

4 Enzimas lipasas con potencialidades para la aplicación en la industria alimenticia: caso suero de leche (Lipase enzymes with potential for application in the food industry: whey case) Ernesto Rosero

Ernesto Alonso Rosero Delgado^{1, 2}, Julio Amilcar Pineda Insuasti²

¹Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador

²Centro Ecuatoriano de Biotecnología del Ambiente, Ibarra, Ecuador

Email: ernestrosdel@gmail.com

Resumen

El lactosuero una fuente rica de componentes que pueden ser convertidos en productos de valor agregado está siendo desaprovechado. La lipasa es una enzima de gran importancia en la industria química como catalizador en la obtención de varios productos. En este trabajo se investigó la potencialidad de las lipasas para hidrolizar los triglicéridos contenidos en el lactosuero, y generar glicerol. *Aspergillus niger*, un prometedor productor de enzimas lipasas. Experimentos realizados en un biorreactor nos permitieron obtener un extracto enzimático que contenía la enzima lipasa con una concentración de 8,46UI/gss. La influencia de la enzima sobre los triglicéridos del lactosuero fue determinada, obteniendo que a 40°C con un 30% de enzima se alcanza una disminución de la materia grasa del lactosuero desde 4,52 hasta 0,92 g/L con una producción de glicerol 3,056 g/L.

Palabras clave: Lactosuero, *Aspergillus niger*, lipasas, triglicéridos, glicerol.

Abstract

Whey, a rich source of components that can be converted into value-added products, is being wasted. Lipase is an enzyme of great importance in the chemical industry as a catalyst in obtaining several products. In this work we investigated the potential of lipases to hydrolyze the triglycerides contained in the whey, and generate glycerol. *Aspergillus niger*, a promising producer of lipase enzymes. Experiments performed in a bioreactor allowed us to obtain an enzyme extract containing the enzyme lipase with a concentration of 8.46UI / gss. The influence of the enzyme on the triglycerides of the whey was determined, obtaining that at 40 ° C with a 30% enzyme a decrease in the fat content of the whey is reached from 4.52 to 0.92 g / L with a production of glycerol 3,056 g / L.

Keywords: Whey, *Aspergillus niger*, lipases, triglycerides, glycerol.

Recibido: 18 de agosto de 2019

Aceptado: 18 de septiembre de 2019

Introducción

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas. Se encuentran entre las más notables de las biomoléculas conocidas debido a su extraordinaria especificidad y a su poder catalítico que son mucho mayores que las de los catalizadores hechos por el hombre (Lenhinger A., 1988).

Las enzimas que se utilizan en la industria alimentaria se pueden obtener a partir de animales, plantas o microorganismos. El 90% de las enzimas que se emplean tienen su origen en los microorganismos ya que son más económicas, y se puede obtener una gran variedad de las mismas. La inmensa mayoría de las enzimas microbianas se producen a partir de aproximadamente 25 organismos,

incluyendo una docena de hongos, pero se ha calculado que sólo aproximadamente el 2% de los microorganismos existentes en el mundo han sido estudiados como fuente de enzimas.

Las enzimas microbianas son más útiles que las derivadas de las plantas o animales por la gran variedad de actividad catalítica de que disponen, y porque usualmente pueden obtenerse en cantidades abundantes, baratas, de forma regular y de calidad uniforme. Además, las enzimas microbianas son generalmente más estables que sus homólogas de animales y vegetales, y su proceso de producción es más fácil y seguro (Cortés A., 2004).

Las lipasas o acilglicerol éster hidrolasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de grasas y aceites, dando lugar a la formación de glicerol y ácidos grasos (Malcata F., 1996). En los últimos años se ha producido un aumento vertiginoso en la utilización industrial de enzimas, dentro de las que se destacan las lipasas. De forma general la aplicación industrial de esta enzima de origen microbiológico puede ser *in situ* o *ex situ*. La primera variante implica el cultivo del microorganismo deseado en un medio que tenga el sustrato adecuado, siendo más utilizada esta técnica en la industria alimenticia y textil y en el caso del proceso *ex situ* se aplican lipasas ya purificadas, lo cual es muy utilizado para sintetizar productos en procesos de química fina (Coca J., 2002). Las lipasas presentan múltiples aplicaciones, debido a que los procedimientos químicos presentan muchas limitaciones e inconvenientes y la aplicación de tecnologías que utilizan enzimas aparece como muy prometedora para el desarrollo de nuevos tipos de grasas y aceites. Las lipasas son enzimas muy peculiares y debido a sus características presentan numerosas aplicaciones en diversas industrias, dentro de las que se encuentran la industria detergiva junto a proteasas, amilasas y celulasas para catalizar la ruptura de enlaces químicos tras la adición de agua; en la industria textil junto a las proteasas para el procesamiento del cuero; en la industria agroquímica para la elaboración de pesticidas; en los biosensores para la determinación de lípidos para análisis clínicos (Pandey A. et al., 1999). También tienen aplicaciones biomédicas por sus excelentes capacidades para catalizar reacciones regionales específicas en una gran variedad de solventes orgánicos con diferentes sustratos (Coca J., 2002); en la protección del medio ambiente pues esta enzima se puede emplear para sanear los desechos contaminados con aceites en restaurantes o plantas procesadoras de grasas y en la industria de cosméticos y perfumes pues presenta aplicación en la producción de surfactantes y aromas (Pandey A. et al., 1999).

El sustrato sobre el cual actúan las lipasas adicionadas a la leche, queso, o lactosuero es la grasa láctea (Siezen R. et al., 1994). El lactosuero, un subproducto de los procesos industriales de la leche, ofrece una buena perspectiva frente a su uso como materia prima para la obtención de biopolímeros, debido a su bajo costo de adquisición y a la gran cantidad que se genera como residuo de la industria láctea del país. Aproximadamente 90% del total de la leche utilizada en la industria quesera es descartada en forma de lactosuero, el cual retiene cerca de un 55%p/v del total de componentes de la leche, como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales (F. Carvalho, A. R. Prazeres, y J. Rivas 2013). El lactosuero residual posee una alta carga contaminante, sin embargo, presenta un buen potencial para convertirse en otros productos de valor agregado, aunque desafortunadamente no es reutilizado de manera eficiente.

El glicerol es un subproducto resultante de la fabricación de biodiesel, que se produce por una transesterificación del aceite extraído y que se encuentra en una relación másica 1kg glicerol/10 kg Biodiesel (J. A. Posada and C. A. Cardona 2012). Debido al aumento en la producción de biodiesel, la cantidad de glicerol residual también se ha aumentado provocando una disminución de su precio en el mercado, afectando la rentabilidad de las empresas productoras de biodiesel. A su vez, los bajos precios del glicerol han generado un problema medio ambiental, debido a que las industrias cosmética y farmacéutica no usan todo el glicerol producido y entonces se encuentran grandes cantidades remanentes de subproducto cuya disposición final constituye un problema para las empresas productoras (R. E. da Costa and E. E. Silva-Lora 2000). Con los datos anteriores, se concluye que es factible proponer nuevos métodos de utilización de estos residuos de bajo costo y de grandes

posibilidades de aplicación en el sector industrial, donde se podría reducir de manera eficiente la contaminación producida y minimizar los costos relacionados con la adquisición y transporte de la materia prima.

Materiales y Métodos

Adaptación de la cepa de trabajo

El microorganismo seleccionado para la obtención de la enzima lipasa fue *Aspergillus niger*, el cual fue obtenido a partir de frutos ácidos contaminados, de los cuales se replicaron por técnica de repique, en placas que contenían medio papa dextrosa agar (PDA) y agar sabourad dextrosa, obteniendo cultivos presuntivos de hongos de esta especie.

Obtención del extracto enzimático

Para el proceso de fermentación, se realizó el diseño y construcción de un biorreactor de laboratorio para fermentación líquida, basándose en relaciones de diseño establecidas por Doran, P (1995), El microorganismo fue inoculado en el biorreactor el cual contenía un medio de cultivo modificado; rico en lípidos, según lo establecido por Coca, J., y col. (2001). La composición del medio se detalla en la Tabla 1

Tabla 1. Composición del medio de cultivo rico en lípidos

COMPONENTE	CANTIDAD (g)	PORCENTAJE (%)
NaH ₂ PO ₂	12	21.60
KH ₂ PO ₄	2	3.60
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3	0.54
CaCl ₂	0.25	0.45
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	1.80
Glucosa	20	36
Aceite de Oliva	20	36

La lipasa es un enzima extracelular, que se obtiene por procesos sucesivos de purificación a partir de un extracto obtenido de un proceso fermentativo, la obtención de este extracto se la realizó con un proceso de filtración al vacío y una posterior centrifugación para eliminar las células del microorganismo (Lozano, M.P. 2011).

Aplicación del extracto enzimático

Se realizó una cinética para observar la influencia que tiene sobre la formación de ácidos grasos, el tiempo de hidrólisis. Para ello se desarrollaron hidrólisis a 20, 40, 60, 80 y 100 minutos. En cada caso se preparaban, una muestra de lactosuero sin la acción de la enzima y otra con una determinada concentración de enzima. La temperatura a la que se llevó a cabo este estudio fue 50 °C y la concentración de enzima fue de 30 %.

Métodos analíticos empleados

Determinación de la actividad enzimática

La actividad hidrolítica de los extractos enzimáticos se determinó espectrofotométricamente (espectrofotómetro WPA, modelo U1100) mediante la hidrólisis del propanoato de p-nitrofenilo (pNPP). El método consiste en medir el incremento de absorbancia a 348 nm debido a la formación de p-nitrofenol como resultado de la hidrólisis de 0,4mmol/L de pNPP en 25mmol/L de tampón de fosfato de sodio a pH=7 y 30°C (Hasan, F., Shah, A. A., y Hameed, A. 2009).

Determinación de las cantidades de ácidos grasos libres totales

Inicialmente la detección cualitativa de glicerol, se realizó mediante la metodología seguida por Ben-Amotz, A., Sussman, I., & Avron, M. (1982), el ácido sulfúrico oxida el glicerol presente en la muestra,

y utilizando carbonato férrico como indicador, la reacción inicia con un color naranja fuerte y finaliza con un verde intenso por la presencia del glicerol.

La actividad hidrolítica de la lipasa se determinó por titulación de los ácidos grasos liberados en la hidrólisis de los sustratos nativos de la enzima (triacilglicéridos). El procedimiento se realizó acorde con la metodología usada por Quispe, C. A., Coronado, C. J., y Carvalho Jr, J. A. (2013); con algunas modificaciones para la preparación del sustrato se mezclaron 40,8 mL de buffer fosfato pH 7, 100 mM, 30 mL de la muestra, 30 mL de agua destilada. Para la mezcla de reacción se utilizan 9 mL de la emulsión más 1 mL de la solución enzimática o 200 mg del soporte con la enzima inmovilizada, se dejaron reaccionar por 5 minutos a 37 °C, la reacción se detuvo añadiendo 10 mL de etanol al 95%. Los ácidos grasos liberados se titularon con KOH 0,025M utilizando como indicador fenolftaleína. Para todas las pruebas se hizo un blanco de reactivos. Para determinar la actividad relativa de las lipasas se tomó como referencia los ácidos grasos liberados, los cuales se calcularon basadas en los equivalentes de KOH usados para alcanzar el punto final de la titulación según la siguiente ecuación:

$$\frac{\mu\text{mol de ácidos grasos}}{\text{mL de la muestra} * \text{min}} = \frac{[(A - B) * 1000 * N]}{V_{rxn} * t}$$

Dónde:

A es el volumen de KOH

B es volumen de KOH gastado por blanco

N es la normalidad de KOH

t es tiempo de reacción

V_{rxn} es volumen de reacción

Resultados y Discusión

Diseño del biorreactor

El volumen de trabajo seleccionado para la construcción del biorreactor experimental, fue de 1200cm³ es decir se trabajó en una escala piloto, el material usado para la construcción fue, acero inoxidable tipo alimentario (AISI304), la cepa usada para el proceso fue obtenida en procesos previamente detallados (*A. niger*).

Los cálculos de diseño se basaron en rendimientos ($Y_{X/S}$, Y_{X/O_2}), e índices de consumo (RO_2), reportados por investigaciones previas realizadas para este microorganismo. Las características del diseño se detallan en la tabla 2

Tabla 2. Características del biorreactor de laboratorio

Característica	Valor	Unidades
Capacidad (Volumen)	1200	cm ³
Diámetro	10.8	cm
Altura	21.4	cm
Velocidad	150	rpm
Tipo Impelente	Turbina Rushton	-
Voltaje	110	V
Frecuencia	60	Hz

Aplicación del extracto enzimático

Análisis cualitativo

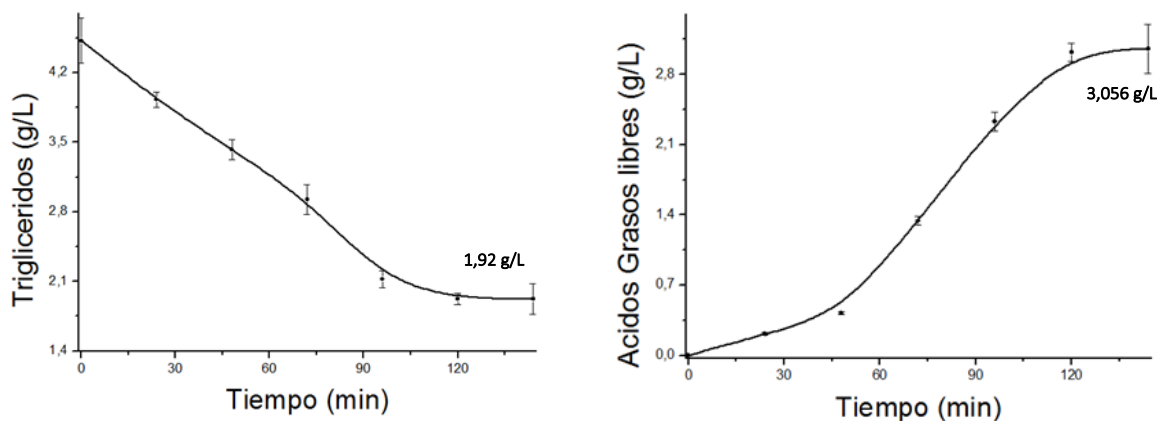


Figura 1. Determinación cualitativa de presencia de glicerol

En la determinación cualitativa se observó un cambio en la coloración de naranja a verde intenso pasados los 10 minutos, en la muestra que contenía el extracto enzimático sobre el suero de leche (B), como se determina en la figura 1. Por el contrario el blanco que contenía glicerol puro donde se puede ver el color azul verdoso intenso (A), la diferencia de color nos revela la presencia de glicerol, el cual es un producto de la reacción de la enzima lipasa presente en el extracto obtenido de la fermentación sobre los triglicéridos presentes en el lactosuero.

El análisis cuantitativo se observó que a las 24 horas de hidrólisis se obtienen 0,212 g/L, a las 48 horas se evidenció un aumento hasta 0,424 g/L, estabilizándose a las 144 horas con un valor de 3,056 g/L. En general, se observa un aumento de concentración de ácidos grasos conforme va disminuyendo la concentración de triglicéridos en el lactosuero, la cual inicio con una concentración de 4,52 g/L y finalizó con 1,92 g/L a las 144 horas, es decir se reduce el 42,54% del contenido de triglicéridos (Fig. 2).

Estos resultados indican, tal como se comprobó en el análisis cualitativo, la transformación de los lípidos en ácidos grasos mediante la hidrólisis enzimática ocasionada por la acción de las enzimas lipasas presentes en el extracto enzimático dosificado al lactosuero, esto revela que las lipasas obtenidas del microorganismo *Aspergillus niger* son una alternativa viable para la obtención de glicerol a partir de los triglicéridos del lactosuero.



A

B

Figura 2. A) Disminución de los triglicéridos contenidos en el lactosuero, B) producción de ácidos grasos debido a la hidrólisis enzimática

Diversos autores atribuyen gran importancia a la liberación de ácidos grasos libres de los triacilglicerolos, ya que los productos generados a partir de los mismos constituyen elementos importantes a nivel industrial.

Conclusiones

Debido a las grandes cantidades de queso que son producidas a nivel mundial, el suero de leche ha generado un problema de contaminación ambiental.

Estudios en animales y humanos sugieren que uno de los principales productos obtenidos a partir del lactosuero son los concentrados de proteína. Sin embargo, las concentraciones de proteína son bajas, y podrían incrementarse separando los demás componentes como la grasa y otros. El aprovechamiento de los triglicéridos del lactosuero puede traer réditos económicos debido a que el glicerol que se produce de la hidrólisis de estos lípidos puede utilizarse en la elaboración de productos secundarios o como materia prima de combustibles.

Referencias Bibliográficas

1. Lehninger, A. L. (1988). Proteins: three dimensional confirmation. *Biochemistry*, 126-135.
2. Cortés, A. (2004). Aplicación de enzimas en la producción industrial. *Tecnología, Mundo alimentario*, (Sept–Oct 2004), 20.
3. Coca J, Hernández O., Berrio R., Martínez S., Días E., Dustet J. (2001). Producción y caracterización de las lipasas de *Aspergillus niger* y *A Fumigatus*. *Biotecnología Aplicada* 18, 4, 216-220.
4. Pandey A., Benjamin S., Socco C., Krieger N. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Journal Biotechnology and Applied Biochemistry* 29, 119-131.
5. Siezen R., van den Berg G. (1994). Lipases and their action on milkfat. *Bulletin of the International Dairy Federation* 294.
6. F. Carvalho, A. R. Prazeres, and J. Rivas (2013), —Cheese whey wastewater: characterization and treatment.,|| *Sci. Total Environ.*, vol. 445–446, pp. 385–96, Feb.
7. J. A. Posada and C. A. Cardona (2012), —Propionic acid production from raw glicerol using commercial and engineered strains,|| *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 51, pp. 2354–2361.
8. R. E. da Costa and E. E. Silva-Lora (2000), —The energy balance in the production of palm oil biodiesel—Two case studies: Brazil and Colombia.
9. Coca, J., Hernández, O., Berrio, R., Martínez, S., Díaz, E., & Dustet, J. C. (2001). Producción y caracterización de las lipasas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*. *Biotecnología aplicada*, 18, 216-220.
10. Lozano Torres, M. P. (2011). Aislamiento y purificación del hongo *aspergillus niger* para la obtención de enzimas clarificadoras aplicables en biotecnología de jugos (Bachelor's thesis, Universidad del Azuay).
11. Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. *Biotechnology advances*, 27(6), 782-798.
12. Ben-Amotz, A., Sussman, I., & Avron, M. (1982). Glycerol production by *Dunaliella*. In *New Trends in Research and Utilization of Solar Energy through Biological Systems* (pp. 55-58). Birkhäuser, Basel.
13. Quispe, C. A., Coronado, C. J., & Carvalho Jr, J. A. (2013). Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and sustainable energy reviews*, 27, 475-493.