



**Evaluación de la actividad enzimática de la lacasa recombinante POXA 1B  
expresada en *Pichia pastoris* usando residuos de crisantemo**

**Presentado por: Nathalie Andrea Moreno Zabala**

**Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias  
Carrera de Microbiología Industrial  
Bogotá D.C.  
Junio 2015**

**Evaluación de la actividad enzimática de la lacasa recombinante POXA 1B expresada en *Pichia pastoris* usando residuos de crisantemo**

**Presentado por: Nathalie Andrea Moreno Zabala**

**Trabajo de grado Presentado como requisito parcial para optar al título de Microbióloga Industrial**

**Pontificia Universidad Javeriana**

**Facultad de ciencias**

**Carrera de Microbiología Industrial**

**Bogotá D.C.**

**Junio 2015**

**Evaluación de la actividad enzimática de la lacasa recombinante POXA 1B  
expresada en *Pichia pastoris* usando residuos de crisantemo**

**NATHALIE ANDREA MORENO ZABALA**

---

CONCEPCION JUDITH PUERTA

BACTERIOLOGA, Ph.D

DECANA ACADEMICA

FACULTAD DE CIENCIAS

---

MARCELA FRANCO CORREA

MICROBIOLOGA, Ph.D

DIRECTORA DE CARRERA

FACULTAD DE CIENCIAS

**Evaluación de la actividad enzimática de la lacasa recombinante POXA 1B  
expresada en *Pichia pastoris* usando residuos de crisantemo**

**NATHALIE ANDREA MORENO ZABALA**

---

BALKYS QUEVEDO HIDALGO  
INGENIERA QUIMICA, Ph.D.  
DIRECTORA

---

RAUL POUTOU PIÑALES,  
BIOQUIMICO, Ph.D.  
CODIRECTOR

---

AURA MARINA PEDROZA  
BACTERIOLOGA, Ph.D.  
JURADO

### **NOTA DE ADVERTENCIA**

*Artículo 23 de la resolución N° 13 de julio de 1946 “La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velara porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primera medida a Dios por todo lo bueno que me ha dado, a mis padres que sin importar los cansados que llegan de trabajar siempre estaban pendientes de la hora en que saliera, las trasnochadas, las madrugadas y todos los domingos sacrificados para poder llegar a esta meta. Por todos sus consejos y acompañamiento constante en este proceso, a mi hermano por esperarme hasta tarde mientras acaba algún experimento. A toda mi familia que día tras día con su apoyo y oración me apoyo en este proceso.

A mi novio Daniel Buitrago (pollo), que no sólo fue un apoyo, fue mi compañero, mi amigo, el que me ayudo constantemente, no me dejo desfallecer y con todo su amor me dio fuerzas necesarias para continuar muchas veces. Aquel que muchas veces se quedó hasta tarde conmigo esperando a que terminara de sembrar o pesar.

A mi directora Balkys Quevedo, por cada una de sus enseñanzas, apoyo, porque todos los días desde mi monitoria en su materia tuve un nuevo aprendizaje de ella y sobre todo por toda la paciencia que me tuvo.

A mi codirector Raúl Poutou que me apoyo y me enseñó no sólo a cumplir sino mejorar día tras día y por toda la paciencia que me tuvo durante todo este proceso.

A la profesora Ivonne Gutiérrez por todo su apoyo en el análisis estadístico de los resultados.

A Laura Muñoz, Carolina Rojas, Claudia Rivera y David Morales los cuales fueron mis compañeros constantes en este proceso que me ayudaron día tras día para que se dieran cada uno de los resultados esperados y los que no.

A mis amigas (Mayra Puello y Catalina García) por todos sus consejos académicos, apoyo y por todas las tardes de tesis en las que nos apoyamos mutuamente. Y en si a todas las personas del laboratorio de Biotecnología Aplicada por cada uno de los momentos que compartimos juntas.

Y por todas las personas que con un consejo, con su apoyo, con su paciencia y cada enseñanza estuvieron en este proceso.

Gracias.

## RESUMEN

Colombia es uno de los principales exportadores de flores al mundo, entre las que se encuentra el crisantemo. Los residuos generados durante la producción del crisantemo, son un problema ambiental debido a las dificultades que se generan por estos; como lo son procesos de eutrofización en agua, contaminación por plagas, etc. Razón por la cual este trabajo de grado tuvo como objetivo evaluar la actividad enzimática de la lacasa recombinante POXA 1B expresada en *Pichia pastoris* usando residuos de crisantemo.

Se realizó un estudio preliminar del cual se decidió que no se era necesario el agregar  $\text{CuSO}_4$  como cofactor de la actividad enzimática, cuando el residuo se encontraba presente. De acuerdo a esto, se planteó un diseño factorial, en el que se evaluó la concentración de glucosa, fuente de nitrógeno, porcentaje de inóculo y tiempo de cultivo. Como consecuencia de esto se obtuvieron los mejores resultados para la actividad enzimática, en la combinación con una concentración de glucosa 3% (p/v), nitrógeno (extracto levadura 1% (p/v) - peptona 1% (p/v)), concentración de inóculo (10% v/v) y 168 horas, con 2074 U/L de lacasa. Se analizó la productividad (basada en la actividad enzimática) de cada uno de los tratamientos, de los cuales el que reportó la mayor productividad fue el que tenía la concentración de glucosa 3% (p/v), nitrógeno (extracto levadura 1% (p/v)-peptona 1% p/v), concentración de inóculo (12% v/v) y 72 horas de cultivo con una productividad del  $21,4 \text{ UL}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Con el objetivo de favorecer el crecimiento celular de la cepa a cada uno de los experimentos se les agregó glucosa, la cual fue utilizada para analizar por el rendimiento producto a partir de sustrato ( $Y_p/s$ ). Mostrando que el mejor rendimiento se encontró a concentración de glucosa 1% (p/v), nitrógeno (extracto levadura 1% (p/v) -peptona 2% p/v)), concentración de inóculo (10% v/v) y 72 horas, con un rendimiento del 81,913 U/g. Para complementar esto se verificó la técnica para la determinación del porcentaje de lignina presente en una muestra vegetal.

Tabla de contenido	
INTRODUCCION.....	13
JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
MARCO TEORICO REFERENTES CONCEPTUALES.....	16
Residuos lignocelulósicos.....	16
Lignina y su degradación.....	16
Tratamiento para degradación de lignina.....	17
Enzima Lacasa.....	18
Levaduras recombinantes.....	19
OBJETIVOS.....	20
Objetivo General.....	20
Objetivos Específicos.....	20
METODOLOGIA.....	21
Microrganismos.....	21
Material lignocelulolítico.....	21
Caracterización del residuo de crisantemo.....	21
Producción del banco de células primario.....	21
Cultivo para producción de lacasa.....	22
Diseño Experimental.....	23
Montaje Experimental.....	24
Determinación de la actividad de la lacasa.....	24
Determinación de Azúcares reductores.....	24
Estandarización de la técnica para determinación del porcentaje de lignina por hidrólisis ácida.....	25
Análisis Estadístico.....	26
RESULTADOS.....	27
Caracterización del residuo de crisantemo.....	27
Diseño experimental para la determinación de la actividad enzimática.....	28
Rendimiento producto sustrato Yp/s.....	31

Estandarización de la técnica de hidrolisis ácida.....	37
DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIONES.....	41
RECOMENDACIONES.....	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43
ANEXOS.....	46

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diseño experimental para la evaluación de la actividad lacasa con adición de residuo de crisantemo.....	23
<b>Tabla 2.</b> Caracterización de la composición del residuo de crisantemo.....	27
<b>Tabla 3.</b> Resultados representativo de los estudios preliminares.....	28
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de evaluación del diseño factorial.....	29
<b>Tabla 5.</b> Consumo de glucosa en cada uno de los tratamientos en el tiempo.....	32
<b>Tabla 6.</b> Resultados porcentaje de lignina control.....	37

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.</b> Actividad lacasa en cada uno de los tratamientos (1-9) realizados en los tiempos 72 y 168 horas. $p < 0,05$ .....	30
<b>Figura 2.</b> Productividad de la actividad enzimática en cada uno de los tratamientos (1-9) realizados en el tiempo (72 y 168 horas).....	31
<b>Figura 3.</b> Las interacciones que tuvieron mayor influencia en la actividad enzimática con una concentración de inóculo del 10% a las 72 horas de cultivo.....	33
<b>Figura 4.</b> Las interacciones que tuvieron mayor influencia en la actividad enzimática con una concentración de inóculo del 12% a las 72 horas de cultivo.....	34
<b>Figura 5.</b> Las interacciones que tuvieron mayor influencia en la actividad enzimática con una concentración de inóculo del 10% a las 168 horas de cultivo.....	35
<b>Figura 6.</b> Las interacciones que tuvieron mayor influencia en la actividad enzimática con una concentración de inóculo del 10% a las 168 horas de cultivo.....	36

## **LISTA DE ANEXOS**

**Anexo 1.** Resultado del análisis ANOVA lacasa a las 72 horas de muestreo ..... 46

**Anexo 2.** Resultado del análisis ANOVA lacasa a las 168 horas de muestreo... 467

## 1. INTRODUCCIÓN

Debido a la alta demanda de exportación de flores como el crisantemo, se ha incrementado la producción de residuos agroindustriales, por lo que se hace necesario buscar alternativas para darle un uso potencial a estos residuos y disminuir el impacto que generan (Singh *et al.* 2014).

Dentro del impacto que estos residuos generan se encuentran problemas medio ambientales, como contaminación de las aguas (Shen *et al.* 2011), producción de dióxido de carbono cuando son incinerados, también procesos de magnificación de plaguicidas si se utilizan como alimento para los animales (Asocolflores, 2002), al mismo tiempo son generadores de plagas (moscas, ratones, etc.); favoreciendo la transmisión de enfermedades. Razones por las cuales se hace necesario ser reincorporados a los ciclos naturales o darles un uso productivo en la sociedad (Busto-Flores, 2009). Entre las alternativas está la producción de energía como biogás, biodiesel, entre otros.

El crisantemo es una planta vascular, del grupo de las angiospermas, cuyo principales componentes son la lignina, la celulosa y la hemicelulosa (lignocelulosa), (Quevedo-Hidalgo, 2011). Estos componentes se encuentran estrechamente enlazados lo que hace difícil su degradación y el acceso a los carbohidratos fermentables.

Para acceder a los diferentes componentes de los residuos lignocelulolíticos y hacer un posterior uso de estos, se debe realizar un pretratamiento que permita eliminar la lignina, facilitando de esta manera el acceso a la celulosa y a la hemicelulosa (Behera *et al.* 2014). Entre estos pretratamientos está el biológico, el cual se realiza a través del ataque enzimático y la digestión de los componentes (Singh *et al.*, 2014), por parte de microorganismos de los que se destacan los hongos de podredumbre blanca o marrón, por poseer enzimas (Lignina Peroxidasa (E.C. 1.11.1.14 ), Manganese Peroxidasa (E.C. 1.11.1.13) y Lacasa (E.C. 1.10.3.2) principalmente degradadoras de lignina y solubilizadoras de la hemicelulosa permitiendo la ruptura del complejo formado por celulosa, hemicelulosa y lignina (Ballat, 2011).

Se ha visto que la producción de estas enzimas, tiene algunas desventajas económicas debido a sus bajos rendimientos y su período largo de producción. Es por esto que se ha estudiado, el empleo de la enzima lacasa directamente; permitiendo una degradación significativa y rápida del sustrato (Rivera-Hoyos *et al.* 2013).

En este trabajo de grado se encontraron las mejores condiciones para la producción lacasa recombinante POXA 1B, con adición de crisantemo cuyo gen sintético se encuentra integrado al cromosoma de *Pichia pastoris* (X33). Lo anterior con el fin de usar dicha enzima en los procesos de degradación de la lignina presente en residuos lignocelulósicos.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años ha aumentado considerablemente la floricultura en Colombia, convirtiéndose en una de las grandes industrias a nivel mundial. Según Asocolflores (2010) Colombia es el principal exportador de flores a Estados Unidos (60%), el cuarto a la Unión Europea (4%) y el tercero al Reino Unido (6.4%). Entre los principales productos cultivados se encuentra la rosa con 33%, los claveles con 12.7% y el crisantemo con 8%.

La producción de estos cultivos genera 1.5 m<sup>3</sup>/ha/día y entre 0.8 y 1 t/ha/semana de desechos vegetales (Quevedo-Hidalgo, 2011). La acumulación de estos, generan un impacto ambiental negativo, entre los que están la contaminación de las aguas (Shen *et al.* 2011), si estos residuos se encuentran expuestos al medio ambiente o son incinerados se genera dióxido de carbono, también se incluyen procesos de magnificación de plaguicidas si se utilizan como alimento a los animales, en la cadena trófica (Asocolflores, 2002), al mismo tiempo son generadores de plagas (moscas, ratones, etc.); favoreciendo la transmisión de enfermedades. Por esta razón, se requiere la implementación de un sistema de gestión ambiental para darle un valor agregado y uso a estos desechos (Busto-Flores, 2009).

Estos residuos agroindustriales están compuestos por lignocelulosa, la cual está formada por lignina, que es un polímero aromático amorfo unido a la celulosa conformado por homopolímeros de glucosa y por hemicelulosa, constituida por monómeros de carbono; siendo así, estos residuos agroindustriales constan de una matriz polimérica que hace difícil el acceso a los azúcares para los microorganismos no degradadores de lignina. Por esta razón se debe emplear un pre-tratamiento que facilite la disponibilidad de los azúcares para su posterior sacarificación y fermentación (Morales *et al.* 2015).

Una de las alternativas para la degradación de los residuos agroindustriales es el uso de enzimas recombinantes. De acuerdo a estudios como el de Moreno *et al.* (2012) se demostró la eficiencia de la enzima lacasa recombinante de *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 para la degradación de la lignina y posterior implementación en la producción de bioetanol; logrando reducir los compuestos fenólicos de la paja de trigo y mejorando la concentración de etanol al final del proceso. De igual forma Lee *et al.* (2012) utilizaron una lacasa recombinante de *Yarrowia lipolytica* para lograr eliminar eficientemente los componentes fenólicos y no fenólicos; reduciendo la inhibición de las celulasas y aumentando los niveles de sacarificación. Así mismo Sitarz *et al.* (2013) demostraron la aceleración de la degradación de la lignocelulosa debido a la actividad de la enzima lacasa de *G. lucidum*; generando altos rendimientos en azúcares fermentables. Lo que demuestra la importancia del uso de enzimas recombinantes para la degradación de residuos lignocelulíticos.

Por lo anterior en este trabajo se estudió el efecto de la adición de crisantemo en la enzima recombinante para usarla en un futuro en procesos de degradación de residuos lignocelulósicos.

### 3. MARCO TEÓRICO - REFERENTES CONCEPTUALES

#### 3.1 Residuos lignocelulósicos

Los residuos lignocelulolíticos derivados de la industria y la agricultura tienen un gran potencial, ya que es la fuente de carbono renovable más prometedora para solucionar los problemas de energía y materias primas (Kalia *et al.* 2014).

Existen diversos residuos lignocelulolíticos para la producción de etanol como el bagazo de la caña de azúcar, la cascara de arroz, los residuos de la floricultura como el crisantemo, las maderas suaves tipo coníferas (pino, ciprés, abeto, abedul), entre otras (Singh *et al.*, 2014). El crisantemo se encuentra clasificado como una planta vascular, donde los componentes principales de la pared celular son la lignina, la celulosa y la hemicelulosa. Es la misma estructura de diferentes tipos de materiales lignocelulolíticos. De acuerdo a los resultados obtenidos por Quevedo-Hidalgo (2011), la composición de este residuo está distribuida de la siguiente forma: celulosa 49.6%, hemicelulosa 7.5% y lignina 17.5%. Además, de poseer algunos metales como magnesio y cobre, los cuales son esenciales para la inducción de la enzima lacasa y para el crecimiento de la levadura trabajada en este proyecto (Quevedo-Hidalgo, 2011).

La lignocelulosa es el componente principal de la pared celular de las plantas y está compuesta por biopolímeros como la celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales constituyen del 18 al 35% del peso seco de los tejidos de las plantas superiores y es una de las fuentes orgánicas renovables más importantes (Singh *et al.*, 2014). La organización de estos polímeros se basa en las cadenas de polímeros que generan las microfibras de celulosa incrustadas dentro de la matriz de hemicelulosa y lignina (Doherty *et al.*, 2011). La red de estos tres componentes son los que proporcionan la rigidez a las plantas (Jung *et al.*, 2015). Esta red comprende un complejo heterogéneo de polímeros de carbohidratos y lignina. Los carbohidratos disponibles provienen de la celulosa y la hemicelulosa, los cuales deben ser convertidos a monosacáridos de fácil asimilación.

#### 3.2 Lignina y su degradación

La lignina es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza, es insoluble, altamente resistente a ataques químicos y biológicos, confiere resistencia mecánica a la madera y recubre la pared celular lo que lo convierte en un polímero recalcitrante. El contenido de lignina varía de acuerdo a los diferentes grupos de plantas vasculares (Martínez *et al.*, 2005).

La lignina está compuesta por tres anillos aromáticos de alcoholes (monolignoles) que son alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico, los cuales conforman las unidades de fenilpropano. Los fenilpropanoides varían de acuerdo al grado de sustitución del oxígeno en el anillo fenil. En el proceso de lignificación, los monolignoles forman una red compleja con la hemicelulosa. El ácido

hidroxicinámico es el agente de entrecruzamiento entre la lignina y los carbohidratos (Huijgen *et al.*, 2014).

Debido a que la lignina se encuentra unida a la celulosa y a la hemicelulosa, es necesario degradarla. Esta degradación ocurre por medio de un ataque enzimático efectuado por Basidiomicetes a través de enzimas extracelulares oxidoreductasas, como las lacasas y peroxidasas lignolíticas; las cuales reducen la lignina a radicales aromáticos.

Ocurren diferentes reacciones durante el proceso de degradación de la lignina, en donde se encuentra el rompimiento de los enlaces éter, la escisión del anillo aromático, una desmetoxilación, el rompimiento de los enlaces  $\alpha$  y  $\beta$  de los carbonos de la lignina y la posterior liberación de un aldehído, el cual es el sustrato para la generación del peróxido de hidrógeno por reacciones de óxido-reducción cíclicas. Otro sustrato generado para la degradación enzimática son los radicales fenoxi liberados durante el rompimiento de los enlaces éter, los cuales son reducidos por enzimas oxidasas a compuestos fenólicos para ser reoxidados por enzimas lacasas o peroxidasas; generando reacciones cíclicas que reducen el hierro presente en la madera. Como paso final azúcares reductores para ser asimilados por rutas metabólicas (Martínez *et al.*, 2005; Quevedo-Hidalgo *et al.*, 2012).

### **3.3 Tratamiento para degradación de lignina**

Existen métodos químicos, físicos y biológicos para la degradación de la lignina, mediante la descomposición del polímero de ligninocelulosa para la formación de monosacáridos, los cuales aumentan la bioconversión microbiana y la porosidad del material a transformar y reducen la cristalinidad de la celulosa (Singh *et al.*, 2014).

Entre los diferentes métodos se encuentra la explosión de vapor (físico), tratamiento de vapor con ácido sulfúrico diluido o dióxido de azufre (químicos) y tratamiento biológico con hongos de podredumbre blanca o café. Debido a que los tratamientos físicos y químicos presentan requerimientos de energía altos, haciéndolos no rentables y perjudiciales para el ambiente por ser corrosivos (Singh *et al.*, 2014).

El método biológico consiste en tres pasos generales: el primero, un pretratamiento de la lignocelulosa, el cual convierte la estructura de la lignocelulosa en componentes recalcitrantes e intermediarios celulolíticos; el segundo, la hidrólisis enzimática de la celulosa, por medio de enzimas. Se realiza la hidrólisis de los compuestos intermediarios para formar azúcares fermentables y por último la fermentación, en la cual por ejemplo, la glucosa o xilosa por vías biológicas llega hasta etanol y otros productos como ácido láctico, ácido succínico, etc (Singh *et al.*, 2014).

Esta hidrólisis enzimática de los carbohidratos es un avance en el desarrollo de esta tecnología para la conversión por medio de biomasa microbiana, de estos a monómeros de azúcar, para luego proceder con una fermentación y generar como producto final bioetanol. Esta hidrólisis de los hidratos de carbono, ocurre por medio de enzimas específicas que cooperan entre sí de manera sinérgica, para degradar de este sustrato (Van Dyk & Pletschke, 2012).

Entre los organismos que pueden ser utilizados para este tipo de tratamiento, se encuentran los hongos de podredumbre blanca y marrón. Estos producen un sistema degradador, compuesto por enzimas extracelulares que destruyen la lamela media del compuesto a degradar; generando así una pérdida del 95% de la lignina (Singh *et al.*, 2014). Entre las enzimas implicadas están las peroxidasas y las oxidasas, enzimas hidrolíticas (Godliving, 2012). Esta hidrólisis enzimática se logra en condiciones ácidas; dadas por los productos metabólicos del proceso o factores abióticos. Luego de esta hidrólisis, ácidos como el ácido butírico, succínico, entre otros ayudan a separar los azúcares (Mielenz, 2001).

### 3.4 Enzima Lacasa

Una de las enzimas implicadas en la hidrólisis enzimática de estos componentes es la lacasa (EC 1.10.3.2), clasificada como *p*-difenol, oxidoreductasas dioxígeno. Las cuales son polifenol oxidasas glicosiladas (Wu & Nian, 2014); esta enzima pertenece a la familia multicobre oxidasa; esta contiene cuatro átomos de cobre, uno de tipo paramagnético (cu T1), el cual le proporciona el color azul, además de ser el responsable de la oxidación del sustrato reducido producido. El tipo 2 (cu T2), y dos del tipo 3 (cu T3), el cual forma un cluster trinuclear; en el que el oxígeno molecular se reduce a dos moléculas de agua (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013; Mate & Alcalde 2015).

La enzima lacasa, se encuentra en organismos como algunos hongos, algunas bacterias, algunas plantas y algunos insectos. La diferencia clave entre la enzima producida por bacterias y la producida por hongos radica en que, las primeras son proteínas intracelulares mientras que las otras son proteínas extracelulares que presentan diferentes grados de glicosilación. Mientras que la producida por plantas está encargada de la polimerización de la lignina. En el caso de los hongos, esta enzima tiene como funciones morfogénicas, defensa contra estrés, degradación de lignina (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013; Mate & Alcalde 2015).

La lacasa es una enzima perteneciente al metabolismo secundario de los hongos y lleva a cabo reacciones oxidativas. Estas poseen una alta capacidad para oxidar compuestos, tanto aromáticos orgánicos, como los compuestos fenólicos (orto y para - difenoles), aminas aromáticas, fenoles metoxisustituidos, diaminas, bencenotioles, iones metálicos ( $Mn^{+2}$ ), compuestos organometálicos, entre otros. La polimerización de los compuestos fenólicos empieza por una oxidación de la lacasa de estos polímeros, por la vía de radicales intermediarios; los compuestos fenólicos se oxidan a radicales fenoxi, que a la vez, se pueden polimerizar acoplándose a otro radical (Maijala *et al.*, 2012). Esta oxidación se debe a una

transferencia de electrones, a un radical de hidrógeno o en un mecanismo aniónico; esto depende del mediador que se encuentre en la reacción (Kalia, *et al.*, 2014b).

Su función es la polimerización de compuestos fenólicos, así como la síntesis de pigmentos, la desintoxicación de diversos compuestos (Maijala *et al.*, 2012), a través de procesos de biorremediación, tales como: la desintoxicación de tintes industriales y de compuestos xenobióticos, el tratamiento de contaminantes como los hidrocarburos aromáticos. Otros compuestos que también son reducidos por la enzima lacasa son metales, como el magnesio y el hierro (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013).

Para las aplicaciones industriales, de esta enzima, se encuentre en condiciones que favorezcan su actividad y estabilidad durante el proceso; lo que no siempre se logra. Es por esto que se han ensayado diferentes estrategias para mejorar el proceso. Entre estas esta la optimización de los componentes del medio de cultivo, con el fin de aumentar la producción (ajuste en la fuente de nitrógeno y carbono, derivados de lignina, iones metálicos). La otra alternativa, es la expresión heteróloga de la enzima, usando promotores fuertes vectores y péptidos señal capaces de dirigir la secreción de la lacasa por medio extracelular (Mate & Alcalde 2015; Rivera-Hoyos *et al.*, 2015).

### **3.5 Levaduras recombinantes**

En los últimos años se ha buscado alternativas para la expresión heteróloga de la enzima lacasa fúngica en levaduras. Entre las ventajas que se tiene del uso de estos microorganismos están, que pueden secretar extracelularmente la enzima lacasa, que existe una amplia variedad de vectores uni y bi-direccional disponibles en el mercado y por último que muestran una alta frecuencia de recombinación (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013; Mate & Alcalde 2015).

De acuerdo con lo anterior una de las ventajas que posee el uso de lacasa recombinante producida por una levadura, frente a las enzimas obtenida a partir de la fuente nativa, es la velocidad de crecimiento de la levadura con relación al hongo; lo que minimiza el tiempo del proceso de producción.

Se observó que esta tecnología permite realizar modificaciones post-traduccionales, como lo es la proteólisis, glicosilación y formación de enlaces di sulfuro, los cuales permiten la expresión de la enzima recombinante (Rivera-Hoyos *et al.*, 2015). Los cambios realizados a la secuencia original de ADN, permiten que la cepa interprete el gen como propio; mejorando así su expresión (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013). Además, se utilizó un péptido señal, para asegurar que la proteína se secretara al medio de cultivo; evitando así procesos de ruptura celular, etc. (Rivera-Hoyos *et al.*, 2015).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad enzimática de la lacasa recombinante POXA 1B expresada en *Pichia pastoris* usando residuos de crisantemo

### 4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la influencia de la glucosa, el extracto de levadura, la peptona, el porcentaje de inóculo, la presencia de residuos de crisantemo y tiempo sobre la actividad de la lacasa recombinante POXA 1B expresada en *Pichia pastoris*.
2. Estandarización de la técnica de hidrólisis ácida para la determinación del porcentaje de lignina presente en muestras vegetales.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Microorganismo

Se utilizó la cepa *Pichia pastoris* X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop que produce la lacasa recombinante POXA 1B de *Pleurotus ostreatus*; la cual fue suministrada por Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI). La cepa se encuentra conservada a -80°C en el banco de cepas del Laboratorio Biotecnología Molecular (Rivera-Hoyos et al., 2015).

### 5.2 Material lignocelulolítico

El material a utilizar fue residuos de crisantemo (hojas y tallos) provenientes de cultivos del norte (Tocancipá, Colombia). El residuo fue previamente molido hasta un tamaño de partícula menor a 1mm partícula.

### 5.3 Caracterización del residuo de crisantemo

Se analizó el contenido de lignina, celulosa, hemicelulosa y de proteínas presentes en el residuo por el método de fibra detergente neutro (FDN) (Van Soest *et al.*, 1991), el cual fue realizado en la Universidad Nacional de Colombia, en el Laboratorio de Nutrición Animal. Mientras que el contenido de fósforo, calcio, potasio, zinc, magnesio, cobre y manganeso, se determinó por espectrofotometría de absorción atómica. El contenido de C, H y N se midió siguiendo el procedimiento descrito en la norma ASTM 5373-08

### 5.4 Producción del banco de células primario

Se realizó un cultivo en medio YPG (Glucosa 2% (p/v), Peptona 2% (p/v), Extracto de levadura 1% (p/v)), en el que se inoculó un vial proveniente del Banco de Células Primario del grupo GBAI. Se dejó en agitación constante de 180 rpm a 30°C durante 72 horas. Pasado este tiempo de incubación se le agregó glicerol como crioprotectante quedando a una concentración final 25% (v/v) y el antibiótico zeocina a 100µg/ml. Se conservó a -20°C cada uno de los viales obtenidos (Poutou *et al.*, 1994).

### 5.5 Cultivo para producción de lacasa

Se elaboró un pre-cultivo en 5ml con medio YPG, el cual se inoculó con un vial del banco. Se dejó en agitación constante a 180 rpm a 30°C durante 72 horas. Se realizó un cultivo de 70 ml con el medio YPG, el cual se inoculó con el pre-inoculo previamente elaborado, en agitación constante a 180 rpm a una temperatura de 30°C durante 96 horas.

## 5.6 Diseño Experimental

Se estudió el efecto de la concentración de glucosa, fuente de nitrógeno, concentración de inóculo y dos tiempos (72 h y 168 h). Utilizando como variable de respuesta la actividad lacasa. Se realizó un diseño factorial general ( $2^4$ ), en el que se evaluaron 4 factores y 2 niveles; el primer factor es la concentración de glucosa cuyos niveles son 1% (p/v) y 3% (p/v), el segundo factor fue la fuente de nitrógeno cuyos niveles fueron extracto de levadura 1% (p/v) - peptona 1% (p/v) y 2% (p/v), el tercer factor fue la concentración de inóculo manejando los niveles 10% (v/v) y 12% (v/v) y por último el tiempo de cultivo con los niveles 72 y 168 horas (**Tabla 1**). Se realizaron 48 experimentos de acuerdo con las combinaciones arrojadas por el programa Desing Expert versión 7.00.

**Variable independiente:** Concentración de fuente de carbono - nitrógeno, concentración de inóculo

**Variable dependiente:** Actividad Lacasa

**Variable respuesta:** Actividad lacasa

**Tipo de estudio:** Experimental

**Tabla 1.** Diseño experimental para la evaluación de la actividad lacasa con adición de residuo de crisantemo.

Experimento	Glucosa % (p/v)	Peptona % (p/v)*	Concentración de Inóculo % (v/v)	Tiempo (horas)		Residuo %(p/v)
1	3	2	10	72	168	5
2	1	2	10	72	168	5
3	3	2	10	72	168	5
4	1	2	12	72	168	5
5	3	1	12	72	168	5
6	3	2	12	72	168	5
7	3	2	12	72	168	5
8	1	2	10	72	168	5
9	1	2	10	72	168	5
10	1	1	10	72	168	5
11	1	1	12	72	168	5
12	1	2	12	72	168	5
13	3	2	12	72	168	5
14	3	1	12	72	168	5
15	1	1	10	72	168	5
16	3	2	10	72	168	5
17	1	1	10	72	168	5
18	3	1	10	72	168	5
19	3	1	12	72	168	5
20	1	1	12	72	168	5
21	1	1	12	72	168	5
22	3	1	10	72	168	5
23	1	2	12	72	168	5
24	3	1	10	72	168	5
Control	2	2	10	72	168	0

Las combinaciones de los factores (glucosa, peptona e inóculo) por triplicado de un solo tiempo. \*Todos los experimentos tienen 1% (p/v) de extracto de levadura. Cada combinación de factores va por triplicado, dando como total 60 experimentos.

### **5.7 Montaje experimental**

Para llevar a cabo el diseño experimental anteriormente planteado (**Tabla 1**), se realizó la siguiente metodología:

Para cada experimento se pesó 1 g de residuos de crisantemo en matraces de 100 ml, usando 18 ml del medio de cultivo en tampón citrato 50mM a pH: 5,6 (Quevedo- Hidalgo, 2011). Se adicionaron 2 ml o 2,4 ml de inóculo (10% y 12% (v/v) respectivamente). A cada tratamiento se le agregó 1% (p/v) de extracto de levadura, glucosa y peptona en las concentraciones planteadas en el diseño de experimentos. El cultivo se mantuvo en agitación constante en un agitador orbital a 180 rpm y 30°C, durante 72 y 168 h.

Al finalizar cada experimento, se centrifugó dos veces a 35000 g en una centrifuga Sorvall RC 6 plus (18000 r.p.m.) por 10 minutos a 4°C, para retirar los sólidos (residuo de crisantemo). El sobrenadante se utilizó para determinar la actividad enzimática lacasa.

### **5.8 Determinación de la actividad de la lacasa**

La actividad de la enzima lacasa (EC 1.10.3.2), se evalúa en el cambio en la absorbancia a 436nm ( $436=29300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) de la oxidación de ABTS [ácido 2,2' azino-bis-(3 etil benzotiazoline sulfato)] en una solución tampón de acetato de sodio 60 mM (pH 4.5).

Esto se realiza mezclando 100 µl del tampón de acetato de sodio 60 mM, 100 µl de ABTS 0,5 mM y 800 µl de la muestra. Dando como resultado la formación de un radical verde, el cual se ve espectrofotométricamente durante 3 minutos.

La unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que permite la oxidación de 1 µmol de ABTS por minuto. El blanco estuvo compuesto de 100 µl de ABTS 0,5 mM, 800 µl de agua destilada y 100 µl del tampón de acetato de sodio 60 mM (Tinoco *et al.*, 2001).

### **5.9 Determinación de Azúcares reductores**

Se realizó un patrón de glucosa conocido para realizar la curva patrón de la que se obtuvo la siguiente ecuación:

$$Y = 0,556x - 0,0184 \quad R^2 = 0,9968$$

Los azúcares reductores fueron analizados por la técnica del 3,5-ácido dinitrosalicílico "DNS" (Miller, 1959).

## **5.10 Estandarización de la técnica para determinación del porcentaje de lignina por hidrólisis ácida**

Teniendo en cuenta que la utilidad de obtener un extracto enzimático con actividad lacasa permita la degradación de residuos lignocelulósicos, se realizó la estandarización de la técnica para determinar el porcentaje de lignina en los residuos. A continuación se presenta la metodología de esta técnica

Se estandarizó la técnica de la hidrólisis ácida planteada por la NREL (National Renewable Energy Laboratory) (Sluiter *et al.*, 2011). La cual consiste en una hidrólisis ácida de dos etapas, para fraccionar la lignina como material insoluble en el ácido. Este material se cuantifica gravimétricamente como método de valoración de porcentaje de lignina presente en la muestra.

Mediciones previas a la hidrólisis:

### **Determinar proteínas por Kjeldahl**

#### **Retirar extraíbles:**

Retirar los extraíbles de la muestra: Este procedimiento consiste en extraer aquellos componentes que sean solubles en agua y en etanol (como cloranfenicol, nitrógeno, azúcares no estructurales, etc.). Para esto, se preparó un el equipo para extracción (Soxhlet), agregó 10g de la muestra (registró el peso) y se colocó en dedales. Se montó el equipo para extracción 24 horas en cada uno (agua y etanol) a sus respectivos puntos de ebullición (Sluiter *et al.*, 2008).

#### **Determinar humedad**

Secar las muestras a 105°C.

Determinar el porcentaje de humedad de la muestra a 40°C en un recipiente contenedor hasta llegar a peso constante (El porcentaje de humedad debe ser menor al 10%)

Enfriar en un desecador hasta llegar a 25°C.

Calcinar los crisoles con los filtros gosh en un horno a 575°C por 4 horas y dejar enfriar.

Registrar el peso de los crisoles con los filtros.

#### **Hidrólisis**

Agregar 3ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72% (v/v) a 0.3g de la muestra seca y se agitar constantemente.

Llevar a un baño de calentamiento por 1 hora a 30°C, agitando cada 15 minutos.

Transferir todo el contenido a un frasco de 100 ml adicionando 84ml de agua destilada procurando transferir todo el residuo.

Esterilizar a 121 °C a 15 libras de presión por una hora. Se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Filtrar al vacío el contenido.

Colocar la muestra en un horno de 105°C por 16 horas y se dejó enfriar en un desecador hasta llegar a temperatura ambiente.

Pasar a una mufla con rampa de calentamiento, en la que se programó la siguiente rampa:

Rampa de temperatura ambiente a 105°C

Mantuvo a 105°C durante 12 minutos

Rampa a 250°C donde sube 10°C / minuto

Mantuvo a 250°C durante 30 minutos

Rampa a 575°C donde sube 20°C / minuto

Mantuvo a 575°C durante 180 minutos

Dejó hasta que la temperatura bajo a 105°C

Mantuvo a 105°C hasta que se extrajo las muestras

Se dejó enfriar de nuevo en el desecador y finalmente se registró el peso obtenido (NREL, 2008).

El porcentaje de lignina se determinará por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Lignina} = \frac{(\text{Peso embudo } 16h \text{ a } 105^{\circ}C - \text{Peso muestra} + \text{cenizas})}{(\text{Peso muestra inicial} * (100 - \% \text{Humedad} / 100))} * 100$$

## 5.12 Análisis Estadístico

Con el fin de determinar las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, se realizó un análisis ANOVA con la prueba de Tukey utilizando un intervalo de confianza del 95% ( $\alpha = 0.05$ ). Además, de realizar el análisis de pruebas de normalidad (Shapiro – Wilk) En todos los casos, las diferencias de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. Se usó el programa Desing Expert versión 7.00

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Caracterización del residuo de crisantemo

La caracterización de la composición del residuo de crisantemo es presentada en la Tabla 2. Los porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina, varían de acuerdo a cada residuo lignocelulítico.

**Tabla 2.** Caracterización de la composición del residuo de crisantemo

Componente	Crisantemo
Nitrógeno total (%) <sup>1</sup>	1,75
Fósforo total (%) <sup>2</sup>	0,1
Calcio (%) <sup>3</sup>	0,63
Potasio (%) <sup>3</sup>	1,78
Mg (%) <sup>3</sup>	0,26
Cu (mg/kg) <sup>3</sup>	24,6
Fe (mg/kg) <sup>3</sup>	258
Mn (mg/kg) <sup>3</sup>	70,7
Zn (mg/kg) <sup>3</sup>	58,8
B (mg/kg) <sup>4</sup>	68,9
Lignina (%) B.S <sup>5</sup>	12,5
Fibra en detergente neutro (%) B.S. <sup>5</sup>	66,9
Fibra en detergente ácido (%) B.S. <sup>5</sup>	46,8
Celulosa (%)B.S. <sup>5</sup>	33,1
Hemicelulosa (%)B.S.	20,1
Materia seca (%) B.S. <sup>6</sup>	91,2
Humedad (%)	8,5
Carbono (%) <sup>7</sup>	42,91
Proteína Cruda (Nx6.25) (%)	8

BS: Base seca

1. Micro-Kjeldahl, valoración volumétrica
  2. Calcinación a 475°C, valoración colorimétrica con molibdato y vanadato de amonio
  3. Calcinación a 475°C, valoración por espectrofotometría de Absorción atómica.
  4. Calcinación a 475°C, valoración colorimétrica con azometina- H
- 1-4: Análisis realizados por: Laboratorio de Suelos, Facultad de Agronomía
5. Método NDF (Fibra detergente neutral) (Van Soest et al., 1991)
  6. AOAC 1996. Official Methods of analysis of the Association of Analytical Chemists
- 5 y 6 :Análisis realizados por el Laboratorio de Nutrición, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
7. Norma ASTM 5373-08

7 Análisis realizados por el Laboratorio de carbones del Instituto Colombiano de Geología y Minería (INGEOMINAS)

## 6.2 Diseño experimental para la determinación de la actividad enzimática

Se realizaron ensayos con base en un control (sin residuos de crisantemo), bajo las mejores condiciones establecidas a esa fecha por el grupo de GBAI. De acuerdo a las condiciones anteriormente planteadas, fue necesaria la evaluación de la presencia o no de las fuentes de nitrógeno propuestas en el control. Los resultados en la Tabla 3 muestran que es necesario adicionar las dos fuentes de nitrógeno. Finalmente se hizo el experimento quitando el cobre, debido a que el residuo contiene este metal como se muestra en la Tabla 2. Lo anterior resultó ser positivo, registrando una actividad de 780 U/L comparada con el control 714 U/L (Tabla 3). Todos estos experimentos se realizaron a 72 horas de cultivo.

**Tabla 3.** Resultados representativos de los estudios preliminares

Glucosa %(p/v)	CuSO <sub>4</sub> mM	Residuo %(p/v)	Unidad U/L	
2*	0,1	0%	714	Extracto de levadura 1% y peptona 2%
2	0,1	5%	20,8	Extracto de levadura 1% y peptona 2%
2	0,1	5%	ND	Sin fuente de nitrógeno
2	0,1	5%	ND	Extracto de levadura 1%
2	0,1	5%	1,4	Peptona 2%
2	0,1	5%	183,3	Extracto de levadura 0,5% y peptona 1%
2	0	5%	780	Extracto de levadura 1% y peptona 2%

Por lo anterior se planteó el diseño de experimentos, con el residuo, sin cobre, dejando como constante el porcentaje de extracto de levadura pero variando el porcentaje de peptona, el porcentaje de glucosa, la concentración de inóculo y variando el tiempo de muestreo.

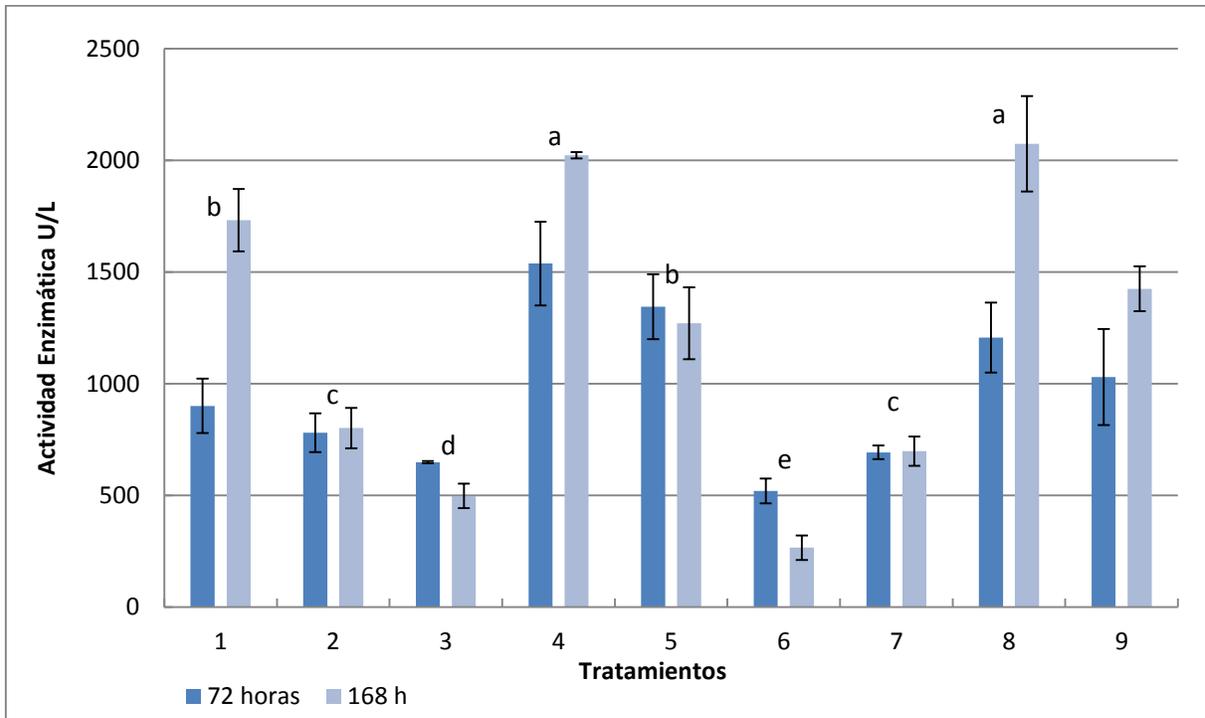
En la tabla 4 se agruparon las condiciones del diseño experimental, en 8 tratamientos los cuales fueron evaluados en base a la actividad enzimática lacasa.

**Tabla 4.** Condiciones de evaluación del diseño factorial

Tratamiento	Glucosa %(p/v)	Peptona % (p/v)	Extracto de levadura %(p/v)	Inóculo %(v/v)	Residuo % (p/v)
1	3	2	1	10	5
2	1	2	1	10	5
3	1	2	1	12	5
4	3	1	1	12	5
5	3	2	1	12	5
6	1	1	1	10	5
7	1	1	1	12	5
8	3	1	1	10	5
<b>Control (9)</b>	2	2	1	10	0

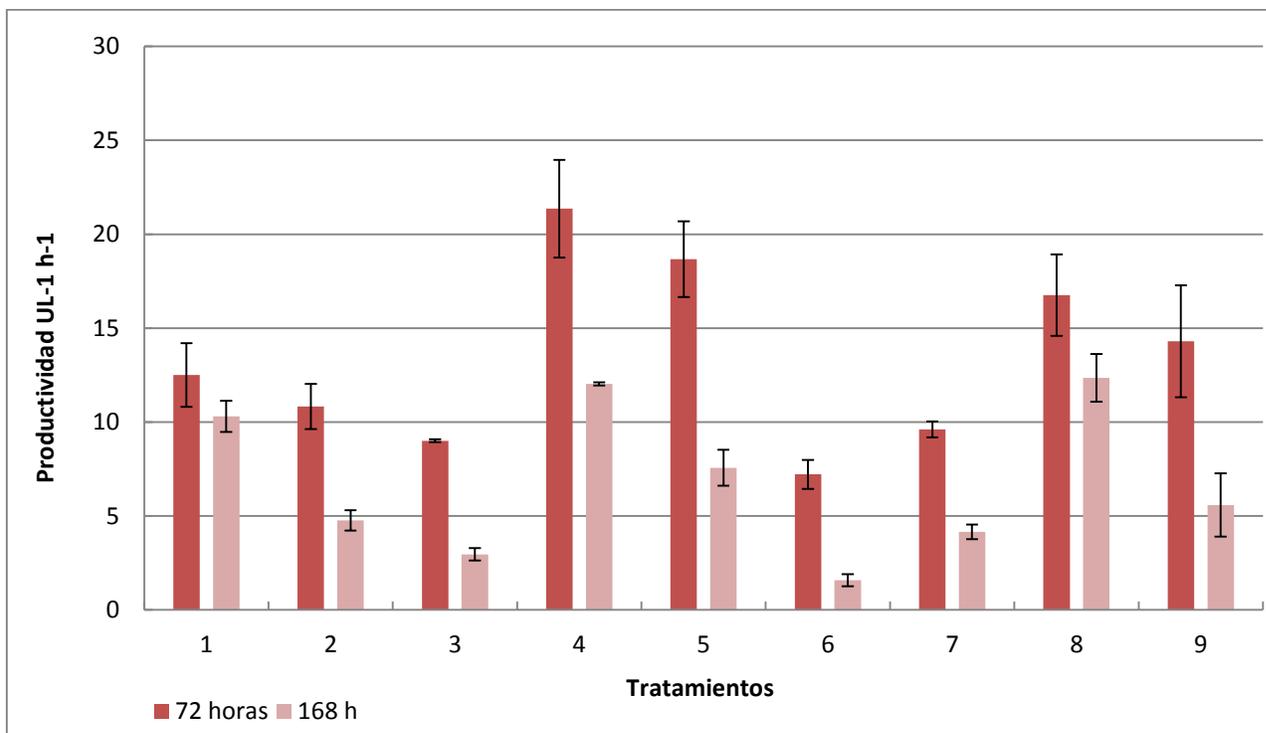
Se realizaron por triplicado cada uno de estos experimentos

De acuerdo con el diseño experimental planteado, los resultados presentados en la figura 1, muestran las actividades enzimáticas lacasa de cada uno de los tratamientos en los tiempos evaluados (72 y 168h), observándose en la mayoría de los tratamientos, la mayor actividad reportada a las 168 horas de muestreo, y con la concentración de 3% de glucosa. Razón por la cual se determinó la mayor actividad enzimática de la lacasa (2074 U/L) fue con la concentración de glucosa 3% (p/v), nitrógeno (extracto levadura 1% (p/v) -peptona 1% p/v), concentración de inóculo (10% v/v) y a las 168 horas (**Figura 1**), según el análisis factorial ( $F=737,68$ ;  $gl^1=6$ ;  $gl^2=16$ ;  $p= <0,0001$ ).



**Figura 1.** Actividad lacasa en cada uno de los tratamientos (1-9) realizados en los tiempos 72 y 168 horas.  $p < 0,05$ .

La representación de la actividad enzimática, permitió analizar el cálculo de la productividad definida como  $UL^{-1}h^{-1}$  para cada tratamiento. Estos resultados se muestran en la Figura 2, demostrándose que la mejor productividad se observó en el tratamiento 4 con un valor de  $21,4 UL^{-1}h^{-1}$



**Figura 2.** Productividad de la actividad enzimática en cada uno de los tratamientos (1-9) realizados en el tiempo (72 y 168 horas).

### 6.3 Rendimiento producto sustrato Y(p/s)

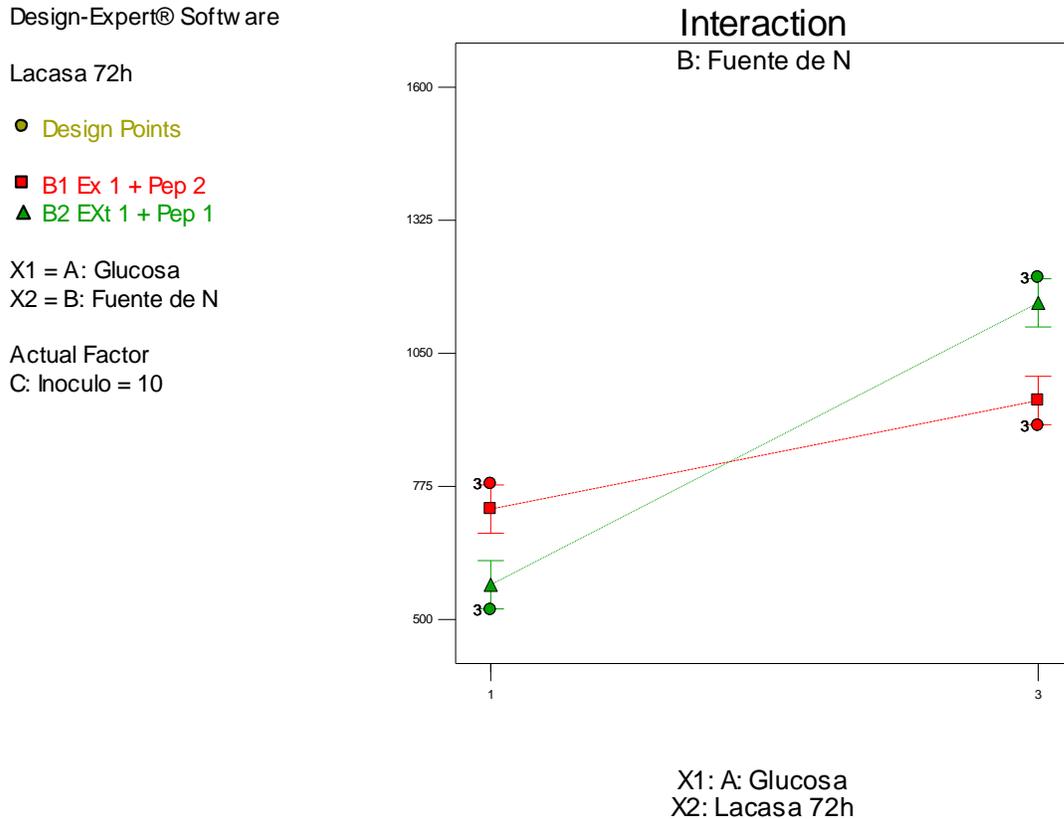
El consumo de glucosa ocurrió casi en su totalidad en cada uno de los tratamientos. Los resultados del rendimiento, fueron calculados con base en el producto y el sustrato consumido (glucosa), mostrando de esta manera que el mayor rendimiento se dio en el tratamiento 2 a las 72 horas de cultivo con un 81,913 U/g (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Consumo de glucosa en cada uno de los tratamientos en el tiempo

Tratamiento	Concentración Inicial Teórica g/L	Concentración Final g/L	Azúcares Consumidos g/L	Y(p/s) (U/g)
1 (72h)	30	0,267	29,733	30,278
1 (168h)	30	0,736	29,264	59,188
2 (72h)	10	0,477	9,523	81,913
2 (168h)	10	0,212	9,788	81,845
3 (72h)	10	0,405	9,595	67,584
3 (168h)	10	0,346	9,654	51,497
4 (72h)	30	0,329	29,671	51,826
4 (168h)	30	0,292	29,708	68,069
5 (72h)	30	0,484	29,516	45,546
5 (168h)	30	0,441	29,559	43,298
6 (72h)	10	0,43	9,57	54,287
6 (168h)	10	0,396	9,604	27,679
7 (72h)	10	0,397	9,603	72,108
7 (168h)	10	0,342	9,658	72,296
8 (72h)	30	0,395	29,605	40,750
8 (168h)	30	0,469	29,531	70,242
Control 1 (72h)	20	0,99	19,01	55,656
Control 1 (168h)	20	0,603	19,397	77,859
Control 2 (72h)	20	0,473	19,527	62,922
Control 2 (168h)	20	0,51	19,49	74,423
Control 3 (72h)	20	0,865	19,135	60,792

De acuerdo con el diseño factorial planteado anteriormente, se determinó cuáles de los factores evaluados tuvieron más influencia en la respuesta (mayor actividad enzimática) en cada uno de las horas estudiadas y la concentración de inóculo.

En base a esto, se determinó que la mayor actividad enzimática está influenciada por la concentración de glucosa 3% (p/v), nitrógeno (extracto levadura 1% p/v - peptona 1% p/v), concentración de inóculo (10% v/v) a las 72 horas (**Figura 3**), según el análisis factorial ( $F= 119,62$ ;  $gl^1=6$ ;  $gl^2=16$ ;  $p= <0,0001$ ).



**Figura 3.** Las interacciones que tuvieron mayor influencia en la actividad enzimática con una concentración de inóculo del 10% (v/v) a las 72 horas de cultivo.

A las 72 horas de cultivo con una concentración del 12% (v/v) de inóculo se determinó que la mayor actividad enzimática fue influenciada por la concentración de glucosa 3% (p/v), nitrógeno (extracto levadura 1% p/v-peptona 1% p/v), (**Figura 4**), según el análisis factorial ( $F= 119,62$ ;  $gl^1=6$ ;  $gl^2=16$ ;  $p= <0,0001$ ).

Design-Expert® Software

Lacasa 72h

● Design Points

■ B1 Ex 1 + Pep 2

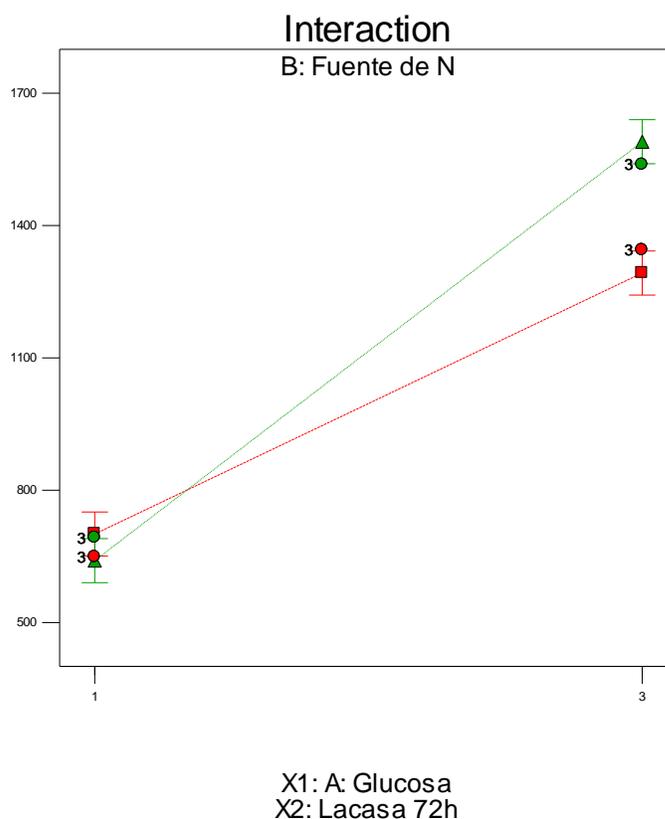
▲ B2 EXT 1 + Pep 1

X1 = A: Glucosa

X2 = B: Fuente de N

Actual Factor

C: Inoculo = 12



**Figura 4.** Las interacciones que tuvieron mayor influencia en la actividad enzimática con una concentración de inóculo del 12% (v/v) a las 72 horas de cultivo.

A las 168 horas de cultivo con una concentración del 10% (v/v) de inóculo, se determinó que la mayor actividad enzimática se vio influenciado por la concentración de glucosa 3% (p/v), nitrógeno (extracto levadura 1% p/v-peptona 1% p/v), (**Figura 5**), según el análisis factorial ( $F= 737,68$ ;  $gl^1=6$ ;  $gl^2=16$ ;  $p=<0,0001$ ).

Design-Expert® Software

Lacasa168

● Design Points

■ B1 Ex 1 + Pep 2

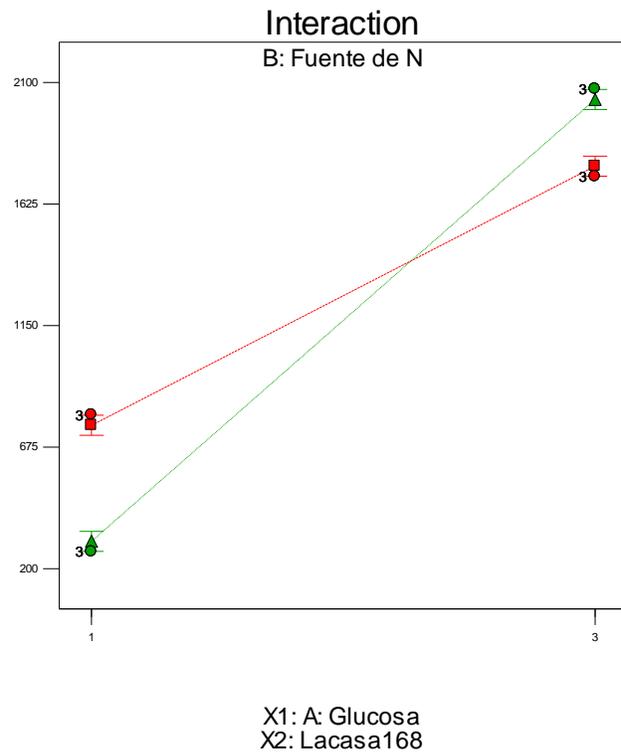
▲ B2 EXT 1 + Pep 1

X1 = A: Glucosa

X2 = B: Fuente de N

Actual Factor

C: Inoculo = 10



**Figura 5.** Las interacciones que tuvieron mayor influencia en la actividad enzimática con una concentración de inóculo del 10% (v/v) a las 168 horas de cultivo.

A las 168 horas de cultivo con una concentración del 12% (v/v) de inóculo Se determinó que la mayor actividad enzimática fue influenciada por la concentración de glucosa 3% (p/v), nitrógeno (extracto levadura 1% p/v-peptona 1% p/v) (**Figura 6**), según el análisis factorial ( $F= 737,68$ ;  $gl^1=6$ ;  $gl^2=16$ ;  $p= <0,0001$ ).

Design-Expert® Software

Lacasa168

● Design Points

■ B1 Ex 1 + Pep 2

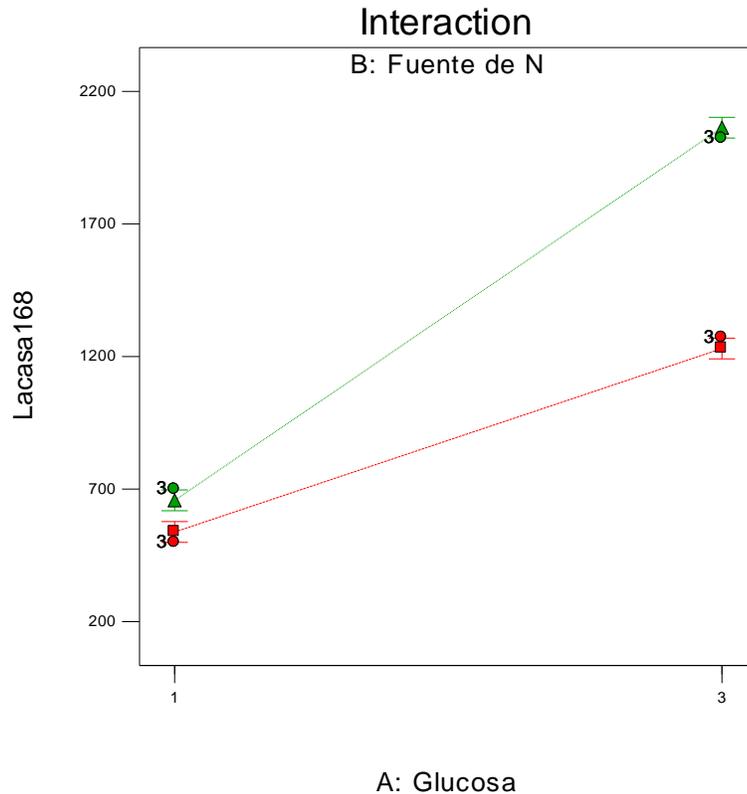
▲ B2 EXT 1 + Pep 1

X1 = A: Glucosa

X2 = B: Fuente de N

Actual Factor

C: Inoculo = 12



**Figura 6.** Las interacciones que tuvieron mayor influencia en la actividad enzimática con una concentración de inóculo del 12% (v/v) a las 168 horas de cultivo.

Todos las interacciones demostraron que los factores que mayor influencia tuvieron en la actividad enzimática fueron la concentración de 3% (p/v) de glucosa, peptona al 1% (p/v) y extracto de levadura al 1% (p/v). A mayor tiempo de muestreo, ha aumentó en la actividad bajo estas condiciones, sin embargo la concentración de inóculo no denota diferencias entre la concentración del 10% (v/v) y el 12% (v/v).

## 6.4 Estandarización de la técnica de hidrolisis ácida

**Tabla 6.** Resultados porcentaje de lignina control

Fuente	No. de la muestra	Lignina					
		P muestra (g)	% Humedad	P embudo (g)	P emb+Lig+cen (g)*	P emb+ceni (g)*	% Lignina
Cascarilla sin extractivos	1	0,3	8,4	30,9	30,9	30,9	18,1
	2	0,3	8,4	30,9	31,0	30,9	18,2
	3	0,3	8,4	30,9	30,9	30,9	17,0
Cascarilla con extractivos	4	0,3	6,4	30,9	31,0	30,9	21,9
	5	0,3	6,4	31,1	31,2	31,1	21,5
	6	0,3	6,4	30,9	30,9	30,9	22,5
ALGODÓN	7	0,3	1,0	30,9	30,9	30,9	0,7
	8	0,3	1,0	31,1	31,1	31,1	0,7
	9	0,3	1,0	30,9	30,9	30,9	0,7

\* Emb= significa embudo lig=lignina y cen= cenizas

Cascarilla sin extractivos		Cascarilla con extractivos		ALGODÓN	
Promedio % Lignina	17,7441	Promedio % Lignina	21,9743	Promedio % Lignina	0,6698
Desviación estándar	0,5595	Desviación estándar	0,4226	Desviación estándar	0,0028

Como se observa en la Tabla 6. Se muestran los resultados representativos de la estandarización de la técnica. Con esto se confirma que si es necesario la extracción de extraíbles para no sobreestimar los resultados de lignina. Se dejó propuesto un protocolo para la determinación del porcentaje de lignina en una muestra vegetal; para su futura aplicación e implementación en el grupo de investigación.

## 7. DISCUSIÓN

En los estudios preliminares realizados se concluyó que era necesario la adición de las dos fuentes de nitrógeno en una concentración de 1% (p/v). De acuerdo a lo reportado por Tinoco *et al.* (2011), cuando el extracto de levadura se encuentra en baja concentración, el efecto de la peptona es insignificante en la producción de lacasa, lo cual coincide con los resultados mostrados en la **Tabla 3**. Estudios reportan el uso del inductor  $\text{Cu}^{+2}$ ; sin embargo, de acuerdo a los resultados experimentales preliminares, donde no se detectó actividad lacasa al estar este presente con el residuo. Mostrando así que la actividad es afectada negativamente por este factor (**Tabla 2**), el residuo de crisantemo tiene 24,9ppm (0,39 mM) de Cobre, lo que significa que según los resultados obtenidos no es necesario agregarle el cofactor  $\text{Cu}^{+2}$ , ya que este posee el cobre necesario para la inducción de la actividad (Quevedo-Hidalgo *et al.*, 2015).

De acuerdo con el estudio realizado experimentalmente, la máxima actividad lacasa obtenida en un residuo de crisantemo fue de 2074,3 U/L (**Figura 1**) mientras que estudios de Quevedo – Hidalgo *et al.*, (2015), reportan que la actividad de la enzima lacasa por *Pleurotus ostreatus* en un residuo de crisantemo fue de 4693 U/L. La diferencia se presenta porque en este último caso se usó directo el hongo, el cual presenta una alta eficiencia biológica, debido a la correlación que existe entre el crecimiento del micelio con la relación celulosa/lignina (Quevedo-Hidalgo, 2011), pero este posee el problema que su producción a escala industrial, toma largos periodos y bajos rendimientos (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013).

Estudios realizados por Hong *et al.*, (2002), reportaron en una enzima lacasa recombinante lacD en *Pichia pastoris* actividad lacasa de  $8,3 \times 10^4$  U/L en cultivo sumergido, el cual contenía 0,1mM  $\text{CuSO}_4$  y 0,6% (p/v) de alanina (Hong *et al.* 2007), mostrando valores mayores a lo reportado experimentalmente (**Figura 1**). Sin embargo, el estudio de Rivera-Hoyos (2015) muestra que la actividad lacasa sin adición de residuo, reportada por la enzima recombinante POXA 1B en *Pichia pastoris* fue de 451,08 U/L entre las 144 y 156 horas de cultivo, al comparar con los resultados obtenidos la actividad aumentó en 78,3% más, cuando se encontraba el residuo presente (**Figura 1**), superando los datos reportados para la misma cepa (Rivera-Hoyos *et al.*, 2015).

De acuerdo al estudio realizado por Songulashvili *et al.*, (2007) una cepa de *G. lucidium* 477 en un medio con 10 g/L de glucosa; 1 g/L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,8 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.2 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0.5g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2 g/L de extracto de levadura y otro bajo las mismas condiciones pero en cambio de glucosa se adicionó la misma cantidad en salvado de trigo como residuo de la industria alimentaria. Mostrando que la menor actividad se reportó en el medio que está compuesto por glucosa con  $295 \pm 22$  en el 6 día de cultivo mientras con el residuo de salvado de trigo  $97340 \pm 9460$  en el 11 día de cultivo. Comparado con los resultados obtenidos experimentalmente los máximos valores en la actividad lacasa alcanzados fueron con el residuo y la glucosa presentes a los 7 días de cultivo (**Figura 1**), frente a

valores menores obtenidos con el medio que posee sólo glucosa en el mismo tiempo. También se concluye en el estudio de Songulashvili *et al.*, (2007), la implementación de una fuente adicional de nitrógeno genera incremento en la concentración de biomasa y puede generar represión de la actividad enzimática, opuesto a lo mostrado en los resultados de la Tabla 2, donde se ve una disminución al quitar o no agregar la fuente de nitrógeno.

Debido al proceso de la lignina y de cobre en el residuo, es uno de los factores por los cuales se pudo inducir la actividad enzimática y el mejoramiento de esta, como consecuencia del efecto sinérgico entre ambas (Quevedo-Hidalgo, 2012). Esta enzima es capaz de catalizar la oxidación de compuestos fenólicos dando como resultado radicales fenoxi; esto se da de acuerdo a potencial redox del compuesto, este efecto mejora cuando el donador de electrones tiene sustituyentes metoxi en el anillo bencénico (Moreno *et al.*, 2012), como el crisantemo está compuesto un 20,1% de lignina, esta puede potencializar la actividad lacasa frente a un medio sintético (glucosa, peptona y extracto de levadura)

En términos de productividad, la mayor productividad se reportó experimentalmente con la concentración de glucosa 3% (p/v), nitrógeno (extracto levadura 1%-peptona 1%), concentración de inóculo (10%) a las 72 horas mostrando con un  $21,4 \text{ UL}^{-1}\text{h}^{-1}$  (**Figura 2**). Mientras que estos autores reportan que la producción de lacasa no tiene influencia significativa de la glucosa, pero si esta es usada en una concentración de 10 a 30 g/L, puede generar incremento en la actividad tal y como lo demostró Tinoco *et al.* (2011), en los resultados reportados para la enzima lacasa de una cepa de *Pleurotus ostreatus* CP-50 a la actividad de la enzima y la productividad de la cepa: con valores  $12000 \text{ UL}^{-1}$  en 108 h y  $111,1 \text{ UL}^{-1}\text{h}^{-1}$  respectivamente.

Sin embargo el rendimiento  $81,913 \text{ U/g}$  se observó con la concentración de glucosa 1% (p/v), nitrógeno (extracto levadura 1% p/v-peptona 2% p/v), concentración de inóculo (10% v/v) a las 72 horas de crecimiento de la cepa (**Tabla 3**), que tiene como ventaja reducir la concentración de glucosa en el proceso y con esto la reducción de costos. Ambos parámetros (productividad y rendimiento) es la primera vez que se encuentran reportados para esta cepa.

Los resultados obtenidos experimentalmente demuestran, que la fuente de carbono (glucosa 3%) fuente de nitrógeno (Peptona 1% p/v- extracto de levadura 1% p/v) fueron las interacciones con mayor efecto en la actividad enzimática (**Figura 4-7**). Galhaupa *et al.*, (2002), evaluaron la producción de la enzima lacasa por *Trametes pubescens* bajo diferentes condiciones de cultivo como lo fue diferentes fuente de carbono y nitrógeno con 2 mM de cobre. De acuerdo a los resultados obtenidos por los investigadores en una concentración entre 10 g/L a 40 g/L de glucosa, obtuvieron un aumento de más de 5 veces en la actividad de la enzima; sin embargo, también reportan que en un porcentaje mayor a esto existió represión, En concordancia con lo anterior los resultados obtenidos en el estudio realizado, se determinó la similitud de estos, ya que las concentraciones de glucosa se encuentran dentro del rango reportado por Galhaupa *et al.*, (2002) a

su vez con la adición del residuo no fue necesario la de cobre que se reportó en el estudio. Aparentemente las altas concentraciones de glucosa pueden reprimir la actividad de la lacasa, esto se debe a que la glucosa posee un sistema para reprimir genes que se utilizan en el metabolismo de fuentes alternativas de carbono, se piensa que es por ahorro de energía (Ronne, 1995).

La evaluación de la fuente de nitrógeno en el estudio demostró que la peptona de carne era la mejor fuente de nitrógeno entre las evaluadas, concluyendo la necesidad de una sola fuente (Galhaupa *et al.*, 2002; Songulashvili *et al.*, 2007). Otros autores reportan que al contrario de lo anterior, han observado que la mayor actividad lacasa se puede ver influencia si peptona y extracto de levadura están en niveles superiores, como lo es 10 g/L (Tinoco *et al.* 2011).

De acuerdo a la estandarización de la técnica propuesta en este trabajo de grado, es necesario que antes de realizar el protocolo, se realicen los procedimientos de determinación de proteínas y extracción de extraíbles. Todos estos son interferentes de técnica y pueden llegar a sobreestimar el porcentaje de lignina. Se hace necesario que en los cálculos se tenga en cuenta el porcentaje de proteína. Además es necesario que cada uno de los pasos de este protocolo se realice con los instrumentos adecuados.

## 8. CONCLUSIONES

Se logró encontrar las condiciones óptimas para la producción de la enzima lacasa recombinante de la cepa *Pichia pastoris* X33 POXA 1B de *Pleurotus ostreatus* en residuo crisantemo.

El cobre proporcionado por el residuo crisantemo fue suficiente como cofactor de la actividad lacasa, evitándose así la adición de  $\text{CuSO}_4$ .

En el medio de cultivo que poseía glucosa 3% (p/v), peptona y extracto de levadura 1% (p/v) a las 168 horas de cultivo, fueron los factores que más influenciaron y tuvieron mejor interacción para generar la respuesta a la mayor actividad reportada.

Se logró verificar la técnica de hidrólisis ácida para la determinación del porcentaje de lignina en una muestra vegetal

## 9. RECOMENDACIONES

De acuerdo con el mejor tratamiento encontrado, se recomienda hacer evaluación del proceso de degradación del crisantemo a través de la determinación del porcentaje de lignina removido. Para esto, se sugiere evaluarlo con la cepa *Pichia pastoris* X33/pGAPZ $\alpha$ A-LaccPost-Stop que produce la lacasa recombinante POXA 1B, o con el extracto enzimático lacasa directamente en el residuo de crisantemo; todo esto con el fin de favorecer la cuantificación de lignina, evitando de esta manera aumentar el porcentaje de proteínas presentes en la muestra.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Asocolflores (2010) Global Reporting Initiative (GRI). [www.asocolflores.org](http://www.asocolflores.org).
- Asocolflores, Ministerio de Medio Ambiente y Sociedad de Agricultores de Colombia. (2002). Guía ambiental para la floricultura. [www.minambiente.gov.co/documentos/floricultor.pdf](http://www.minambiente.gov.co/documentos/floricultor.pdf).
- Ballat M (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Convers Manage* 52:858–875
- Behera S, Arora R, Nandhagopal N, Kumar S (2014) Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 36:91–106
- Busto-Flores (2009) La problemática de los desechos sólidos. *Economía* 27: 121-144
- Doherty W, Mousavioun P, Fellows C (2011) Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Industrial Crops and Products* 33: 259–276
- Galhaupa C, Wagner H, Hinterstoisser B, Haltrich D (2002) Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology* 30 (4): 529–536
- Godliving Y (2012) Lignocellulolytic enzymes from tropical fungi: Types, substrates and applications. *Scientific Research and assays* 7 (15): 1544 - 1555
- Hong F, Meinander NQ, Jönsson LJ (2002) Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* 79(4):438-49
- Huijgen WJJ, Telysheva G, Arshanitsa A, Gosselink RJA, de Wild PJ (2014) Characteristics of wheat straw lignins from ethanol-based organic solvent treatment. *Industrial Crops and Products* 59(0): 85-95.
- Jung YH, Park HM, Park Y-C, Park K, Seo J-H, Kim KH (2015) Mimicking the Fenton reaction-induced wood decay by fungi for pretreatment of lignocellulose. *Bioresource Technology* 179(0): 467-472
- Kalia S, Thakur K, Kumar A, Celli A (2014a). Laccase-assisted surface functionalization of lignocellulosics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 102(0): 48-58.
- Kalia S, Thakur K, Kumar A, Celli A (2014b). Laccase-assisted surface functionalization of lignocellulosics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 102(0): 48-58.
- Lee K, Kalyani D, Tiwari MK, Kim T, Dhiman SS, Lee J, Kim I (2012) Enhanced enzymatic hydrolysis of rice straw by removal of phenolic compounds using a novel laccase from yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* 123(0): 636-645.
- Maijala P, Mattinen M, Nousiainen P, Kontro J, Asikkala J, Sipilä J, Viikari L (2012) Action of fungal laccases on lignin model compounds in organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 76(0): 59-67.
- Martínez ÁT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, Río José (2005) Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8: 195-204

- Mate DN, Alcalde M (2015) Laccase engineering: From rational design to directed evolution. *Biotechnology Advances* 33 (2015) 25–40
- Mielenz JR (2001) Ethanol production from biomass: Technology and commercialization status. *Current Opinion in Microbiology* 4(3): 324-329.
- Miller G(1959) Use of Dinitrosalicylic Acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426 – 428.
- Morales M, Quintero J, Conejeros R, Aroca G (2015) Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Environmental impacts and energy balance. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 42(0): 1349-1361.
- Moreno AD, Ibarra D, Fernández JL, Ballesteros M (2012) Different laccase detoxification strategies for ethanol production from lignocellulosic biomass by the thermotolerant yeast *kluveromyces marxianus* CECT 10875. *Bioresource Technology* 106(0): 101-109.
- Poutou RA, Amador E, Candelario M. (1994) Banco de Células Primario: "Caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes. *Biotecnología Aplicada*. 11: 55 - 59.
- Quevedo-Hidalgo BE (2011) Evaluación de la degradación de residuos de floricultura para la obtención de azúcares con el uso de tres hongos lignocelulolíticos. Tesis Doctorado. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional, Colombia.
- Quevedo-Hidalgo B, Narváez-Rincón P, Pedroza-Rodríguez A, Velásquez-Lozano M (2012) Degradation of *Chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflora*) wastes by *Pleurotus ostreatus* for the production of reducing sugars. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 17:1103-1112
- Quevedo – Hidalgo B, Pedroza-Rodríguez A, Velásquez-Lozano M (2015) Production of lignocellulolytic enzymes from floriculture residues using *Pleurotus ostreatus*. *Universitas Scientiarum*. 20 (1): 117-127
- Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R, Delgado-Boada JM (2013) Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews* 27 (3–4): 67-82
- Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poveda-Cuevas SA, Reyes-Guzmán EA, Poutou-Piñales RA, et al. (2015) Computational Analysis and Low-Scale Constitutive Expression of Laccases Synthetic Genes GILCC1 from *Ganoderma lucidum* and POXA 1B from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris*. *PLoS ONE* 10(1): 1-21
- Ronne H (1995) Glucose repression in fungi. *Trends Genet* 11: 12–17
- Shen F, Zeng Y, Deng S, Li Y (2011). Effects of Vegetable & Flower Residues Returning with Compound Microorganism on Soil Nutrients Release and Crop Yield. *Procedia Environmental Sciences* 11 Part B: 774–781.
- Singh R, Shukla A, Tiwari S, Srivastava M (2014). A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 32(0): 713-728
- Sitarz AK, Mikkelsen JD, Højrup P, Meyer AS (2013). Identification of a laccase from *ganoderma lucidum* CBS 229.93 having potential for enhancing cellulase catalyzed lignocellulose degradation. *Enzyme and Microbial Technology* 53(6–7): 378-385.

- Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Crocker D (2011) Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass, Technical Report. NREL/TP-510-42618, *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*.
- Sluiter A, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D (2008) Determination of Extractives in Biomass, Technical Report. NREL/TP-510-42619, *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*.
- Songulashvili G, Elisashvili V, Wasser SP, Nevo E, Hadar Y (2007) Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology* 41 (2): 57-61
- Tinoco R, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R (2001) Kinetic differences of purified laccase from six *P. ostreatus* strains. *Letter Applied Microbiology* 32: 331-335.
- Tinoco R, Acevedo A, Galindo E, Serrano-Carreño L (2011) Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38:531-40
- Van Dyk JS, Pletschke BI (2012) A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances* 30(6): 1458-1480.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition.
- Wu Y, Nian D (2014) Production optimization and molecular structure characterization of a newly isolated novel laccase from *fusarium solani* MAS2, an anthracene-degrading fungus. *International Biodeterioration & Biodegradation* 86, Part C(0): 382-389.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Resultado del análisis ANOVA lacasa a las 72 horas de muestreo.

**ANOVA for selected factorial model**  
**Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]**

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	2,76E+09	6	4,59E+08	119.62	< 0.0001
significant					
A-Glucosa	2,07E+09	1	2,07E+09	538.47	< 0.0001
B-Fuente de N	30031.68	1	30031.68	7.82	0.0124
C-Inóculo	2,50E+08	1	2,50E+08	65.14	< 0.0001
AB 1.923E+005	1	1,92E+08	50.07	< 0.0001	
AC 2.021E+005	1	2,02E+08	52.62	< 0.0001	
BC 13793.76	1		3.59	0.0752	
Residual	65282.05	17	3840.12		
Lack of Fit	65282.05	1	65282.05		
Pure Error	0.000	16	0.000		
Cor Total	2,82E+09	23			

The Model F-value of 119.62 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.

In this case A, B, C, AB, AC are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant.

If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model

Std. Dev	61.97	R-Squared	0.9769
Mean	953.65	Adj R-Squared	0.9687
C.V. %	6.50	Pred R-Squared	0.9539
PRESS	1,30E+08	Adeq Precision	30.424

**Anexo 2.** Resultado del análisis ANOVA lacasa a las 168 horas de muestreo.

**ANOVA for selected factorial model**  
**Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]**

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	1,05E+10	6	1,74E+09	737.68	< 0.0001
significant					
A-Glucosa	8,77E+09	1	8,77E+09	3713.83	< 0.0001
B-Fuente de N	2,16E+08	1	2,16E+08	91.53	< 0.0001
C-Inóculo	55557.55	1	55557.55	23.52	0.0002
AB 1.923E+005	1	7,64E+08	323.56	< 0.0001	
AC 2.021E+005	1	1,55E+08	65.39	< 0.0001	
BC 13793.76	1	4,92E+08	208.25	< 0.0001	
Residual	40163.60	17	2362.56		
Lack of Fit	40163.60	1	40163.60		
Pure Error	0.000	16	0.000		
Cor Total	1,05E+10	23			

The Model F-value of 737.68 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.

In this case A, B, C, AB, AC, BC are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant.

If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model

Std. Dev	48.61	R-Squared	0.9962
Mean	1170.22	Adj R-Squared	0.9948
C.V. %	4.15	Pred R-Squared	0.9924
PRESS	80049.25	Adeq Precision	66.908

