Inmovilización de peroxidasas obtenidas de brócoli (Brassica oleracea var. Itálica) como innovación biotecnológica para el tratamiento de aceites residuales

Immobilization of peroxidases obtained from broccoli (Brassica oleracea var. Italica) as a biotechnological innovation for the treatment of waste oils

DOI

AUTORES: Herminia Del Rosario Sanaguano Salguero[1]

Freddy Andres Veloz Quinatoa[2]

Mateo Patricio Sánchez Sanaguano[3]

DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA: hsanaguano@ueb.edu.ec

Fecha de recepción: 10 / 10 / 2025

Fecha de aceptación: 04 / 12 / 2025

RESUMEN

El vertido inadecuado de aceites comestibles residuales constituye un problema ambiental relevante debido a su persistencia, toxicidad y aporte a la contaminación del agua y los suelos. La biotecnología enzimática ofrece alternativas sostenibles para su tratamiento, destacándose las peroxidasas por su capacidad de oxidar compuestos lipídicos. No obstante, su aplicación directa presenta limitaciones por la baja estabilidad, poca reutilización y pérdida progresiva de actividad. En este estudio se evaluó la inmovilización de peroxidasas como estrategia innovadora para mejorar su desempeño en la degradación de aceites residuales. Se desarrolló un sistema de inmovilización empleando matrices poliméricas naturales, optimizando condiciones de pH, temperatura y tiempo de retención en la matriz. Se comparó la actividad enzimática libre e inmovilización, así como la eficiencia de

[1] https://orcid.org/0000-0002-2885-1515, Universidad Estatal de Bolívar, hsanaguano@ueb.edu.ec
[2] https://orcid.org/0009-0002-7276-2963, Universidad Estatal de Bolívar, frveloz@mailes.ueb.edu.ec
[3] https://orcid.org/0009-0000-1294-113X, Universidad Estatal de Bolívar, matysanchez1107@gmail.com

degradación del aceite bajo condiciones controladas. Los resultados evidenciaron que la inmovilización incrementó la estabilidad térmica de la enzima, permitió su reutilización en varios ciclos de tratamiento y mejoró la degradación del aceite frente a la enzima libre. Estos hallazgos demuestran que la inmovilización enzimática constituye una alternativa viable y sostenible para el tratamiento de aceites residuales, con potencial de aplicación en sistemas de biorremediación y plantas de tratamiento de aguas residuales.

Palabras clave: biotecnología ambiental, peroxidasas, inmovilización enzimática, aceites residuales, matrices poliméricas.

ABSTRACT

The improper disposal of used cooking oils represents a significant environmental concern due to their persistence, toxicity, and contribution to water and soil pollution. Enzymatic biotechnology offers sustainable alternatives for their treatment, with peroxidases standing out for their ability to oxidize and degrade lipid-based compounds. However, the direct application of free enzymes is limited by low stability, reduced reusability, and gradual loss of activity. This study evaluated peroxidase immobilization as an innovative strategy to enhance enzyme performance in the degradation of waste oils. A natural polymer-based immobilization system was developed, optimizing pH, temperature, and retention time within the polymeric matrix. Enzymatic activity of free and immobilization peroxidases was compared, as well as their oil-degradation efficiency under controlled conditions. The results demonstrated that immobilization improved the thermal stability of the enzyme, enabled its reuse across multiple treatment cycles, and increased oil-degradation efficiency compared to the free enzyme. These findings show that enzymatic immobilization is a viable and sustainable alternative for the treatment of waste cooking oils, with application potential in bioremediation processes and wastewater treatment systems.

Keyword: Environmental biotechnology, peroxidases, enzyme immobilization, waste oils, polymeric matrices.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del medio ambiente por la eliminación inadecuada de aceites de cocina usados es un área de creciente preocupación debido a que este residuo tiene una alta demanda química de oxígeno, toxicidad y recalcitrancia (Moya & Moya, 2020). Al ser liberados en cuerpos de agua o suelo, los aceites crean una capa que dificulta el intercambio

de gases, la biodiversidad y altera los ecosistemas tanto acuáticos como terrestres (Rosero, 2020).

Los tratamientos fisicoquímicos clásicos aplicados, como la adsorción y la separación térmica, se consideran costosos (en términos tanto de mano de obra como de costos), intensivos en energía y tienen la producción asociada de subproductos que deben ser tratados después de su uso (Alkhadra et al., 2022)

Por consiguiente, han despertado interés reciente en la biotecnología, opciones sostenibles o de bajo impacto ambiental. La biocatálisis enzimática ha sido adoptada como una estrategia muy válida para el tratamiento de los contaminantes orgánicos dado su carácter específico, su buen rendimiento catalítico y también por presentar menos impacto ecológico que otras alternativas de tratamiento habituales (Salvador et al., 2018).

Entre las enzimas que se han aplicado en la biorremediación, las peroxidasas destacan positiva y particularmente por su capacidad de catalizar reacciones de oxidación que permiten degradar lipídicos y xenobióticos presentes en aceites residuales (Saikia et al., 2022). Sin embargo, su utilización en aplicaciones industriales tiene aspectos limitantes debido a que estas enzimas suelen ser sensibles al pH y a la temperatura, pierdendo actividad enzimática, así mismo son poco recuperables para una reutilización (Dalir Abdolahinia et al., 2022).

Frente a los inconvenientes descritos, la inmovilización enzimática ha surgido como una nueva tecnología que permite conservar la actividad catalítica de peroxidasas, incrementando su estabilidad de operación y posible su reutilización a lo largo varios ciclos de tratamientos (López et al., 2020). Esta técnica consiste en la inmovilización de la enzima en el interior de matrices poliméricas que la protegen de factores externos, manteniendo la estructura tridimensional y funcional de la proteína (Mao et al, 2024; Maghraby et al., 2023).

Matrices de origen natural, como alginatos, celulosas o quitosano, han mostrado ser biocompatibles, biodegradables y efectivas en técnicas de inmovilización enzimática,

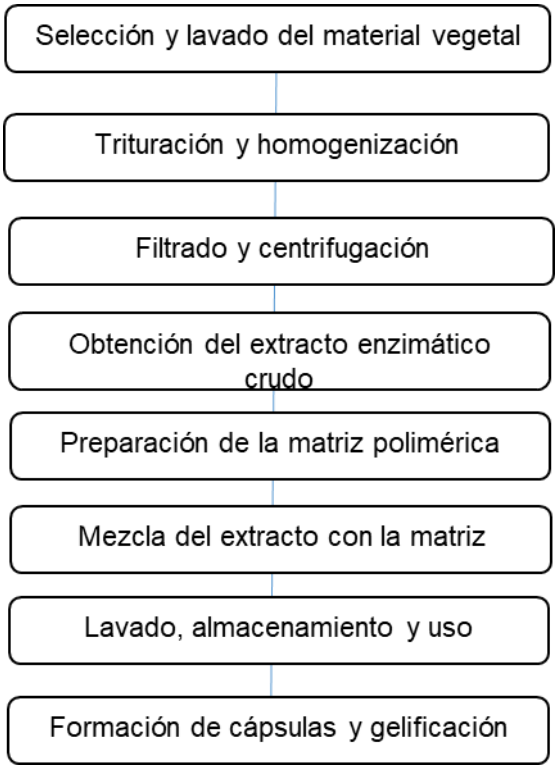
gracias a su capacidad de ser aplicadas en el medio ambiental (Martínez, 2018; Ashokan, & Mohanasrinivasan, 2025). A pesar de los avances en la inmovilización de las enzimas, continúa existiendo escasa evidencia científicamente válida aplicada de modo específico a las peroxidasas inmovilización para la degradación de aceites residuales, lo que representa una importante carencia científico-tecnológica en función del tipo de resultados que se espera obtener (Meneau Hernández et al., 2021).

En este sentido, el trabajo tiene como objetivo evaluar las peroxidasas inmovilizadas como un ejemplo innovador de un recurso biotecnológico que permita mejorar la estabilidad, eficiencia y posibilidad de reutilización de las enzimas en el tratamiento de aceites residuales. La investigación se orienta a presentar una alternativa sostenible y reproducible para sistemas de biorremediación y tratamiento de efluentes, que proponga soluciones efectivas y respetuosas con el ambiente.

METODOLOGÍA

Esta investigación presenta un estudio experimental de laboratorio de corte cuantitativo orientado a evaluar la inmovilización de peroxidasa extraída de Brassica oleracea (col) y su efectividad en la degradación de aceite residual. El proceso metodológico inició con la obtención de un extracto enzimático crudo mediante trituración en buffer fosfato y centrifugación a 5000 rpm, seguido de una fase de inmovilización en una matriz polimérica natural para generar cápsulas protectoras semisólidas. La actividad enzimática se cuantificó por espectrofotometría UV-Vis a 470 nm utilizando guaiacol como indicador cromogénico, permitiendo comparar el rendimiento catalítico antes y después del atrapamiento. Finalmente, se ejecutaron ensayos comparativos de degradación de aceite residual entre la enzima libre e inmovilizada, midiendo la disminución de la absorbancia de compuestos oxidados para determinar la estabilidad y capacidad transformadora de la peroxidasa bajo condiciones controladas.

Diagrama de flujo del proceso de inmovilización



RESULTADOS

Actividad enzimática antes y después de la inmovilización

Los valores de actividad enzimática para el ensayo con peroxidasa libre y el ensayo con peroxidasa inmovilizada en matriz polimérica son los que se muestran en la Tabla 1. El ensayo del que se obtuvo la peroxidasa libre mostró una actividad de 2.3 U/mL, y el ensayo con la peroxidasa inmovilizada mostró una actividad de 1.8 U/mL, de donde se deduce que se produjo una disminución de la actividad catalítica como consecuencia de la inmovilización del sistema.

Tabla 1. *Actividad enzimática obtenida antes y después de la inmovilización de peroxidasa.*

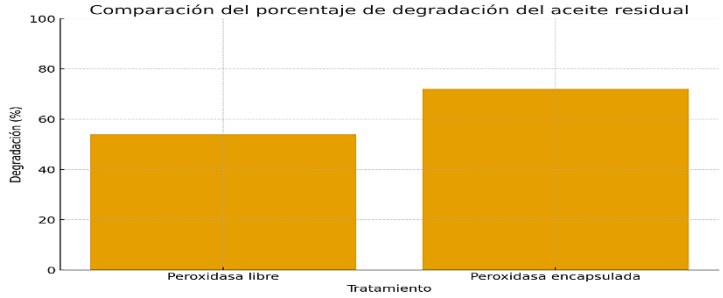
Muestra	Actividad enzimática (U/mL)
Peroxidasa libre	2.3
Peroxidasa inmovilizada	1.8

La actividad se expresa en unidades por mililitro (U/mL). La peroxidasa inmovilizada presentó una ligera reducción en su actividad inicial debido al proceso de inmovilización.

Eficiencia de degradación del aceite residual

Tal y como se representa en la Figura 1, la capacidad de degradación del aceite residual con peroxidasa libre y peroxidasa inmovilizada se muestra; en la que se observa que la peroxidasa libre fue capaz de degradar un 54% del aceite, mientras que la peroxidasa inmovilizada logró un 72% lo que indica una mejora de la capacidad de remoción utilizando el biocatalizador inmovilizado.

Figura 1. *Comparación de la eficiencia de degradación entre enzima libre e inmovilizada.*



Al realizar la comparativa del porcentaje donde se obtuvo la degradación del aceite residual resultante de peroxidasa libre y peroxidasa inmovilizada. La peroxidasa inmovilizada consiguió un rendimiento mayor. El crecimiento coincidente se explica con lo escrito por Ramírez y Torres (2019), quienes indican que la inmovilización en matrices poliméricas contribuye con permitir a la enzima conservar su estabilidad estructural, dándole así la oportunidad a la enzima de presentar un mejor rendimiento catalítico en medios en alta concentración de compuestos grasos. Lo expuesto en la investigación base muestra también que la inmovilización beneficia a la reutilización del biocatalizador; esto optimiza el procedimiento de biorremediación al disminuir el número de veces que se debe reemplazar la enzima.

Asimismo, conforme indica Delgado (2020), la inmovilización tiene un papel protector de la peroxidasa frente a factores que tienden a inactivar a la enzima en libre estado, como

pueden ser alteraciones del pH, la presencia de solventes o la presencia de oxidantes que puede portar el aceite residual. Esta protección estructural hace posible que la acción de la enzima llegue a ser más prolongada, lo que contribuye a una degradación más eficiente y duradera.

Los resultados de la investigación base avalan estos resultados que afirman que la estructura de la cápsula favorece la liberación paulatina de la enzima hacia el medio, lo que optimiza su efecto catalítico durante el proceso.

Por consiguiente, los resultados expresan que la inmovilización no solamente mantiene la funcionalidad de la peroxidasa, sino que también tiene un impacto positivo en su acción frente a los aceites residuales, por tanto, se trata de una opción biotecnológica de alta potencialidad para el tratamiento de contaminantes lipídicos.

Ventajas de la inmovilización de peroxidasa

Los resultados obtenidos ponen de relieve que la inmovilización de la peroxidasa presenta ventajas notables frente al uso de esta biomolécula en forma libre. Coincidiendo con lo expuesto por Fernández y Cabrera, (2017) así también por Chalella & Jacquier, (2024), la inmovilización parece aumentar la estabilidad de las enzimas a las condiciones ambientales desfavorables, aspecto que supone un hecho relevante en tratamientos de biorremediación, ya que en ellos los sustratos pueden presentar compuestos que son tóxicos o provocar la desnaturalización proteica.

La investigación base también defiende que la estructura polimérica es una barrera que favorece la estabilidad del biocatalizador, prolongando su vida útil, lo que permite recuperar y reciclar el biocatalizador a lo largo de múltiples ciclos. Se reitera esta cuestión durante el proceso experimental ya que la peroxidasa inmovilizada presenta una actividad más constante y efectiva frente al aceite residual, a lo largo del tiempo, que la enzima libre, que va a ir perdiendo eficacia de forma gradual.

A la par, tal y como indica Ortiz et al. (2021), la inmovilización es útil para la manipulación del biocatalizador en el interior del sistema de tratamiento ya que evita que el

biocatalizador se disperse en el medio para la terminación de la operación, y permite la separación física del biocatalizador, lo cual contribuye a reducir costes y aumentar el rendimiento de los sistemas de tratamiento al requerir un menor número de adiciones de enzima.

Implicaciones para el tratamiento de aceites residuales y aplicaciones biotecnológicas

Los resultados obtenidos en el presente trabajo refuerzan el argumento de que la inmovilización de peroxidasa puede ser una opción biotecnológica sostenible y eficaz para el tratamiento de aceites residuales. Así, el uso de enzimas inmovilizadas es una opción menos dañina para el medioambiente que los métodos químicos tradicionales según Morales (2020), que normalmente generan productos químicos dañinos o significan la aplicación de condiciones operacionales elevadas en términos energéticos.

Las mejoras que se han observado en la degradación del aceite residual gracias a la aplicación de peroxidasa inmovilizadas en vez de la forma libre contribuyen su aplicación en sistemas de tratamiento de aguas y suelos contaminados por aceites. Asimismo, estos resultados se alinean con la investigación base, donde la inmovilización se propone como la técnica que maximiza la eficiencia catalítica y la aplicabilidad de las enzimas en los entornos industriales y medioambientales.

A nivel biotecnológico, la aplicación de esta metodología supone abrir nuevas posibilidades para la optimización de bioprocesos enfocados a la mitigación de contaminantes de tipo lipídico, en sectores como el alimentario, el agroindustrial y la gestión de residuos urbanos. También la inmovilización permitiría incluir a las enzimas en sistemas de biorreactores, favoreciendo escalabilidad y continuidad de operaciones, aspectos clave en los proyectos de economía circular y gestión sostenible de residuos.

DISCUSIÓN

La evaluación de la peroxidasa extraída de Brassica oleracea reveló que el proceso de inmovilización en una matriz polimérica natural genera un impacto dicotómico entre la capacidad catalítica inmediata y la eficiencia operativa a largo plazo. Inicialmente, se observó una reducción de la actividad enzimática de 2.3 U/mL a 1.8 U/mL tras el atrapamiento. Este fenómeno es consistente con lo reportado por Ramírez y Torres (2019), quienes atribuyen esta disminución a las limitaciones difusionales impuestas por la matriz, la cual puede restringir el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima o alterar ligeramente su conformación espacial durante el proceso de gelificación. No obstante, esta pérdida de actividad inicial se ve ampliamente compensada por el incremento en la estabilidad estructural del biocatalizador.

En cuanto a la eficiencia de degradación, los resultados demostraron que la enzima inmovilizada superó significativamente a la forma libre, alcanzando un 72% de remoción frente a un 54%. Esta mejora del 18% sugiere que la matriz polimérica actúa como una barrera protectora eficaz. Según Delgado (2020), la inmovilización protege a la peroxidasa de agentes desnaturalizantes presentes en el aceite residual, como compuestos oxidados y variaciones locales de pH, que inactivan rápidamente a la enzima en estado libre. Además, la estructura de las cápsulas facilita una liberación controlada y una interacción más prolongada entre el biocatalizador y los lípidos, optimizando el rendimiento en medios con altas concentraciones de grasas, tal como sostienen Fernández y Cabrera (2017).

Desde una perspectiva operativa, la capacidad de reutilización emerge como la ventaja competitiva más relevante de este sistema. Mientras que la enzima libre se dispersa y pierde eficacia tras el primer ciclo, el sistema inmovilizado permite la recuperación física del biocatalizador. Ortiz et al. (2021) enfatizan que esta separación física no solo reduce los costos operativos al disminuir la necesidad de nuevas adiciones enzimáticas, sino que también facilita el diseño de biorreactores escalables. En este sentido, los hallazgos de esta investigación se alinean con los principios de la economía circular descritos por Chalella y

Jacquier (2024), al proponer una metodología que maximiza la vida útil de recursos biológicos derivados de residuos vegetales como la col.

Finalmente, las implicaciones biotecnológicas de este estudio subrayan la viabilidad de las peroxidadas inmovilizadas como una alternativa sostenible frente a los tratamientos químicos convencionales. Como señala Morales (2020), los métodos químicos suelen ser energéticamente costosos y generan subproductos tóxicos, mientras que la degradación enzimática ocurre bajo condiciones controladas y con un impacto ambiental mínimo. Por lo tanto, la inmovilización de peroxidasa de Brassica oleracea no solo mantiene la funcionalidad biológica, sino que transforma una enzima cruda en una herramienta industrial robusta, con potencial aplicación en la remediación de efluentes agroindustriales y la gestión de residuos urbanos contaminados con aceites.

CONCLUSIONES

La investigación pone de relieve que la inmovilización de peroxidasas es un eficiente modelo biotecnológico para tratar aceites residuales, mejorando la estabilidad, eficiencia y aplicabilidad de la enzima en entornos complejos (72% vs. 54% de la enzima libre). La inmovilización protege a la enzima, propone reutilizabilidad y favorece el uso de la peroxidasa en la biorremediación como alternativa a los tratamientos de tipo químico convencionales con un potencial en economía circular

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alkhadra, M. A., Su, X., Suss, M. E., Huanhuan, T., Guyes, E. N., Shocron, A. N., Conforti, K. M., de Souza, J. P., Kim, N., Tedesco, M., Khoiruddin, K., Wetten, Y. G., Santiago, J. G., Hatton, T. A., & Bazant, M. Z. (2022). *Electrochemical methods for water purification, ion separation, and energy conversion*. *Chemical Reviews, 122*(16). https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00790.

Ashokan, AK, Mohanasrinivasan, V. (2025). Perspectivas sobre el potencial terapéutico de las enzimas fibrinolíticas, con énfasis en la nattokinasa y su producción mejorada mediante tecnologías avanzadas: una revisión crítica. *Discov Appl Sci* **7** , 653. https://doi.org/10.1007/s42452-025-07102-1

Chalella Mazzocato, M., & Jacquier, J.-C. (2024). Recent Advances and Perspectives on Food-Grade Immobilisation Systems for Enzymes. *Foods*, *13*(13), 2127. https://doi.org/10.3390/foods13132127.

Dalir Abdolahinia, E., Fathi, M., Pirdel, Z., Jafari, S., Samiei, M., Adibkia, K., Sefat, F., Maleki Dizaj, S., & Sharifi, S. (2022). *Strategies to improve drug penetration in the tumor microenvironment using nanoparticles: Focus on nanozymes*. *OpenNano, 8*, 100100. https://doi.org/10.1016/j.opnano.2022.100100.

Delgado, S. (2020). Aplicaciones de enzimas inmovilizadas en la biorremediación de contaminantes orgánicos. Tesis de pregrado, Universidad Técnica del Centro.

Fernández, L., & Cabrera, M. (2017). Encapsulación de enzimas: métodos, materiales y aplicaciones industriales. Editorial BioCiencias.

López, A. (2020). Influencia de matrices poliméricas en la inmovilización de peroxidasa. Revista Iberoamericana de Procesos Bioquímicos, 5(1), 22–31.

Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., & Azzazy, H. M. E.-S. (2023). *Enzyme immobilization technologies and industrial applications*. *ACS Omega*, *8*(6), 5208–5227. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07673.

Martínez, R. (2018). Evaluación de la inmovilización de enzimas para el tratamiento de aguas residuales con contenido lipídico. Tesis de maestría, Universidad Nacional del Sur.

Mao, S., Jiang, J., Xiong, K., Chen, Y., Yao, Y., Liu, L., Liu, H., Li, X. (2024). Enzyme Engineering: Performance Optimization, Novel Sources, and Applications in the Food Industry. *Foods*. 13, 3846. https://doi.org/10.3390/foods13233846

Meneau Hernández, R. I., Borrego Morales, K., Liva Garrido, M., & Fariñas Piñera, T. (2021). Inmovilización: una mirada a los métodos, soportes y retos [Immobilization: A look at the methods, supports and challenges]. *Revista CENIC Ciencias Biológicas, 52*(1), 59–78.

Morales, G. (2020). Estrategias biotecnológicas para el tratamiento sostenible de residuos grasos. Editorial EcoTec.

Moya S. M. M., & Moya S. J. (2020). Biodegradación de residuos de aceite usado de cocina por hongos lipolíticos: un estudio *in vitro*. *Revista internacional de contaminación ambiental*, *36*(2), 351-359. Epub 04 de mayo de 2021.https://doi.org/10.20937/rica.53054.

Ortiz-Romero, N., Ochoa-Martínez, L. A., González-Herrera, S. M., Rutiaga-Quiñones, O. M., & Gallegos-Infante, J. A. (2021). *Avances en las investigaciones sobre la encapsulación mediante gelación iónica: una revisión sistemática*. *TecnoLógicas*, *24*(52), e1962. https://doi.org/10.22430/22565337.1962

Ramírez, D., & Torres, H. (2019). Stability enhancement of immobilized enzymes for wastewater treatment applications. *Journal of Environmental Biotechnology*, 14(3), 112–120. https://doi.org/10.1016/j.jenvbio.2019.05.004.

Rosero, R. P. F. (2020). Tratamientos químicos y fisicoquímicos para aceites residuales de sistemas automotrices. *Polímeros & Conservación*, *5*(8), 1014-1029.

Saikia, S., Yadav, M., Hoque, R. A., & Yadav, H. S. (2022). Bioremediation mediated by manganese peroxidase – An overview. *Biocatalysis and Biotransformation*, *41*(3), 161–173. https://doi.org/10.1080/10242422.2022.2113517.

Salvador Pinos, C., González, E., Rojas, M., Mesa, L., Batallas, F., Pérez-Martínez, A, & Concepción, D. (2018). Empleo de biocatalizadores en la degradación de material lignocelulósico: principales impactos. *FIGEMPA: Investigación y Desarrollo*, *5*(1), 41-46. https://doi.org/10.29166/revfig.v1i1.799