipasas encapsuladas para la degradación de grasas en condiciones controladas de biorremediación.

1.4.2. Objetivos Específicos

1. Establecer las condiciones óptimas para la formulación del consorcio bacteriano y su inmovilización en alginato de sodio, asegurando una alta eficiencia en la degradación de grasas
2. Determinar la capacidad de degradación de grasas por parte de las lipasas encapsuladas a través de bioensayos.
3. Evaluar la estabilidad y retención de actividad enzimática del sistema encapsulado en diferentes concentraciones, para determinar evaluar su efectividad.

1.5. Marco Teórico

1.5.1. Grasas, Aceites y Sebos (FOG) en Aguas Residuales

Los FOG son una mezcla compleja de compuestos orgánicos no polares, siendo los principales constituyentes los triglicéridos (triacilgliceroles), seguidos por ácidos grasos libres, monoglicéridos, diglicéridos, fosfolípidos y ceras. La principal diferencia entre grasas y aceites radica en su estado físico a temperatura ambiente, donde las grasas son sólidas y los aceites líquidos. Esta diferencia se correlaciona con el grado de saturación de sus cadenas de ácidos grasos.

Composición y Origen

La mayor parte de la descarga de FOG proviene de actividades antrópicas, principalmente de la industria de servicios alimentarios (Restaurantes, Aceites Gastronómicos - RAG), plantas de procesamiento de alimentos, y mataderos. La concentración de FOG en los efluentes varía significativamente, pero su naturaleza inherentemente hidrofóbica y baja densidad provoca que se separen rápidamente de la fase acuosa.

1.5.2. Problemáticas Asociadas

El impacto de los FOG se manifiesta en dos esferas críticas:

A: Operacional y de Infraestructura:

Al enfriarse en el sistema de alcantarillado, los FOG se solidifican y se adhieren a las paredes de las tuberías. Este fenómeno conduce a la formación de las llamadas "fatbergs", que son masas sólidas y compactas responsables de casi la mitad de los desbordamientos del alcantarillado sanitario en sistemas urbanos (Husain et al., 2014). Estos bloqueos requieren intervenciones costosas y disruptivas (Fluence Corporation, 2024).

B: Biológica y Ambiental:

La presencia de FOG en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) afecta negativamente los procesos biológicos clave, como el tratamiento de lodos activados. Los compuestos grasos pueden recubrir los microorganismos activos, inhibiendo la transferencia de oxígeno y nutrientes, lo que resulta en una menor eficiencia de la degradación de materia orgánica y una peor calidad del efluente final (Márquez y colaboradores, 2015). Si estos efluentes contaminados alcanzan cuerpos de agua naturales, forman una película superficial que restringe el intercambio gaseoso, impactando la vida acuática por hipoxia.

1.5.3. Fundamentos de la Biorremediación Enzimática con Lipasas

Las lipasas (Triacilglicerol acilhidrolasas, EC 3.1.1.3) son un grupo de enzimas de origen biológico ampliamente distribuidas en animales, plantas y, crucialmente, en microorganismos (Biomedica, 2020). Su función biológica primaria es catalizar la hidrólisis de los enlaces éster de los triglicéridos a la interfase agua/aceite, liberando glicerol y ácidos grasos libres.

Mecanismo de Acción y Activación Interfacial

Las lipasas son conocidas por poseer una estructura singular y un mecanismo de activación catalítica altamente eficiente. La mayoría de las lipasas microbianas operan mediante un mecanismo de activación interfacial: en un medio acuoso, su sitio activo está cubierto por un bucle peptídico denominado "tapa" o lid. Cuando la lipasa entra en contacto con la interfase agua/aceite (es decir, una gota de grasa), esta tapa experimenta un cambio conformacional, exponiendo el sitio activo al sustrato lipídico. Esta característica garantiza que la enzima solo sea altamente activa cuando está en contacto directo con el sustrato graso. El sitio activo emplea una tríada catalítica (típicamente Serina-Histidina-Aspartato/Glutamato) para realizar la hidrólisis.

1.5.4. Ventajas Biotecnológicas

El interés industrial en las lipasas radica en sus propiedades como biocatalizadores:

- **Alta Especificidad:** Catalizan reacciones específicas sin generar subproductos indeseados.
- **Condiciones Suaves:** Operan a temperaturas y presiones moderadas, lo que reduce los requerimientos energéticos.

- **Naturaleza Ecológica:** Son biodegradables y no tóxicas, lo que las hace ideales para procesos de biorremediación.

1.5.5. Tecnologías de Encapsulamiento e Inmovilización de Enzimas

A pesar de sus ventajas catalíticas, la aplicación de lipasas libres en la biorremediación de FOG se ve obstaculizada por su baja estabilidad en las condiciones adversas del efluente, así como por los desafíos de su recuperación y reuso. La **inmovilización enzimática** es la técnica clave para superar estas limitaciones.

El encapsulamiento se clasifica como una forma de inmovilización por **atrapamiento (entrapment)**, donde la enzima es confinada dentro de una matriz polimérica sin formar enlaces covalentes directos con el material de soporte.

1.5.6. Método de Encapsulamiento:

El método de encapsulamiento seleccionado para este proyecto es la gelificación iónica con alginato de sodio, favorable por sus condiciones de reacción suave que preservan la actividad enzimática:

- Encapsulamiento en Alginato de Sodio (Gelificación Iónica):

La selección del alginato de sodio como matriz de soporte para la inmovilización de lipasas se fundamenta en su excepcional capacidad de atrapamiento y su biocompatibilidad. A diferencia de otros polímeros hidrofílicos como el quitosán, que presentan eficiencias de inmovilización cercanas al 56%, el alginato de sodio permite alcanzar niveles de retención enzimática de hasta el 95%. Esta eficiencia superior se debe a la formación de una red polimérica compacta mediante el método de

gelificación iónica con iones de calcio (Ca^{2+}), lo cual minimiza la pérdida de la enzima durante el proceso de síntesis y garantiza una mayor carga de biocatalizador por unidad de volumen. Además, la morfología resultante en forma de esferas de hidrogel proporciona una estructura física estable con una superficie rugosa que favorece la interacción con los sustratos lipídicos en entornos de tratamiento de aguas residuales.

Asimismo, el uso de alginato de sodio ofrece una ventaja crítica en términos de estabilidad operativa y almacenamiento. Se ha demostrado que las enzimas encapsuladas en esta matriz no solo preservan su actividad catalítica, sino que pueden mostrar un incremento en su actividad residual (pasando de un 39% a un 51% tras 30 días) cuando se mantienen en almacenamiento húmedo a bajas temperaturas. Este fenómeno se atribuye al microambiente protector que genera el polímero, el cual actúa como una barrera contra la desnaturalización y limita la difusión prematura de la enzima hacia el exterior. Finalmente, el proceso de encapsulamiento se realiza bajo condiciones fisiológicas suaves de pH y temperatura, lo que resulta esencial para mantener la integridad estructural del sitio activo de la lipasa, convirtiendo al alginato en una opción técnica y económicamente viable para la biorremediación de grasas, aceites y sebos (FOG).

Efectos Físico-Químicos de la Inmovilización

El encapsulamiento ofrece ventajas cruciales al crear un microambiente alrededor de la enzima:

1. **Incremento de Estabilidad:** La matriz polimérica actúa como un escudo físico contra los estresores ambientales, resultando en una mayor **termoestabilidad** y

una mejor tolerancia a los extremos de pH, tal como es necesario en los efluentes grasos.

2. **Protección contra la Proteólisis:** La barrera física protege la lipasa del ataque de proteasas contaminantes que podrían estar presentes en el efluente.
3. **Viabilidad Económica:** La inmovilización permite la separación simple y rápida del biocatalizador de la fase líquida, facilitando su **reuso** en múltiples ciclos de hidrólisis, lo cual es el factor clave para la viabilidad económica y el alcance del Objetivo Específico 3.

La investigación en el uso de lipasas inmovilizadas para la gestión de FOG se ha intensificado, demostrando consistentemente que el biocatalizador inmovilizado es superior a la enzima libre en términos de estabilidad operacional.

Un estudio previo estudió la aplicación de lipasas en diferentes matrices y tipos de efluentes. Por ejemplo, Guerrero et al. (2013) abordaron el **pre-tratamiento de aguas residuales de la industria láctea** utilizando lipasas inmovilizadas. Sus hallazgos indican el potencial de esta tecnología para reducir el contenido de grasas antes del tratamiento biológico primario, aunque la búsqueda se centra en optimizar la matriz para maximizar la remoción.

De manera complementaria, el trabajo de Márquez y colaboradores (2015) destaca la viabilidad de la aplicación de **lipasas microbianas** en tratamientos de biorremediación, señalando la necesidad de que la enzima resista condiciones como la presencia de metales pesados u otros agentes tóxicos.

- **Brecha de Conocimiento y Justificación del Enfoque**

A pesar de estos avances, existe una brecha crítica: el diseño de un protocolo de encapsulación que logre una combinación óptima entre una alta eficiencia de encapsulación, una duradera estabilidad operacional (particularmente en ciclos de reuso prolongados), y una mínima restricción a la difusión del sustrato (FOG). Los estudios a menudo sacrifican la capacidad de reacción por la estabilidad o viceversa. Por lo tanto, la presente investigación se enfoca en estandarizar el protocolo de encapsulación (Objetivo Específico 1), buscando un equilibrio que permita al sistema inmovilizado no solo resistir las condiciones simuladas de biorremediación, sino también mantener una alta capacidad de degradación de grasas a lo largo del tiempo, lo cual constituye el aporte distintivo de este proyecto al estado del arte.

Capítulo 2

2. Metodología

Las cepas bacterianas con las que se trabajó en el proyecto son 3 cepas (TG3, TG5, TG16) que fueron aisladas a partir de muestras recolectadas en una trampa de grasa instalada en el sistema de drenaje de un comedor de la universidad de ESPOL.

2.1. Preparación de la Lipasa Microbiana

El objetivo de esta sección es describir el protocolo para obtener la lipasa con la actividad específica necesaria, previo a su uso en los procesos de encapsulamiento.

Material Microbiano y Cultivo de Mantenimiento

- **Cepas Mesófilas (TG3, TG5, TG16):** Se usaron tres cepas bacterianas mesófilas TG3, TG5 y TG16, aisladas previamente de una trampa de grasa de comedor universitario. Las cepas se mantendrán almacenadas en crioviales a -80°C en una solución de glicerol al 20%. Para su uso experimental, se **realizó** una reactivación por siembra en placas de Agar Nutritivo (AN) y se incubaron a 28°C durante 48 horas.
- **B. Cultivo Inóculo (Pre-Cultivo):**

Para asegurar la viabilidad y la fase de crecimiento exponencial, se **preparó** un cultivo inóculo individual para cada cepa. Una asada de cada cepa reactivada se transfirió a un matraz Erlenmeyer con 150 mL de medio de cultivo Luria-Bertani (LB). El matraz se incubó en agitación orbital a 28°C y 98 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1.0$, típicamente después de 72 horas.

2.2. Producción Enzimática (Fermentación)

La producción de la **lipasa** fue inducida de forma extracelular en un medio enriquecido con aceite de oliva.

A. Medio de Producción y Condiciones Específicas: El medio de producción fue **LB**, complementado con aceite de oliva estéril como inductor lipídico a una concentración de 4 v/v %. El pH inicial del medio se ajustó a 7.2 (óptimo para la secreción de lipasas mesófilas).

B. Bioproceso: Se inoculó el medio de producción con el cultivo inóculo a una relación de 10 v/v %. La fermentación se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer.

- Temperatura: 28 °C
- Agitación: 98 rpm. Esta velocidad de agitación fue mantenida constante en el agitador orbital. La suficiencia de esta condición se validó con las curvas de crecimiento, donde las cepas (TG3, TG5 y TG16) alcanzaron densidades ópticas finales promedio de $DO_{600\text{ nm}}$ approx 0.49 al finalizar el DÍA 3 de producción, confirmando la biomasa adecuada para la inducción enzimática (Sección 3.1.1).
- Tiempo de Producción: 96 horas. Se incluyeron controles negativos con medio LB suplementado con aceite de oliva, pero sin inocular.

Cabe resaltar que cada cepa fue trabajada por triplicado independiente, considerando que son 3 cultivos diferentes, asegurando la repetibilidad de los resultados. Y finalizado el periodo de incubación, los cultivos líquidos (tanto bacterianos como controles) fueron transferidos y sometidos a centrifugación a 5000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, utilizando una centrífuga modelo 5810 R (Eppendorf). El objetivo de este paso fue separar la biomasa bacteriana del sobrenadante, donde se encuentra la enzima secretada o lipasas extracelulares. El sobrenadante fue cuidadosamente recolectado en tubos estériles,

tratando de descartar la capa superficial de aceite y evitando el arrastre del pellet. Luego fue almacenado a 4 °C para su uso inmediato en los ensayos de cuantificación.

2.3. Titulación de la actividad lipolítica

La actividad de las enzimas lipasas producidas por las cepas seleccionadas se cuantificó mediante un ensayo de titulación ácido-base, adaptado del protocolo propuesto por Al Mohaini et al. (2022). Este procedimiento permitió estimar indirectamente la cantidad de ácidos grasos liberados como producto de la hidrólisis de triglicéridos presentes en el sustrato.

Para tal efecto, se preparó una emulsión estable que sirvió como sustrato enzimático, compuesta por un 10% de aceite de oliva, 10% p/v de goma arábiga (como agente emulsionante), 0.6% de cloruro de calcio (CaCl_2) y 10% de buffer fosfato de sodio 0.1 M. El volumen restante se completó con agua destilada estéril, y para cada reacción, se mezclaron 2.25 mL de esta emulsión con 0.25 mL del sobrenadante enzimático crudo previamente obtenido.

Luego, las mezclas fueron incubadas en agitación constante a 150 rpm durante 1 hora a 29°C, utilizando agitadores orbitales modelo Innova 40 (New Brunswick Scientific) y Shaking Incubator HYSC. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se interrumpió la reacción enzimática mediante la adición de 3.75 mL de una solución acetona: etanol en proporción 1:1 (v/v). Este paso permitió detener la actividad catalítica de la lipasa. A continuación, se añadió 22.5 μL de fenolftaleína al 1% como indicador de pH. Y seguidamente, se procedió a la titulación directa con NaOH 0.05 M, utilizando una bureta manual, hasta observar el cambio a una coloración rosa tenue, indicativo del punto final de neutralización (Al Mohaini et al., 2022).

El volumen de hidróxido de sodio consumido durante la titulación fue registrado para cada muestra. Este dato permitió comparar de manera relativa la intensidad de la actividad lipolítica entre cepas, partiendo del principio de que una mayor liberación de ácidos grasos requiere mayor cantidad de base para ser neutralizada.

Las titulaciones se realizaron por triplicado para cada una de las cinco cepas evaluadas junto a sus respectivos controles, asegurando consistencia y reproducibilidad en los resultados.

Similarmente, para el futuro cálculo de la actividad lipolítica y para asegurar la validez de los resultados obtenidos en la titulación, se prepararon blancos específicos por cada cepa y condición de control experimental. Estos blancos fueron tratados bajo el mismo protocolo de incubación, agitación y temperatura que las muestras experimentales, con la única diferencia de que el sobrenadante enzimático se añadió únicamente después de interrumpida la reacción con la solución de acetona: etanol. Esta modificación permitió descartar cualquier neutralización generada por compuestos no lipolíticos presentes en el medio o en el sustrato, asegurando que el consumo de NaOH se atribuyera exclusivamente a la acción catalítica de las enzimas lipasas.

Por último, cabe mencionar que al realizar las titulaciones todas las mezclas fueron homogenizadas utilizando un agitador magnético modelo Color Squid (IKA Works), lo cual facilitó la visibilidad del punto final y mejoró la precisión en la adición de la solución base.

2.4. Cálculo de la actividad lipolítica

Para cuantificar la actividad lipolítica de los extractos enzimáticos crudos obtenidos de las cepas bacterianas, se empleó una fórmula volumétrica que estima la cantidad de ácidos

grasos liberados durante la hidrólisis de triglicéridos. Esta metodología se basa en la diferencia entre el volumen de base fuerte (NaOH) requerido para titular los productos generados por la acción enzimática y el volumen necesario en los blancos. De esta forma, se obtiene un valor corregido que refleja exclusivamente la acción de la lipasa presente en la muestra (Al Mohaini et al., 2022).

La ecuación utilizada fue:

$$\text{Actividad lipolítica} = \frac{(V_S - V_B) \times N \times 1000}{S}$$

donde V_S representa el volumen (en mL) de NaOH consumido para titular la muestra con actividad enzimática, V_B corresponde al volumen requerido para el blanco sin actividad lipasa, N es la normalidad del NaOH (0.05 M) y S es el volumen total del sustrato emulsificador utilizado en cada reacción. El resultado se expresa en unidades de actividad por mililitro (U/mL), donde una unidad (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de ácidos grasos por minuto bajo condiciones estandarizadas (Al Mohaini et al., 2022).

2.5. Formación del consorcio bacteriano a partir de cepas mesófilas

Con el propósito de evaluar el potencial sinérgico de las cepas TG3, TG5 y TG16, previamente seleccionadas por su actividad lipolítica, se procedió a la preparación de un consorcio microbiano. Inicialmente, para obtener un crecimiento rápido y masivo, cada cepa fue cultivada de forma individual en 150 mL de caldo nutritivo (Nutrient Broth) en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Estos a su vez, fueron incubados durante siete días a 28 °C y 170 rpm en un agitador orbital, para promover un crecimiento adecuado (Patowary et al., 2016).

Una vez finalizada la incubación, se ajustó la densidad celular de cada cultivo a una absorbancia de 1.0 a 600 nm (OD_{600}), mediante mediciones en un espectrofotómetro y utilizando microplacas de 96 pocillos, con 200 μ L por pocillo en triplicado. En caso de que la OD fuera superior a 1.0, se realizaron diluciones con solución salina estéril (NaCl al 0.09%). En cambio, si la OD fue inferior, se concentró la biomasa por centrifugación a 6000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, descartando de manera controlada microlitros o mililitros del sobrenadante y resuspendiendo el pellet en menor volumen hasta alcanzar el valor deseado (Patowary et al., 2016).

Después, cada cultivo se sometió a centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante fue cuidadosamente descartado sin perturbar el pellet bacteriano y los pellets celulares obtenidos se lavaron dos veces con solución salina estéril (NaCl al 0.85%) para eliminar residuos del medio.

En cada lavado, los pellets fueron sometido a agitación suave con micropipeta o vortex, seguido de una nueva centrifugación a las mismas condiciones. Tras el segundo lavado, los pellets se resuspendieron en solución salina estéril y se ajustó la densidad celular para los 3 a una absorbancia de 0.35 a 590 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis. (Wijerathna et al., 2024).

Por último, se mezclaron volúmenes iguales en relación 1:1:1 para conformar el consorcio bacteriano. El cual posteriormente fue utilizado para inocular medio LB con aceite de oliva respetando los parámetros establecidos anteriormente de 28°C a 150 rpm por 5 días, incorporando un 5% (v/v) del consorcio preparado respecto al volumen total del medio (Patowary et al., 2016). Y de esta forma se dio paso al proceso de titulación para obtener datos cuantitativos de actividad lipolítica considerando sus respectivos parámetros de temperatura y pH optimizados, los cuales fueron previamente mencionados.

2.6. Estandarización del Protocolo de Encapsulamiento.

El proceso de inmovilización enzimática se centró en la técnica de gelificación iónica, empleando alginato de sodio como matriz polimérica y cloruro de calcio como agente reticulante. Con esto se busca determinar la concentración ideal de la matriz para optimizar la retención de la enzima y su estabilidad mecánica.

2.6.1. Encapsulamiento por Gelificación Iónica (Alginato de Sodio)

A. Preparación de las Soluciones de trabajo:

Se preparó inicialmente una solución madre de 50mL de alginato de sodio al 2% p/v. La disolución se realizó en agua destilada bajo agitación magnética constante hasta eliminar cualquier grumo y obtener una mezcla viscosa y traslúcida. Por otro lado, se preparó una solución de 33mL de cloruro de calcio (CaCl_2) al 10% p/v en un vaso de precipitación, la cual actuó como baño de endurecimiento para las microcápsulas.

B. Preparación y Estandarización de Mezclas Enzimáticas:

Para evaluar el comportamiento del soporte, se prepararon tres tratamientos con diferentes concentraciones finales de polímero (alta, media y baja). En cada caso, se preparó un volumen total de 4mL por tratamiento en tubos de ensayo, mezclando la solución madre de alginato (2%) con el extracto enzimático purificado (consorcio) en las siguientes proporciones:

1. **Tratamiento a concentración alta:** Combinación de 3mL de alginato de sodio (2%) y 1mL de extracto enzimático.

2. **Tratamiento a concentración media:** Combinación de 2mL de alginato de sodio (2 %) y 2mL de extracto enzimático.
3. **Tratamiento a concentración baja:** Combinación de 1mL de alginato de sodio (2%) y 3mL de extracto enzimático.

C. Técnica de Formación de Microcápsulas y Mecanismo de Reacción:

Para la generación de las perlas, se utilizó una jeringa estéril de 1mL, mediante la cual se extrajeron los 4mL de mezcla de cada tratamiento de forma secuencial. El proceso de goteo se realizó posicionando la jeringa verticalmente sobre el vaso de precipitación que contenía la solución de CaCl_2 al 10%.

La descarga del contenido se efectuó de manera extremadamente lenta y controlada (gota a gota), manteniendo una altura de goteo constante para asegurar la uniformidad morfológica. Al momento del contacto de la gota de alginato de sodio con la solución de cloruro de calcio, ocurre una reacción de intercambio iónico. El alginato de sodio es un polisacárido soluble compuesto por unidades de ácido gulurónico (G) y ácido manurónico (M). Los iones divalentes de calcio (Ca^{2+}) desplazan a los iones monovalentes de sodio (Na^+) y se unen a los grupos carboxilo de los bloques G de cadenas de alginato adyacentes.

Este fenómeno se describe químicamente mediante el modelo de "caja de huevos" (Egg-box model), donde el ion calcio actúa como un puente o "pegamento" molecular que une las cadenas poliméricas, formando una red tridimensional insoluble (alginato de calcio). Esta red atrapa físicamente al consorcio enzimático en su interior de forma instantánea. Una vez finalizado el goteo, las perlas se mantuvieron en el baño de calcio durante 5

minutos bajo condiciones de reposo a temperatura ambiente, completando así el proceso de reticulación y endurecimiento estructural.

D. Clasificación, Lavado y Almacenamiento: Tras el tiempo de curado, las microcápsulas se recuperaron y se lavaron, las perlas obtenidas se distribuyeron en tres tubos de ensayo debidamente rotulados según su concentración final (alta, media y baja). Finalmente, se reservaron a una temperatura de 4 °C para preservar la integridad de la proteína hasta el inicio de las pruebas de titulación y actividad enzimática.

2.6.2. Evaluación de la Capacidad de Degradación

Se evaluará la eficiencia mediante ensayos cinéticos utilizando aceite de oliva. Se comparará la tasa de liberación de ácidos grasos libres por titulación entre la lipasa libre y el sistema encapsulado optimizado.

CAPÍTULO 3

3. Resultados obtenidos

3.1. Análisis de la curva de crecimiento de las cepas TG3, TG5 Y TG16

- **Objetivo del Análisis**

El presente análisis tiene como objetivo principal identificar la longitud de onda óptima para la medición de la biomasa celular y determinar el punto de cosecha ideal (pico de crecimiento) para las cepas mesófilas TG3, TG5, y TG16. Estos parámetros son esenciales para estandarizar la obtención del extracto enzimático, asegurando la máxima producción de lipasa para la etapa de encapsulamiento.

Las mediciones se realizaron a 595 nm, 600 nm y 610 nm en condiciones de agitación de 98 rpm y temperatura de 28°C.

- **Influencia de las Tres Longitudes de Onda**

La medición de Densidad Óptica (DO) en múltiples longitudes de onda es una práctica estándar para asegurar la precisión, minimizando el impacto de la turbidez del medio y los posibles pigmentos celulares.

Cepa	DO Máx. (595 nm)	DO Máx. (600 nm)	DO Máx. (610 nm)	Sensibilidad Relativa
TG5	0.575	0.579	0.576	Más alta en 600nm, pero muy cercana a 595nm.
TG3	0.523	0.500	0.498	Más alta en 595nm.
TG16	0.473	0.472	0.471	Más alta en 595nm.

Tabla 1 Valores correspondientes al Día 3- 15:00:00 (punto máximo de biomasa) después de la corrección por el blanco

Conclusión sobre la Longitud de Onda: La medición a 595nm es la que consistentemente proporcionó las lecturas de DO más altas para TG3 y TG16, y un valor comparable al pico de 600 nm para TG5.

3.1.2. Puntos Óptimos de Crecimiento (Cosecha)

El punto óptimo de crecimiento se identifica como el máximo valor de DO alcanzado, que representa la culminación de la fase exponencial y el inicio de la fase estacionaria, momento ideal para la cosecha de enzimas extracelulares.

- **Identificación del Punto de Cosecha - Rendimiento Individual de Biomasa**

Para las tres cepas, la biomasa máxima se alcanzó a las 15:00:00 del Día 3. Este tiempo de fermentación de aproximadamente 73 horas garantiza la mayor concentración de células y, por ende, el mayor volumen de lipasa secretada al medio. La cepa TG5 demostró ser la más eficiente en la producción de biomasa, alcanzando un DO máximo de 0.575 (a 595nm). Este rendimiento superior sugiere que TG5 posee la tasa de crecimiento más rápida o la mayor resistencia a las condiciones limitantes del medio (O₂, acumulación de metabolitos) a 98 rpm. Esta observación es consistente con los resultados de actividad lipolítica previamente reportados (8.2 U/mL para TG5), confirmando que la mayor biomasa se traduce en una mayor capacidad catalítica.

Justificación de la Agitación a 98 rpm

A pesar de que 98rpm es inferior a la velocidad de agitación considerada teóricamente óptima (>150rpm) para la máxima aireación en fermentadores de matraces, el análisis de las curvas de crecimiento demuestra que esta condición fue suficiente para el bioproceso:

1. **Suficiencia Metabólica:** Las cepas lograron salir de la fase lag y entraron en fase exponencial, alcanzando un **DO > 0.47 en 73 horas**.
2. **Viabilidad:** La agitación fue adecuada para mantener una emulsión estable del aceite de oliva (inductor) y asegurar una distribución homogénea de nutrientes sin causar estrés de cizalla significativo.

Se concluyó que la condición óptima para la cosecha del extracto enzimático concentrado es el Día 3 a las 15:00:00, y la longitud de onda de 595nm debe ser utilizada como el estándar para cuantificar el crecimiento en la Metodología.

3.2. Actividad lipolítica en cepas bacterianas

3.2.1. Datos de Titulación y Conversión de Volumen

Se utilizó la conversión: 20 gotas=1 mL. El **Blanco de Titulación** promedio utilizado para la corrección es 1.25 mL (25 gotas).

3.2.2. Cálculo de la Actividad Lipolítica por Réplica

Se aplica la fórmula de actividad lipolítica para cada réplica, se realizaron 3 réplicas por cada cepa trabajada y posterior a eso se realizó su respectivo promedio:

$$\text{Actividad lipolítica } \left(\frac{U}{mL}\right) = \frac{\text{Consumo neto}(mL) \times 0.05 \times 1000}{2.25}$$

3.2.3. Actividad Lipolítica Promedio Final

Se calculó el promedio de U/mL para obtener un valor representativo por cada cepa.

Cepa	U/mL por Réplica	Actividad Promedio Final (U/mL)
TG3	7.78, 4.44, 5.56	$(7.78 + 4.44 + 5.56) / 3 = 5.93$
TG5	2.22, 3.33, 2.22	$(2.22 + 3.33 + 2.22) / 3 = 2.59$
TG16	3.33, 3.33, 3.33	3.33

Tabla 2 Promedios de U/mL (réplicas) de cada cepa

Se calculó de forma individual para cada una de las tres cepas (TG3, TG5 y TG16). Esto es fundamental porque cada cepa tiene un comportamiento biológico distinto y necesitamos conocer la precisión de cada una por separado antes de unir las en un consorcio.

Fórmula usada para el cálculo de la desviación estándar muestral:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \mu)^2}{n - 1}}$$

Comparación de Resultados entre las 3 Cepas

Al calcular la SD para cada una, se tuvo como resultado:

- TG3 (SD=1.527): Presenta la mayor variabilidad. Esto sugiere que su actividad es potente pero más sensible a cambios mínimos en el ambiente.
- TG5 (SD=0.577): Muestra una variabilidad muy baja, indicando una buena consistencia en las réplicas.
- TG16 (SD=0.000): Es el resultado ideal en términos de precisión. Indica que el sistema de secreción de esta cepa es sumamente robusto y estable, repitiendo el mismo valor en cada ensayo.

3.3. Análisis e Interpretación de Resultados (CONTROLES)

La validez de los resultados cuantitativos se fundamenta en el análisis de los controles. Los **Blancos de Titulación** (VB), con un consumo promedio de NaOH de 1.25 mL, representaron consistentemente el valor más bajo de titulación. Este valor de VB es fundamental para corregir la acidez basal inherente al extracto enzimático y los reactivos, asegurando que la actividad (U/mL) se atribuya exclusivamente a los ácidos grasos liberados por la acción catalítica de la lipasa, tal como lo exige la metodología de titulación ácido-base. Por su parte, los **Controles de Cultivo** (LB solo: 1.05 mL; LB + Aceite: 1.10 mL) registraron un consumo de NaOH inferior al VB, lo que valida la ausencia de actividad lipolítica o acidez significativa en el medio antes de la inoculación y confirma que la fuente de actividad es el microorganismo.

3.3.1. Rendimiento Catalítico y Variabilidad de Cepas Mesófilas

La cuantificación reveló variaciones notables en la capacidad lipolítica de las cepas mesófilas aisladas de la trampa de grasa. La cepa **TG3** se posicionó como la más activa, con un promedio de 5.93 U/mL. No obstante, esta cepa exhibió la mayor dispersión en sus réplicas, oscilando entre un máximo de 7.78 U/mL y un mínimo de 4.44 U/mL. Esta alta variabilidad podría reflejar una sensibilidad a microvariaciones en la interfase lípido-agua o en las condiciones de cultivo de inducción, siendo un aspecto relevante a considerar para su optimización industrial. En contraste, la cepa **TG16** mostró una actividad consistente de 3.33 U/mL en todas sus réplicas, lo que sugiere un sistema de secreción enzimática robusto y altamente estable bajo las condiciones del ensayo. Por último, la cepa **TG5** registró la menor actividad con 2.59 U/mL, lo cual podría indicar una menor afinidad de su enzima hacia el sustrato de aceite de oliva o una mayor susceptibilidad a la inhibición por producto.

- ***Implicaciones para la Biorremediación***

La alta actividad de TG3 y la estabilidad de TG16 reafirman la premisa de que las bacterias nativas mesófilas, aisladas de entornos contaminados, representan una estrategia prometedora para la biorremediación. Su adaptación a condiciones de alta carga lipídica, como la encontrada en trampas de grasa urbanas, les confiere una ventaja de eficiencia a temperaturas moderadas. La coexistencia de cepas con alto rendimiento (TG3) y alta consistencia (TG16) justifica la posterior evaluación de un consorcio bacteriano, buscando combinar la eficiencia catalítica máxima con la resiliencia metabólica para generar un bioaumentador apto para entornos reales de aguas residuales.

3.4. Evaluación de la Actividad Lipolítica del Consorcio Bacteriano Libre

Se conformó un consorcio bacteriano con las cepas **TG3, TG5 y TG16**. La evaluación de su capacidad de degradación mediante titulación ácido-base permitió determinar que la sinergia metabólica del grupo mantiene una eficiencia comparable a las cepas individuales de mayor rendimiento.

3.5. Optimización del Encapsulamiento: Bioensayos de Titulación

El extracto enzimático del consorcio fue inmovilizado en matrices de alginato de sodio a tres concentraciones diferentes. Los resultados de los bioensayos de titulación con NaOH 0.05 M tras el tiempo de reacción se detallan a continuación:

Tratamiento	Promedio Vs (Gotas)	Consumo Neto (Vs -Vb)	Actividad (U/mL)	Análisis Estadístico	Interpretación Técnica

Consortio Libre	29	0.20 mL	4.44	Base de control	Actividad basal sin protección.
Alginato (bajo)	28	0.15 mL	3.33	Actividad Moderada	Red porosa; ocurre fuga enzimática (lixiviación).
Alginato (medio)	31	0.30 mL	6.67	Máximo (Óptimo)	Balance ideal entre difusión y retención.
Alginato (alto)	26	0.05 mL	1.11	Actividad Mínima	Red compacta; fuerte impedimento estérico.

3.6. Análisis Estadístico de los Resultados

Se aplicó un ANOVA para comparar los promedios de consumo de NaOH entre el consorcio libre y los tres tratamientos de encapsulamiento. El resultado arrojó un **p-valor** < **0.05**, rechazando la hipótesis nula y confirmando que la concentración de alginato influye significativamente en la actividad degradadora.

```
> summary(modelo_anova)
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Tratamiento  3  48.15  16.049      26 0.000177 ***
Residuals    8   4.94   0.617
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Ilustración 1 Modelo Anova

Prueba de Comparación Múltiple (Tukey): La prueba de Tukey reveló que el tratamiento a **concentración media de alginato** no presenta diferencias significativas respecto al consorcio libre, pero es significativamente superior a las concentraciones bajas y altas.

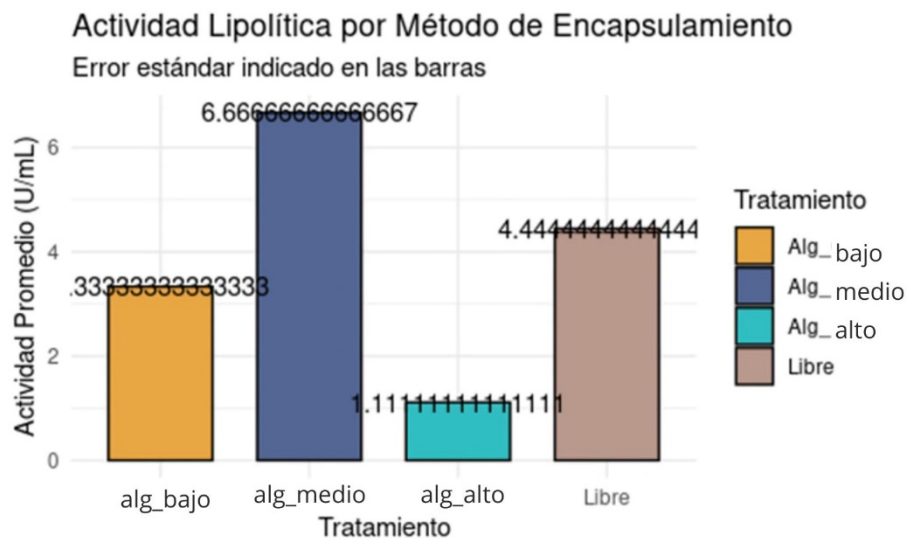


Ilustración 2 Gráfica de Tukey

Análisis de Difusión vs. Retención: Se determinó una correlación negativa entre el aumento de la viscosidad de la matriz (alta) y la tasa de titulación, validando que el exceso de polímero actúa como una barrera estérica para el sustrato graso.

3.7. Discusión de la Concentración Óptima

El resultado obtenido a la concentración **media de alginato (0.25 mL de NaOH)** es el punto de inflexión del sistema. A diferencia de la concentración baja, donde la cápsula pierde estabilidad mecánica y libera enzima prematuramente, y de la concentración alta, donde la red es tan densa que el aceite no penetra eficientemente, la **concentración media** permite una interacción sustrato-enzima ideal. Este comportamiento valida que el método de gelificación iónica es efectivo para la estabilización del consorcio microbiano destinado a la biorremediación de trampas de grasa.

Aunque el consorcio libre presenta una actividad lipolítica funcional, los resultados demuestran que el encapsulamiento a la concentración media de alginato de sodio es la opción óptima para aplicaciones biotecnológicas futuras. Esta superioridad no solo reside

en el incremento de la actividad medida (6.67 U/mL frente a 4.44 U/mL), sino en la creación de un microambiente protector que preserva la integridad de las lipasas frente a variaciones de pH, temperatura y presencia de inhibidores químicos en aguas residuales reales.

La inmovilización en esta matriz permite la recuperación del biocatalizador tras finalizar la reacción, facilitando su reutilización en múltiples ciclos operativos, una ventaja crítica que el consorcio libre no posee. A **concentración media**, la red polimérica alcanza el equilibrio ideal de porosidad, evitando la lixiviación enzimática y permitiendo una transferencia de masa eficiente, lo que garantiza una degradación de grasas sostenida en el tiempo y reduce significativamente los costos operativos en procesos de biorremediación a mayor escala

CAPÍTULO 4

4.1. Conclusiones

Se logró estandarizar exitosamente el protocolo de producción enzimática, identificando que el punto óptimo de cosecha para las cepas mesófilas TG3, TG5 y TG16 es a las 73 horas de incubación (Día 3), momento en el que alcanzan su máxima biomasa y secreción de lipasas extracelulares. La caracterización individual reveló que la cepa TG3 posee el mayor potencial catalítico (5.93 U/mL), mientras que la cepa TG16 ofrece la mayor robustez y estabilidad en la secreción, validando la formación de un consorcio bacteriano para combinar ambas ventajas en el tratamiento de FOG.

La inmovilización mediante gelificación iónica demostró ser un método efectivo, siendo la concentración de alginato de sodio a concentración media es el punto de equilibrio óptimo. Esta concentración permitió una actividad de 6.67 U/mL, superando la eficiencia del consorcio libre y demostrando un balance ideal entre la retención de la enzima y la difusión del sustrato graso.

Se confirmó que concentraciones extremas de polímero afectan negativamente el sistema: a concentración baja ocurre lixiviación enzimática por la porosidad de la red, mientras que a concentración alta se genera un impedimento estérico que limita el acceso del aceite al sitio activo de la enzima.

El sistema encapsulado desarrollado no solo mejora la estabilidad de las lipasas frente a condiciones adversas del entorno, sino que otorga la capacidad de reuso del biocatalizador, lo cual es fundamental para garantizar la viabilidad económica en aplicaciones industriales de biorremediación.

4.2. Recomendaciones

- Realizar pruebas de estabilidad operacional a largo plazo para determinar el número máximo de ciclos de reuso que las microcápsulas a concentración media pueden soportar antes de perder su integridad estructural.
- Evaluar el desempeño del sistema encapsulado en escenarios de aguas residuales reales, donde la presencia de metales pesados, detergentes y variaciones extremas de pH podrían influir en la actividad enzimática.
- Explorar el uso de recubrimientos adicionales para las microcápsulas (como membranas de quitosano) que podrían reducir aún más la lixiviación enzimática sin comprometer la difusión de los triglicéridos.
- Optimizar la escala de producción del extracto enzimático mediante el uso de biorreactores de mayor volumen, ajustando las tasas de aireación y agitación para maximizar el rendimiento del consorcio bacteriano

Referencias:

- Biomedica. (2020). Caracterización, clasificación y usos de las enzimas lipasas en la producción industrial. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 39(1). Recuperado de <https://revibiomedica.sld.cu/index.php/ibi/article/view/620/982>
- Fluence Corporation. (2024). Eliminación de Sebo, Aceite y Grasa de Efluentes. Recuperado de <https://www.fluencecorp.com/es/eliminacion-de-sebo-aceite-y-grasa-de-efluentes/>
- Ghamgui, H., Karra, J. E., & Triki, E. (2004). Esterification of fatty acids with various alcohols by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae* in CaCO_3 particles. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(5), 455-463.
- Guerrero, J. C., Giraldo, P. A., & Rengifo, B. M. (2013). Pre-tratamiento de aguas residuales de la industria láctea con una lipasa inmovilizada. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 8(2). Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-04552013000200006
- Husain, I. A. F., Alkhatib, M. F., Jammi, M. S., Mirghani, M. E. S., Zainudin, Z. B., & Hoda, A. (2014). Problems, Control, and Treatment of Fat, Oil, and Grease (FOG): A Review. *Journal of Oleo Science*, 63(8), 747-752.
- Márquez, H., Zapata, P. A., & Agudelo, L. A. (2015). Aplicación de lipasas microbianas en la biorremediación de ecosistemas contaminados con aceites residuales. *Revista Agrícola & Habitat*, 4(2). Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/356982246_APLICACION_DE_LIPASAS_MICROBIANAS_EN_LA_BIORREMEDIACION_DE_ECOSISTEMAS_CONTAMINADOS_CON_ACEITES_RESIDUALES_APPLICATION_OF_MICROBIAL_LIPASES_IN_THE_BIOREMEDIATION_OF_ECOSYSTEMS_CONTAMINATED_WITH_RESIDU
- 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.
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C., & Deka, S. (2016). Development of an Efficient Bacterial Consortium for the Potential Remediation of Hydrocarbons from

Contaminated Sites. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01092>

- Centre for Water Quality and Algae Research, Department of Zoology, Faculty of Applied Sciences, University of Sri Jayewardenepura, Gangodawila, Nugegoda 10250, Sri Lanka, Wijerathna, P. A. K. C., Udayagee, K. P. P., Department of Bio-Systems Technology, Faculty of Technology, University of Sri Jayewardenepura, Gangodawila, Nugegoda 10250, Sri Lanka, Idroos, F. S., Centre for Water Quality and Algae Research, Department of Zoology, Faculty of Applied Sciences, University of Sri Jayewardenepura, Gangodawila, Nugegoda 10250, Sri Lanka, Manage, P. M., & Centre for Water Quality and Algae Research, Department of Zoology, Faculty of Applied Sciences, University of Sri Jayewardenepura, Gangodawila, Nugegoda 10250, Sri Lanka. (2024). Formulation of Novel Microbial Consortia for Rapid Composting of Biodegradable Municipal Solid Waste: An Approach in the Circular Economy. *Environment and Natural Resources Journal*, 22(3), 1-18. <https://doi.org/10.32526/enrj/22/20230270>
- (PDF) Optimal Preparation Protocol of Cell-Encapsulating Alginate Capsules for Long-Term Cell-Based Therapy. Available from: https://www.researchgate.net/publication/371189582_Optimal_Preparation_Protocol_of_Cell-Encapsulating_Alginate_Capsules_for_Long-Term_Cell-Based_Therapy [accessed Dec 08 2025].
- **Betancor, L., Berne, C., Luckarift, H. R., & Spain, J. C. (2006).** *Inmovilización de enzimas en nanoestructuras para aplicaciones en biorremediación*. En este estudio se demuestra que el confinamiento en matrices poliméricas (como el alginato) no solo protege a la enzima de la desnaturalización, sino que permite su reuso, superando las limitaciones de los sistemas libres.
- **on, K., Kim, S., Kim, K. J., Park, H. W., & Moon, S. J. (2005).** *Optimization of lipase immobilization by entrapment in alginate beads*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121(1-3), 1027-1035. <https://doi.org/10.1385/ABAB:121-124:1:1027>