



Pre-tratamiento de aguas residuales de la industria láctea con una lipasa inmovilizada*

Gloria Inés Giraldo Gómez**, Margarita Díaz Ramos***

Pre-treatment of waste water from dairy industries by the use of an immobilized lipase

Pré-tratamento de águas residuais da indústria láctea com uma lipase imobilizada

RESUMEN

Introducción. Las aguas residuales de las industrias lácteas contienen altos niveles de grasa; esta, debido a su baja velocidad de degradación, dificulta el tratamiento biológico y causa problemas operacionales. **Objetivo.** Evaluar la eficiencia de la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en una organobentonita en el pre-tratamiento de las aguas residuales de la industria láctea. **Materiales y métodos.** Se utilizó una lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada sobre una organobentonita para hidrolizar las grasas presentes en una muestra de agua residual proveniente del proceso de elaboración de quesos. La constante de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad de reacción máxima (V_{max}) se obtuvieron por regresión no lineal. Se determinó el grado de reducción del contenido de grasas totales y demanda química de oxígeno (DQO) como resultado del pre-tratamiento enzimático. Finalmente, se evaluó la estabilidad operacional del sistema biocatalítico mediante la reutilización de la enzima inmovilizada en 3 ciclos de reacción. **Resultados.** Los valores de K_m fueron $421,71 \pm 40,54$ y $1513,79 \pm 239,03$ ppm, mientras que los valores de V_{max} fueron $10,74 \pm 1,03$ y $0,30 \pm 0,05$ $\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min}$ para la enzima libre e inmovilizada, respectivamente. Se logró una reducción del 70 % en el contenido de las grasas totales y 19,20 %

* Artículo derivado del proyecto de investigación "Inmovilización de dos lipasas para su aplicación en el Pre-tratamiento de aguas residuales de la industria Láctea", desarrollado por el Grupo de Trabajo Académico Alimentos frutales y financiado por la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, entre los años 2011 y 2012. ** Administradora de Empresas, Tecnóloga Química, Especialista en Administración y Evaluación de Proyectos Agropecuarios y Agroindustriales, Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Doctora en Ciencias Químicas. Docente del Departamento de Física y Química de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, Colombia. E-mail: ggiraldogo@unal.edu.co. ***Ingeniera Química, magister en Ingeniería Química. Integrante del Grupo de Trabajo Académico, Alimentos Frutales. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, Colombia. E-mail: margaritadiazramos@gmail.com

en la DQO después de la hidrólisis enzimática. Por último, la reducción en el contenido de grasas se mantuvo cercana a 67 % después de 3 ciclos de reacción usando la lipasa inmovilizada. **Conclusiones.** Los resultados obtenidos mostraron el potencial del uso de lipasas inmovilizadas para el pre-tratamiento de aguas residuales con alto contenido de grasas.

Palabras clave: lipasa inmovilizada, hidrólisis, grasas, aguas residuales

ABSTRACT

Introduction. Waste water from dairy industries has a high fat content. This fat, due to its slow degradation, makes its biological treatment difficult and brings operational problems. **Objective.** To evaluate the efficiency of an immobilized lipase from *Candida rugosa* in an organoclay, for the treatment of waste waters from a dairy industry. **Materials and methods.** An immobilized lipase from *Candida rugosa* was used to hydrolyze the fat contained in a sample of waste water from the process of making cheese. The Michaelis-Menten (K_m) constant and the maximum reaction speed (V_{max}) were obtained through nonlinear regression. The level of total fat content reduction and the chemical oxygen demand (COD) were determined as results of the enzymatic pre-treatment. Finally, the operational stability of the bio catalytic system was evaluated by the re-use of the immobilized enzyme in three reaction cycles. **Results.** K_m values were $421,71 \pm 40,54$ and $1513,79 \pm 239,03$ ppm, while V_{max} were $10,74 \pm 1,03$ and $0,30 \pm 0,05$ $\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min}$ for the free and the immobilized enzyme, respectively. A 70% reduction of total fat and 19,20% of the COD were obtained after the enzymatic hydrolysis. The fat reduction remained close to 67% after three reaction cycles using the immobilized lipase. **Conclusion.** The results obtained demonstrated the potential of using immobilized lipases in the pre-treatment of waste water with a high fat content.

Key words: immobilized lipase, hydrolysis, fat, waste waters.

RESUMO

Introdução. As águas residuais das indústrias lácteas contêm altos níveis de gordura; esta, devido a sua baixa velocidade de degradação, dificulta o tratamento biológico e causa problemas operacionais. **Objetivo.** Avaliar a eficiência da lipase de *Candida rugosa* imobilizada numa organobentonita no pré-tratamento das águas residuais da indústria láctea. **Materiais e métodos.** Utilizou-se uma lipase de *Candida rugosa* imobilizada sobre uma organobentonita para hidrolisar as gorduras presentes numa mostra de água residual proveniente do processo de elaboração de queijos. A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade de reação máxima (V_{max}) obtiveram-se por regressão não linear. Determinou-se o grau de redução do conteúdo de gorduras totais e demanda química de oxigênio (DQO) como resultado do pré-tratamento enzimático. Finalmente, avaliou-se a estabilidade operacional do sistema biocatalítico mediante a reutilização da enzima imobilizada em 3 ciclos de reação. **Resultados.** Os valores de K_m foram $421,71 \pm 40,54$ e $1513,79 \pm 239,03$ ppm, enquanto os valores de V_{max} foram $10,74 \pm 1,03$ e $0,30 \pm 0,05$ $\mu\text{mol/ML} \cdot \text{min}$ para a enzima livre e imobilizada, respectivamente. Conseguiu-se uma redução do 70 % no conteúdo das gorduras totais e 19,20 % na DQO depois da hidrólise enzimática. Por último, a redução no conteúdo de gorduras se manteve próxima a 67 % depois de 3 ciclos de reação usando a lipase imobilizada. **Conclusão.** Os resultados obtidos mostraram o potencial do uso de lipases imobilizadas para o pré-tratamento de águas residuais com alto conteúdo de gorduras.

Palavras importantes: lipase imobilizada, hidrólise, gorduras, águas residuais.

INTRODUCCIÓN

Las aguas residuales de las industrias lácteas contienen altos niveles de grasa, la cual, debido a su baja velocidad de degradación, dificulta el tratamiento biológico y causa problemas operacionales como pérdida de eficiencia, colapso del reactor debido a la formación de espuma que causa la flotación de

biomasa granular; formación de capas de grasa en la superficie del reactor, las cuales no se digieren; obstrucciones y malos olores debido a la solidificación de las grasas a bajas temperaturas, entre otros (Camarota & Freire, 2006; Vidal, Carvalho, Méndez & Lema, 2000). Estos problemas se pueden solucionar con un pre-tratamiento en donde se hidrolicen las grasas antes del tratamiento biológico.

Los métodos convencionales para retirar las grasas antes de la biodigestión, tales como trampas de grasa, filtración con membranas, coagulación, adsorción en carbón activado y tratamientos físico-químicos, tienen desventajas como la necesidad de reactivos de alto costo, baja eficiencia de remoción, producción de lodos extremadamente problemáticos, etc. El tratamiento con enzimas se propone como una alternativa rentable, limpia y amigable con el ambiente, comparado con los métodos convencionales (Jeganathan, Bassi & Nakhla, 2006a; Aguilar, Benedito, Furigo & Ferreira, 2010; Masse, Kennedy & Chou, 2001). Se han utilizado varias lipasas para el tratamiento de diferentes clases de aguas residuales como las de la industria láctea, domésticas y de centrales de sacrificio, aumentando la biodegradabilidad de estas aguas (Rosa, Duarte, Saavedra, et al., 2009; Mendes, Pereira & Ferreira, 2006; Gracia, Guimarães & Cammarota, 2007; Rigo, Rigoni, Lodea; et al., 2008).

El tratamiento de efluentes con altos contenidos de grasas es una aplicación poco explorada para las lipasas; estas enzimas poseen la capacidad de catalizar la hidrólisis de grasas (triglicéridos); sin embargo, existen algunos inconvenientes como lo son la solubilidad, la inestabilidad y el alto costo. Por otro lado, solo pueden ser utilizadas una vez, lo que significa un problema económico por pérdida de la actividad enzimática. Para solucionar estos inconvenientes, la inmovilización de enzimas en un soporte insoluble se convierte en una opción para la recuperación y posterior reúso de la enzima, aprovechando al máximo su actividad residual; además, se mejora la estabilidad operacional y térmica de la enzima (Balcão, Paiva & Malcata, 1996; Mateo, Palomo, Fernandez; et al., 2007). En la actualidad son escasos los estudios de la hidrólisis de grasas contenidas en aguas residuales utilizando lipasas inmovilizadas; en ellos se evidencia un aumento en su biodegradabilidad a causa del pre-tratamiento (Jeganathan et al., 2006a; Jeganathan, Nakhla & Bassi, 2007a; Jeganathan, Nakhla & Bassi, 2007b; Dumore & Mukhopadhyay, 2012).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en una organobentonita en el pre-tratamiento de las aguas residuales de la industria láctea. Para lograr el objetivo fue necesario determinar los parámetros cinéticos de la reacción de hidrólisis en una muestra de agua residual proveniente del proceso de elaboración de quesos. Adicionalmente, se determinó el grado de reducción del contenido de grasas totales y demanda química de oxígeno (DQO) como resultado del pre-tratamiento enzimático de 19 h. Finalmente, se evaluó la estabilidad operacional del sistema biocatalítico mediante la reutilización de la enzima inmovilizada en 3 ciclos de reacción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Lipasa de *Candida rugosa* (Tipo VII), suministrada por Sigma Chemical Co., inmovilizada en una bentonita modificada con la sal, cloruro de benciltrietilamonio (BTEAC), según el procedimiento descrito por Díaz (2012), con un porcentaje de inmovilización del 48 % y una actividad de 177,80 U / g soporte. Donde una unidad de actividad de la lipasa inmovilizada (U) se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de ácido graso libre por minuto bajo las condiciones de ensayo. La lipasa inmovilizada será nombrada como CRL/BTEA-Bent.

Otros reactivos necesarios fueron suministrados por Merck y otras casas comerciales reconocidas.

Se utilizó como sustrato una muestra de agua residual de la elaboración de quesos, la cual se caracterizó midiendo el contenido de grasas totales y la DQO; estos análisis se realizaron según APHA et al., (1998).

Estimación de los parámetros cinéticos para la hidrólisis de grasas en un agua residual

Se calcularon los parámetros cinéticos aparentes para la hidrólisis de grasas en la muestra de agua residual, para la lipasa libre e inmovilizada, debido a la imposibilidad de eliminar completamente las restricciones de difusión intrapartícula. Para determinar la relación entre la concentración del sustrato y la velocidad de reacción enzimática se aplicó la ecuación de *Michaelis-Menten*. Ecuación (1)

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde v y V_{max} son la velocidad y velocidad máxima de reacción respectivamente ($\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$), $[S]$ es la concentración del sustrato (ppm) y K_m es la constante de *Michaelis-Menten* (ppm). Los valores de V_{max} y K_m se obtienen ajustando los datos a la ecuación (1) por regresión no lineal, para lo cual se utilizó el software ORIGIN® V.7.03837.0

Se prepararon muestras con concentraciones de grasas entre 200 y 1520 ppm, a las cuales se les ajustó el pH a 7 con una solución de NaOH. Se tomaron 5 mL y se precalentaron a 37 °C durante 5 min; luego se añadieron 0,25 mL de la solución de lipasa (10 mg/mL en buffer fosfato pH 7) o 0,25 g de enzima inmovilizada. La reacción se llevó a cabo a 37 °C y se detuvo con 10 mL de etanol concentrado (95 % v/v). Los ácidos grasos se determinaron por titulación con KOH 0,025M y con fenolftaleína como indicador. Se calculó la concentración de ácidos para diferentes tiempos de reacción (3, 6 y 10 min) de acuerdo con la ecuación (2). Para asegurarnos de que la hidrólisis es en su totalidad debida a la actividad enzimática de la lipasa se realizó un blanco con una muestra sin tratamiento enzimático.

$$\frac{\mu\text{mol de ácidos grasos}}{\text{ml muestra}} = \frac{(A - B) * 1000 * M}{V_{rxn}} \quad \text{Ecuación (2)}$$

Donde A es el volumen de KOH gastado por la muestra, B es el volumen de KOH gastado por el blanco, M es la molaridad del KOH y V_{rxn} es el volumen del medio de reacción en mL.

La velocidad inicial de reacción (v) se determinó a partir de la pendiente de la gráfica de concentración de ácidos grasos liberados frente al tiempo de reacción, en el rango lineal.

Efecto del pre-tratamiento enzimático en la reducción del contenido de grasas presentes en aguas residuales

Para evaluar el efecto del pre-tratamiento enzimático en la reducción del contenido de grasas se tomaron 75 mL de la muestra de agua residual a la cual se le ajustó el pH a 7 y se dejó durante 19 h a 45 °C en contacto con 0,90 g de la lipasa inmovilizada. Se midió el contenido de grasas y la DQO al inicio y final del tratamiento.

La estabilidad operacional del sistema biocatalítico se evaluó repitiendo el tratamiento enzimático dos veces con sustrato fresco. Después de cada ciclo de reacción, se midió el contenido de grasas; el soporte con la lipasa inmovilizada se recuperó por centrifugación a 500 rpm, se lavó con agua desti-

lada y se almacenó durante una semana a 4 °C para su posterior uso. Para asegurar que la hidrólisis es en su totalidad debida a la actividad enzimática de la lipasa, se realizó un blanco con una muestra sin tratamiento enzimático.

Todos los ensayos se hicieron por duplicado, los resultados corresponden al promedio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestra de agua residual

La muestra de agua residual que se utilizó para todos los ensayos tenía como características iniciales, pH 6,80, concentración de grasas totales 1521 ppm y DQO 68196,70 mg/L

Estimación de las constantes cinéticas

Los resultados de velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones de la enzima libre e inmovilizada, CRL/BTEA-Bent, son presentados en la tabla I.

Tabla I. Velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones de sustrato

Enzima libre		CRL/BTEA-Bent	
[S] ppm	v $\mu\text{mol/mL min}$	[S] ppm	v $\mu\text{mol/mL min}$
200	3,810	320	0,059
400	5,000	640	0,089
600	6,071	960	0,109
800	6,905	1280	0,138
1000	7,857	1520	0,155

Del ajuste de los datos a la ecuación (1) se estableció que el comportamiento puede ser modelado por la ecuación de *Michaelis-Menten* y se determinaron las constantes de *Michaelis-Menten*, $V_{\max}$ y K_m para la lipasa de *Candida rugosa* libre e inmovilizada en la reacción de hidrólisis de grasas de la muestra de agua residual.

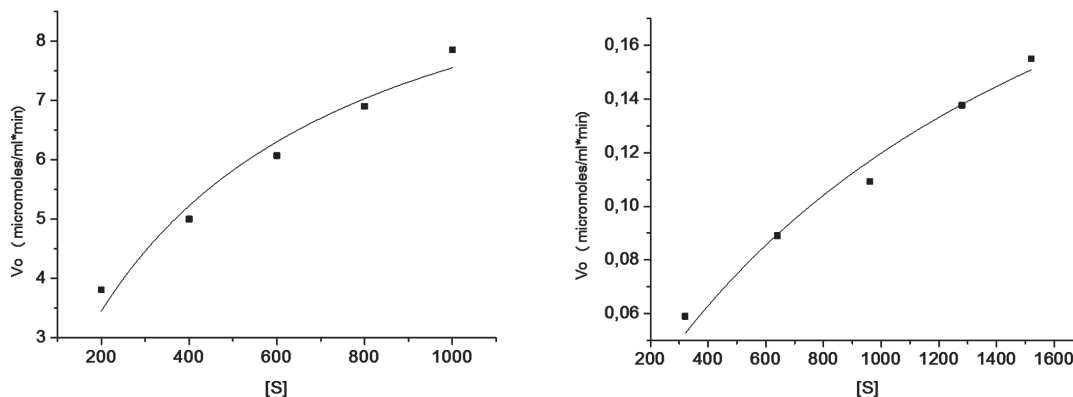


Figura 1. Gráfico de velocidad inicial contra concentración de sustrato para a) la lipasa libre b) inmovilizada (CRL/BTEA-Bent).

En la figura 1 se presentan los datos experimentales y la curva de ajuste de los datos al modelo, el R^2 para la lipasa libre fue de 0,996 y para la lipasa inmovilizada de 0,979.

El valor de K_m para la enzima inmovilizada ($K_m = 1513,79 \pm 239,03$) resultó aproximadamente 4 veces mayor que el valor para la enzima libre ($K_m = 421,71 \pm 40,54$ ppm), un incremento similar al obtenido por Jeganathan et al., (2007b), donde la lipasa de *Candida rugosa* fue inmovilizada en un híbrido alginato de calcio/sol-gel y se utilizó como sustrato un agua residual de una industria de alimento para mascotas. Para ese estudio el valor de K_m para la enzima inmovilizada fue 6 veces mayor que el de la enzima libre, aunque los valores de V_{max} fueron similares para la enzima libre e inmovilizada. El incremento en el valor de K_m indica la afectación que el soporte tuvo sobre la afinidad de la lipasa, probablemente por el impedimento estérico del sitio activo por el soporte, la pérdida de flexibilidad de la enzima necesaria para unirse al sustrato o la resistencia difusional para el transporte de solutos cerca de las partículas (Ghiaci, Aghaei, Soleimani & Sedagha, 2009). La velocidad máxima fue $10,74 \pm 1,03$ μmol y $0,30 \pm 0,05$ $\mu\text{mol/mg} \cdot \text{min}$ para la enzima libre e inmovilizada, respectivamente; la reducción en la V_{max} sugiere un posible bloqueo o daño del sitio activo de la enzima debido a la formación de agregados de la enzima o desnaturalización de la estructura terciaria de la lipasa por el proceso de inmovilización.

Hidrólisis enzimática del agua residual

Después del tratamiento enzimático se logró una remoción de las grasas y de la DQO del 70 % y 19,20 %, respectivamente. En los resultados con el blanco no se obtuvo una disminución de la grasa, pero sí un incremento en la DQO del 14,5 %. Estos resultados son comparables con los obtenidos por otros autores que han trabajado en el pre-tratamiento de esta clase de aguas residuales con lipasas inmovilizadas. Los resultados de Jeganathan et al., (2006a) mostraron que se redujeron entre un 40 y 60 % las grasas durante 3 días de tratamiento con la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en alginato de calcio. Estos mismos autores en otro trabajo obtuvieron una reducción de las grasas entre el 48 y 32 %, en un agua residual de una industria de alimentos para mascotas utilizando la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en un híbrido alginato de calcio/sol-gel Jeganathan, Nakhla & Bassi, 2007b; Jeganathan, Nakhla & Bassi, 2006b). Ninguno de estos trabajos mostró reducción apreciable de la DQO después del pre-tratamiento, debido a la generación de ácidos grasos de cadenas largas y ácidos grasos volátiles, los cuales son productos solubles, lo que aumenta la DQO soluble y no induce a un cambio apreciable en el valor de la DQO total, pero es un factor favorable para el tratamiento biológico posterior, pues aumenta la biodegradabilidad del agua residual, reduciendo, posteriormente en el tratamiento anaerobio, la DQO total y las grasas en 65 y 64 %, respectivamente.

Dumore y Mukhopadhyay (2012) utilizaron una lipasa de *Aspergillus niger* inmovilizada en quitosano, y obtuvieron una reducción en la concentración de las grasas y la DQO del 48 y 47 %, respectivamente, después de 3 días de hidrólisis enzimática.

También se ha reportado la reducción de la DBO_5 (demanda bioquímica de oxígeno) y el contenido de grasas después del tratamiento con lipasas de aguas residuales con alta concentración de grasas. Cammarota, Teixeira, & Freire, (2001) realizaron el pre-tratamiento de un agua residual proveniente de una industria láctea con alto contenido de grasas (868 mg/L) utilizando una preparación enzimática, la cual parcialmente degradó las grasas del agua residual, causó un decrecimiento en el tiempo de retención en el reactor biológico y redujo los problemas operacionales que causan las grasas. El reactor UASB (del inglés Upflow Anaerobic Sludge Blanket) tuvo una mayor remoción de la DQO cuando el afluente fue pre-tratado con el complejo enzimático, que cuando no se trató. La materia orgánica, como las grasas, tiene una baja velocidad de degradación en un tratamiento biológico, por lo que la digestión de estos compuestos es la etapa limitante del proceso haciendo que el tiempo de tratamiento aumente considerablemente (Fernández, 2008). Estos resultados sugieren que un sistema biocatalítico con enzimas inmovilizadas es un mecanismo apropiado para un pre-tratamiento de aguas

residuales con alto contenido de grasas, ya que con este tipo de sistemas es posible una reducción considerable de las grasas totales y aumentar su biodegradabilidad.

Estabilidad operacional de la lipasa inmovilizada

Los resultados de reducción del contenido de grasas en la muestra de agua residual después de 3 ciclos de reacción se muestran en la figura 2. Estos resultados fueron similares (contenido de grasas totales final ≈ 457 ppm) lo que significa una reducción promedio de aproximadamente el 67 % en el contenido de grasas de la muestra de agua residual por el tratamiento enzimático.

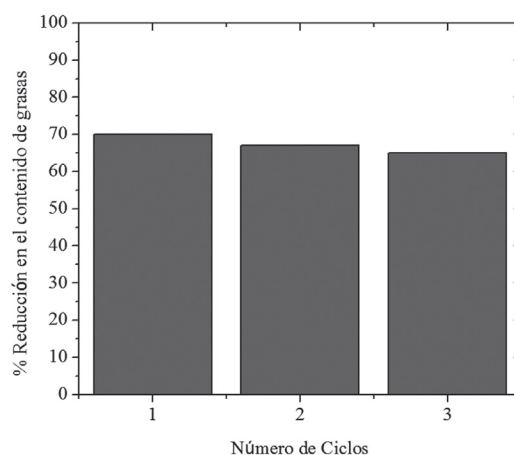


Figura 2. Reúso de la lipasa inmovilizada en la hidrólisis de grasas del agua residual proveniente de la elaboración de quesos

La enzima inmovilizada preservó su actividad durante el almacenamiento a 4 °C por una semana, entre cada uno de los 3 ciclos de reacción, exhibiendo una excelente estabilidad operacional. La estabilidad operacional del biocatalizador utilizado en este trabajo fue comparable con otros sistemas biocatalíticos investigados. En el trabajo de Dong, Li, Hu & Luo (2012), la lipasa inmovilizada en una organobentonita retuvo el 82,50 % de la actividad hidrolítica inicial después de 6 ciclos de reacción. Jeganathan et al. (2006a) utilizaron una lipasa de *Candida rugosa* para hidrólisis de grasas y esta pudo ser utilizada por 4 ciclos de reacción con una retención de la actividad del 55 %.

CONCLUSIONES

La remoción de grasas y DQO de una muestra de agua residual con alto contenido de grasas, procedente de la elaboración de quesos, utilizando la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en bentonita modificada fue del 70 % y 19,20 % respectivamente, lo cual sugiere que el sistema biocatalítico desarrollado en este trabajo es efectivo para ser utilizado en el pre-tratamiento de este tipo de aguas residuales, pues se obtiene una reducción considerable de las grasas y, además, facilita la biodegradación de los lípidos debido a la conversión de la materia orgánica en componentes de bajo peso molecular en un tratamiento biológico posterior.

La lipasa inmovilizada se almacenó a 4 °C y se reutilizó 2 veces más, removiendo en promedio el 67 % de las grasas en cada ciclo, lo que hace al sistema biocatalítico potencialmente rentable y funcional

como aplicación en el pre-tratamiento de aguas residuales. El reúso del biocatalizador contribuye para su empleo a gran escala.

Entre los métodos convencionales para retirar las grasas antes de la biodigestión de las aguas residuales, el tratamiento con enzimas inmovilizadas se propone como una alternativa limpia y amigable con el ambiente, ya que se alcanzan remociones considerables del contenido de grasas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen por el soporte financiero ofrecido a la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales (DIMA) - Apoyo a tesis de posgrados 2011, Coordinación de la Maestría en Ingeniería-Ingeniería Química y a la Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, A.; Benedito, E.; Furigo, A. & Ferreira de Castro, H. (2010). Anaerobic Biodegradability of Dairy Wastewater Pretreated with Porcine Pancreas Lipase. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(6), 1279–1284.
- APHA, ASCE, WEF. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. APHA.
- Balcão, V.; Paiva, A. & Malcata, F. (1996). Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 392–416.
- Camarota, M. & Freire, D. (2006). A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresource Technology*, 97, 2195–2210.
- Camarota, M.; Teixeira, G. A. & Freire, D. M. (2001). Enzymatic pre-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents. *Biotechnology Letters*, 23, 1591–1595.
- Díaz, M. (2012). *Inmovilización de dos lipasas para su aplicación en el pre-tratamiento de aguas residuales de la industria láctea*. Tesis de Maestría. Manizales: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería y Arquitectura, 85 p.
- Dong, H.; Li, J.; Li, Y.; Hu, L. & Luo, D. (2012). Improvement of catalytic activity and stability of lipase by immobilization on organobentonite. *Chemical Engineering Journal*, 181–182, p. 590–596.
- Dumore, N. & Mukhopadhyay, M. (2012). Removal of oil and grease using immobilized triacylglycerin lipase. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 68, 65–70.
- Fernández Guelfo, L. A. (2008). *Caracterización cinética de la degradación anaerobia termofílica seca de la forsu. efecto de diferentes pretratamientos sobre la biodegradabilidad del residuo*. Tesis Doctoral. Cádiz: Universidad de Cádiz. Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente.
- Ghiaci, M.; Aghaei, H.; Soleimani, S. & Sedagha, M. (2009). Enzyme immobilization Part I. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Applied Clay Science*, 43, 289–295.
- Gracia Valladão, A.; Guimarães Freire, D. & Cammarota, M. (2007). Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60, 219–225.

- Jeganathan, J.; Bassi, A. & Nakhla, G. (2006a). Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation. *Journal of Hazardous Materials*, 137, 121–8.
- Jeganathan, J.; Nakhla, G. & Bassi, A. (2006b). Long-term performance of high-rate anaerobic reactors for the treatment of oily wastewater. *Environmental Science & Technology*, 40(20), 6466–72.
- Jeganathan, J.; Nakhla, G. & Bassi, A. (2007a). Oily wastewater treatment using a novel hybrid PBR-UASB system. *Chemosphere*, 67, 1492–501.
- Jeganathan, J.; Nakhla, G. & Bassi, A. (2007b). Hydrolytic pretreatment of oily wastewater by immobilized lipase. *Journal of Hazardous Materials*, 145, 127–35.
- Masse, L.; Kennedy, K. & Chou, S. (2001). Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. *Bioresource Technology*, 77(2), 145–55.
- Mateo, C.; Palomo, J.; Fernandez-Lorente, G., et al. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1451–1463.
- Mendes, A.; Pereira, E. & Ferreira de Castro, H. (2006). Effect of the enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on the anaerobic biodigestion. *Biochemical Engineering Journal*, 32, 185–190.
- Rigo, E.; Rigoni, R. E.; Lodea, P.; et al. (2008). Comparison of Two Lipases in the Hydrolysis of Oil and Grease in Wastewater of the Swine Meat Industry. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47, 1760–1765.
- Rosa, D.; Duarte, I.; Saavedra, N.; et al. (2009). Performance and molecular evaluation of an anaerobic system with suspended biomass for treating wastewater with high fat content after enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 100, 6170–6.
- Vidal, G.; Carvalho, A.; Méndez, R. & Lema, J. (2000). Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. *Bioresource Technology*, 74, 231–239.