



**Producción a escala piloto (10 L) y caracterización de un
concentrado enzimático de rPOXA 1B para la remoción de
colorantes**

Leidy Diana Ardila Leal Biól., M.Sc.

**Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Doctorado en Ciencias Biológicas
Bogotá D.C.
Enero de 2021**

Producción a escala piloto (10 L) y caracterización de un concentrado enzimático de rPOXA 1B para la remoción de colorantes

Leidy Diana Ardila Leal Biól., M.Sc.

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias Biológicas

Director

Raúl Alberto Poutou Piñales, Bq., M.Sc., Ph.D.

Codirectoras

Aura Marina Pedroza Rodríguez, Bact., M.Sc., Ph.D.

Balkys Esmeralda Quevedo Hidalgo, Ing. Q., M.Sc., Ph.D

Asesor

Johan Fabian Galindo Cruz, Quim., M.Sc., Ph.D

Pedro A. Monterrey, Mat., Ph.D.

Laboratorio de Biotecnología Molecular

Laboratorio de Microbiología Ambiental y Suelos

Laboratorio de Biotecnología Aplicada

Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI)

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Doctorado en Ciencias Biológicas

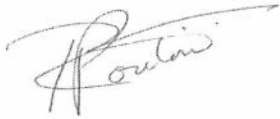
Bogotá D.C.

Enero de 2021

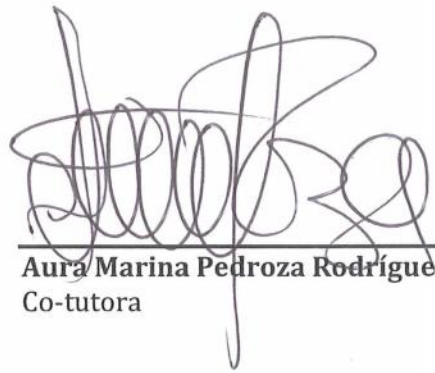
Producción a escala piloto (10L) y caracterización de un concentrado enzimático de rPOXA 1B para la remoción de colorantes

Leidy Diana Ardila Leal Biól., M.Sc.

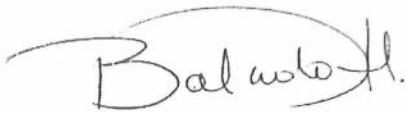
Aprobado



Raúl Alberto Poutou Piñales, Ph.D
Tutor



Aura Marina Pedroza Rodríguez, Ph.D.
Co-tutora



Balkys Esmeralda Quevedo Hidalgo, Ph.D.
Co-tutora

Firmado digitalmente
por MOLDES MOREIRA
DIEGO - 52497913E
Fecha: 2021.02.18
'19:26:53 +01'00



Diego Moldes Moreira, Ph.D.
Jurado

Blanca Estela Barragán Huertas, Ph.D.
Jurado

Oswaldo Ramos Monroy, Ph.D.
Jurado

Nesly Loango Chamorro, Ph.D.
Jurado

Sol Milena Mejía, Ph.D.
Jurado

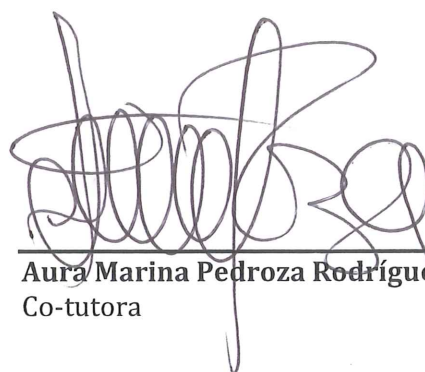
Producción a escala piloto (10L) y caracterización de un concentrado enzimático de rPOXA 1B para la remoción de colorantes

Leidy Diana Ardila Leal Biól., M.Sc.

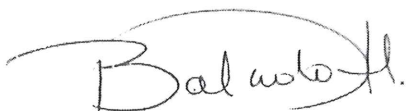
Aprobado



Raúl Alberto Poutou Piñales, Ph.D
Tutor

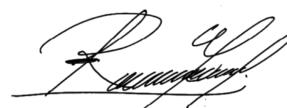


Aura Marina Pedroza Rodríguez, Ph.D.
Co-tutora



Balkys Esmeralda Quevedo Hidalgo, Ph.D.
Co-tutora

Blanca Estela Barragán Huertas, Ph.D.
Jurado



Oswaldo Ramos Monroy, Ph.D.
Jurado

Diego Moldes Moreira, Ph.D.
Jurado

Nesly Loango Chamorro, Ph.D.
Jurado

Sol Milena Mejía, Ph.D.
Jurado

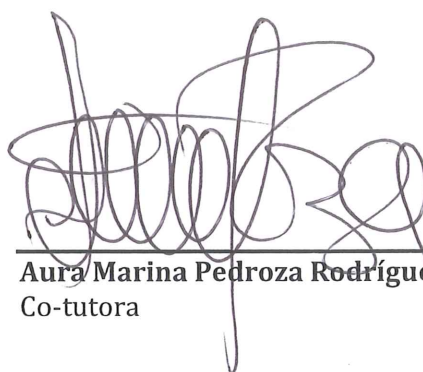
Producción a escala piloto (10L) y caracterización de un concentrado enzimático de rPOXA 1B para la remoción de colorantes

Leidy Diana Ardila Leal Biól., M.Sc.

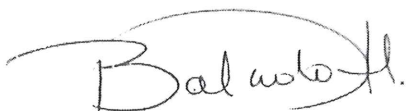
Aprobado



Raúl Alberto Poutou Piñales, Ph.D
Tutor



Aura Marina Pedroza Rodríguez, Ph.D.
Co-tutora



Balkys Esmeralda Quevedo Hidalgo, Ph.D.
Co-tutora

Blanca Estela Barragán Huertas, Ph.D.
Jurado

Diego Moldes Moreira, Ph.D.
Jurado

Oswaldo Ramos Monroy, Ph.D.
Jurado



Nesly Loango Chamorro, Ph.D.
Jurado

Sol Milena Mejía, Ph.D.
Jurado

Producción a escala piloto (10L) y caracterización de un concentrado enzimático de rPOXA 1B para la remoción de colorantes

Leidy Diana Ardila Leal Biól., M.Sc.

Aprobado

Raúl Alberto Poutou Piñales, Ph.D
Tutor

Aura Marina Pedroza Rodríguez, Ph.D.
Co-tutora



Balkys Esmeralda Quevedo Hidalgo, Ph.D.
Co-tutora

Blanca Estela Barragán Huertas, Ph.D.
Jurado

Diego Moldes Moreira, Ph.D.
Jurado

Oswaldo Ramos Monroy, Ph.D.
Jurado

Nesly Loango Chamorro, Ph.D.
Jurado

Sol Milena Mejía, Ph.D.
Jurado

Producción a escala piloto (10L) y caracterización de un concentrado enzimático de rPOXA 1B para la remoción de colorantes

Leidy Diana Ardila Leal Biól., M.Sc.

Aprobado

Raúl Alberto Poutou Piñales, Ph.D
Tutor

Aura Marina Pedroza Rodríguez, Ph.D.
Co-tutora


Balkys Esmeralda Quevedo Hidalgo, Ph.D.
Co-tutora

Blanca Estela Barragán Huertas, Ph.D.
Jurado

Diego Moldes Moreira, Ph.D.
Jurado

Oswaldo Ramos Monroy, Ph.D.
Jurado

Nesly Loango Chamorro, Ph.D.
Jurado


Sol Milena Mejía, Ph.D.
Jurado

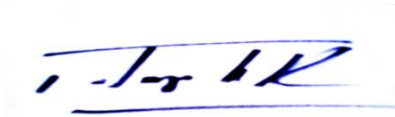
Producción a escala piloto (10L) y caracterización de un concentrado enzimático de rPOXA 1B para la remoción de colorantes

Leidy Diana Ardila Leal Biól., M.Sc.



Concepción Judith Puerta Bula, Ph.D

Decana
Facultad de Ciencias



Alba Alicia Trespalacios Rangel, Ph.D.

Directora de Posgrado
Facultad de Ciencias

Bogotá, febrero de 2021

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 velará por qué 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 a mis padres por ser partícipes de mi formación profesional, apoyándome en todos mis emprendimientos y proyectos de vida, inculcándome que lo importante en la vida es el bienestar familiar, la confianza y apoyar a la persona que lo necesita en los duros momentos de la vida. Aunque mi nona ya no está conmigo, yo sé que desde el cielo siempre me cuida y protege. De ella aprendí muchas cosas, una de ellas fue a hacer manualidades, cuyos proyectos (tejer) que necesitaban paciencia y dedicación con resultados después de muchas horas de trabajo, son parte de las enseñanzas que me permitieron culminar con éxito mi proyecto de Doctorado. Agradezco a mis hermanas, Carolina e Iris por el apoyo en el inicio de mis estudios, por los detalles y por estar en los momentos más importantes de mi vida.

Agradezco a Carlos, mi esposo y compañero de aventuras, quien comparte mis gustos académicos y ha estado conmigo en todas las etapas académicas de mi vida, soportando la distancia y los encuentros programados con meses de anticipación. Él siempre estuvo apoyándome moralmente durante los momentos de estrés o de desánimo cuando algo no salía como se tenía planeado y se alegraba y me felicitaba cuando mis resultados eran buenos. Además, durante la etapa de escritura de mi tesis casi siempre fue mi chef personal y en época de pandemia soportó estar encerrado en un apartamento muy pequeño en Bogotá durante 4 meses, sólo por estar a mi lado.

A mi tutor Raúl Poutou quien, además, de las enseñanzas profesionales, me enseñó a ver la vida de forma más optimista; la ideología de siempre correr al inicio para no estar estresado al final, creo que me sirvió mucho. Sin embargo, creo que nunca alcanzaré su velocidad de trabajo. Me demostró que las metas se logran con perseverancia y trabajo diario y que las deficiencias se pueden mejorar con esfuerzo continuo. A mi co-tutora Aura

Pedroza, quien siempre estuvo atenta en los procesos de laboratorio y me animo y felicitó en cada uno de mis logros durante el doctorado. A mi co-tutora Balkys Quevedo, quien en los momentos de estrés y presión era la persona más tranquila que conozco. En conjunto todos me enseñaron el trabajo en equipo. Al profesor Johan Galindo a quien conocí cuando necesité iniciar los análisis computacionales, su aporte fue esencial en el desarrollo de mi tesis y le agradezco la paciencia y la dedicación para explicarme muchas cosas nuevas que permitieron culminar mi trabajo.

A Claudia Rivera por enseñarme muchos de los procesos en el inicio de mis estudios, por ser una amiga que escucha, comprende y aconseja para que yo pueda cumplir todas mis metas. A Sandra Rincón por transmitirme la paciencia que algunas veces me faltaba, por ser una excelente compañera de cubículo, por soportar mi música y convertirse en una muy buena amiga. El grupo de apoyo y relax que conformamos me enseñaron la calidad humana de cada una y aunque hace mucho tiempo no nos vemos a causa de la pandemia siempre las recuerdo y espero que nuestros encuentros de vino, queso y frutas se repita una vez más.

Aún hay muchas personas a las que me gustaría agradecerles el apoyo y las palabras de aliento cuando conocieron el proyecto académico que emprendía y a aquellas personas que lo hicieron durante el transcurso. Sin embargo, son tantas personas que no podría nombrarlas a todas. A todos muchas gracias por apoyar mi proyecto académico y personal.

Cuando inicié el doctorado nunca pensé que el proceso sería tan gratificante, llegue siendo una persona con muchas expectativas que se cumplieron. El Doctorado para mí fue un proceso continuo que reveló lo que soy y lo que puedo ser, permitiéndome conocer mis habilidades y mis debilidades, demostrándome que con perseverancia todos los objetivos se cumplen.

Tabla de contenidos

Resumen	XV
Capítulo 1. Descripción general de la tesis.....	1
1.1 Introducción.....	3
1.2 Planteamiento del problema.....	3
1.3 Justificación.....	6
1.4 Antecedentes del grupo de investigación.....	9
1.5 Objetivo general	10
<i>1.5.1 Objetivos específicos</i>	<i>10</i>
1.6 Descripción general de la metodología.....	10
1.7 Referencias	12
Capítulo 2. Marco teórico.....	18
2.1 Introducción	21
2.2 Colorantes y clasificación	24
2.3 Historia de los colorantes.....	26
2.4 Industrias y sectores que aplican colorantes sintéticos.....	32
2.5 Impacto de los colorantes sintéticos sobre el medio ambiente.....	34
2.6 Tratamientos de aguas residuales coloreadas.....	38
2.7 Lacasas.....	44
2.8 Conformación del centro activo de las lacasas.....	45
2.9 Mecanismo catalítico de la lacasas	48
2.10 Potencial redox en las lacasas	49
2.11 Estabilidad de las lacasas	51
2.12 Características de la Lacasa POXA 1B	53
2.13 Producción y expresión heteróloga de lacasas fúngicas.....	53
2.14 Aplicaciones biotecnológicas de las lacasas	56
2.14.1 Degradación de colorantes sintéticos por lacasas.....	60
2.15 Conclusiones	67
2.16 Referencias	68

Capítulo 3. Estandarización de las condiciones de ensayo para detección de la actividad enzimática de la lacasa rPOXA 1B.....	87
Abreviaturas.....	88
3.1 Introducción	89
3.2 Materiales y métodos.....	94
3.2.1 Cepa	94
3.2.2 Sobrenadante usando en los diseños experimentales	94
3.2.3 Optimal Experimental Designs (OED).....	94
3.2.4 “One Factor Experimental Design (OFED)” para la detección de actividad enzimática a pH más bajo en tampón acetato y citrato-fosfato	95
3.2.5 Comparación de medias	96
3.2.6. Ensayo de actividad lacasa en tampón Britton-Robinson a pH 3.0 y 4.0 ± 0.2	96
3.2.7 Técnicas analíticas para la detección de la actividad enzimática.....	96
3.2.7.1 <i>Detección de la actividad enzimática (UL⁻¹) usando el tampón acetato</i>	<i>97</i>
3.2.7.2 <i>Actividad enzimática (UL⁻¹) usando tampón citrato</i>	<i>97</i>
3.2.7.3 <i>Actividad enzimática (U L⁻¹) usando los tampones citrato-fosfato y Britton-Robinson.....</i>	<i>97</i>
3.2.8 Caracterización cinética de rPOXA 1B usando la detección de actividad lacasa seleccionada en la comparación de medias.....	98
3.2.9. Modelado por homología y parametrización del centro activo de POXA 1B98	
3.2.10 Acoplamiento molecular (Docking) entre ABTS y POXA1B.....	99
3.3 Resultados	101
3.3.1 “Optimal Experimental Design (OED)” de tampón acetato y citrato.....	101
3.3.2 Análisis a pH bajo en tampón acetato y en tampón citrato-fosfato	102
3.3.3 Comparación de medias	103
3.3.4 Análisis de actividad lacasa en tampón Britton-Robinson a pH 3.0 y 4.0 ± 0.2	104
3.3.5 Caracterización cinética de rPOXA 1B en tampón citrato	105
3.3.6 Modelado por homología y parametrización del centro activo de POXA 1B	106
3.3.7 Acoplamiento molecular (Docking) entre ABTS y POXA1B.....	109

3.4 Discusión	111
3.4.1 “Optimal Experimental Design” para tampón acetato y citrato	111
3.4.2 Actividad enzimática a pH bajo en tampón acetato y en tampón citrato- fosfato	115
3.4.3 Actividad enzimática a pH 3.0 y 4.0 en el tampón Britton-Robinson	115
3.4.4 Caracterización cinética de rPOXA 1B en tampón citrato	116
3.4.5 Modelado de POXA 1B por homología y parametrización del centro activo	116
3.4.6 Acoplamiento molecular (Docking) entre ABTS y POXA1B.....	117
3.5 Conclusiones	121
3.6 Referencias	122

Capítulo 4. Producción de rPOXA 1B en biorreactor de 10 L usando medio previamente mejorado

4.1 Introducción	131
4.2 Materiales y métodos	133
4.2.1 Cepa	133
4.2.2 Preparación del inóculo.....	133
4.2.3 Producción en biorreactor a escala 10 L.....	133
4.2.4 Comparación de actividad lacasa usando tampón citrato o tampón acetato	134
4.2.5 Técnicas analíticas	134
4.2.5.2 <i>Ensayo de actividad lacasa usando el método de Tinoco et al. (2001)</i>	134
4.2.5.3 <i>Ensayo de actividad lacasa usando tampón citrato</i>	135
4.2.5.4 <i>Determinación de la concentración de proteínas totales extracelulares</i>	135
4.2.5.5 <i>Determinación de la concentración azúcares reductores totales</i>	136
4.2.5.6 <i>Determinación de biomasa seca</i>	136
4.3 Resultados	137
4.3.1 Producción en biorreactor a escala de 10 L y comparación de actividad lacasa rPOXA 1B usando tampón citrato y tampón acetato	137
4.4 Discusión	139
4.5 Conclusiones	143
4.6 Referencias	144

Capítulo 5. Optimización estadística a escala de laboratorio de un medio de bajo costo para la producción de rPOXA 1B 148

5.1 Introducción	150
5.2 Materiales y métodos	152
5.2.1 Cepa.....	152
5.2.2 Reactivación de la cepa y preparación del inóculo.....	152
5.2.3 Selección de fuentes de nitrógeno de bajo costo.....	152
5.2.4 Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) para el diseño de un medio de cultivo de bajo costo.....	154
5.2.4.1 <i>Diseño Central Compuesto-1 (CCD-1)</i>	154
5.2.4.2 <i>Diseño Central Compuesto-2 (CCD-2)</i>	154
5.2.5 Diseño One Factor (OFED).....	155
5.2.6 Análisis estadístico CCD-1, CCD-2 y OFED.....	156
5.2.7 Técnicas analíticas.....	156
5.2.7.1 <i>Determinación de azúcares reductores residuales</i>	156
5.2.7.2 <i>Ensayo actividad enzimática</i>	156
5.2.7.3 <i>Determinación de proteínas totales</i>	157
5.2.7.4 <i>Determinación de Carbono total (TC, gL⁻¹), Nitrógeno total (NT, gL⁻¹) y relación Carbono/Nitrógeno inicial (C/N)₀</i>	157
5.2.8 Análisis de costos directo.....	158
5.3 Resultados	159
5.3.1 Selección de fuentes de nitrógeno económicas.....	159
5.3.2 Diseño Central Compuesto-1 (CCD-1).....	160
5.3.4 Diseño Central Compuesto-2 (CCD-2).....	164
5.3.5 Diseño Experimental One Factor (OFED).....	167
5.3.6 Análisis de costos directo.....	168
5.4 Discusión	170
5.4.1 Selección de las fuentes económicas de nitrógeno.....	170
5.4.2 Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) para el diseño de un medio de cultivo de bajo costo.....	171
5.4.2.1 <i>Diseño Central Compuesto-1 (CCD-1)</i>	171
5.4.2.2 <i>Diseño Central Compuesto-2 (CCD-2)</i>	175

5.4.2.3 One Factor Desing (OF).....	176
5.4.2.4 Análisis de costos directo.....	178
5.5 Conclusiones	179
5.6 Referencias	180
5.7 Material Suplementario	185

Capítulo 6. Estudio de estabilidad a tiempo real y acelerada del concentrado de la lacasa rPOXA 1B correlacionado con dinámica molecular 220

6.1 Introducción	222
6.2 Materiales y métodos	225
6.2.1 Ensayo piloto de estabilidad.....	225
6.2.2 Concentración del sobrenadante de rPOXA 1B producido en biorreactor de 10 L.....	225
6.2.3 Diseño y condiciones del estudio de estabilidad de rPOXA 1B.....	226
6.2.4 Estabilidad a tiempo real del concentrado de rPOXA 1B.....	228
6.2.5 Análisis de estabilidad acelerada y parámetros termodinámicos de rPOXA 1B.....	228
6.2.6 Determinación de la actividad lacasa.....	229
6.2.7 Constantes cinéticas enzimáticas aparentes.....	230
6.2.8 Simulaciones de Dinámica Molecular de POXA 1B a diferentes temperaturas.....	230
6.2.9 Análisis de Componentes Principales.....	231
6.3 Resultados	232
6.3.1 Ensayo Piloto De Estabilidad.....	232
6.3.2 Concentración del sobrenadante de rPOXA 1B producido en biorreactor de 10 L.....	232
6.3.3 Estabilidad a tiempo real del concentrado de rPOXA 1B.....	233
6.3.4 Análisis de estabilidad acelerada y parámetros termodinámicos de rPOXA 1B.....	235
6.3.5 Efecto de la exposición a diferentes temperaturas sobre V_{max} y K_M (Aparentes).....	238
6.3.6 Simulaciones de dinámica molecular y análisis de PCA.....	239
6.4 Discusión	242

6.4.1 Ensayo piloto de estabilidad	242
6.4.2 Concentración del sobrenadante de rPOXA 1B producido en biorreactor de 10 L	243
6.4.3 Análisis de estabilidad a tiempo real del concentrado de rPOXA 1B	243
6.4.4 Análisis de estabilidad acelerada y parámetros termodinámicos de rPOXA 1B	246
6.4.5 Efecto de la exposición a diferentes temperaturas sobre V_{max} y K_M (aparentes)	248
6.4.6 Simulaciones de dinámica y análisis de componentes principales.....	249
6.5 Conclusiones.....	252
6.6 Referencias.....	254
6.7 Material Suplementario	260

Capítulo 7. Tratabilidad de agua residual coloreada de laboratorio (CLWW) usando concentrado de rPOXA 1B producido en medio mejorado

7.1 Introducción	267
7.2 Materiales y Métodos.....	269
7.2.1. Agua residual coloreada de laboratorio (CLWW) coloreada	269
7.2.2. Concentrado de la enzima recombinante POXA 1B (rPOXA 1B)	269
7.2.3 Tratamiento secundario del CLWW (1,500.00 UC) con el concentrado de la enzima libre rPOXA 1B (escala piloto).....	269
7.2.4 Ensayos de germinación de <i>Lactuca sativa</i> L. y <i>Lolium perenne</i> L. “in vitro”	270
7.2.5 Técnicas analíticas.....	270
7.2.5.1. Espectrofotometría UV/VIS.....	270
7.2.5.2. Determinación de unidades de color (UC)	270
7.2.5.3. Determinación de SST.....	271
7.2.5.4. Determinación de DQO	271
7.2.5.5. Determinación de COT, CI, CT y NT.....	271
7.2.5.6. Determinación de pH.....	271
7.2.5.7. Determinación de la actividad lacasa	271
7.3 Resultados	273

7.3.1 Caracterización UV/VIS del CLWW y sus componentes teóricos.....	273
7.3.2 Tratamiento secundario del CLWW (1,500.00 UC) con el concentrado de la enzima rPOXA 1B (reactor 15 L).....	273
7.3.3 Ensayos de germinación.....	277
7.4 Discusión	278
7.4.1. Tratamiento secundario del CLWW (1,500.00 UC) con el concentrado de la enzima rPOXA 1B (escala piloto).....	278
7.4.2 Ensayos de germinación “ <i>in vitro</i> ” de <i>Lactuca sativa</i> L., y <i>Lolium perenne</i> L.	280
7.5 Conclusiones	282
7.6 Referencias	283
7.7 Material Suplementario	286

Resumen

Introducción. Las lacasas (E.C. 1.10.3.2) son enzimas oxidoreductasas multicobre de gran importancia e interés biotecnológico, debido a su alto potencial oxidativo y a que durante la catálisis generan H₂O en lugar de H₂O₂. Las lacasas son útiles para remover (a través de la decoloración) colorantes sintéticos, oxidar compuestos fenólicos y degradar pesticidas, entre otros. No obstante, para asumir la producción, comercialización y uso a gran escala de las lacasas, es importante conocer la estabilidad y la vida media de la enzima ($t_{1/2}$); lo que permitiría proponer condiciones de uso y almacenamiento, ajustadas a las características y origen de cada enzima.

Objetivos. Producir a escala de 10 L, la enzima recombinante rPOXA 1B de *Pleurotus ostreatus* expresada en *Pichia pastoris* para la remoción de color en agua residual coloreada de laboratorio (CLWW) y conocer la estabilidad a tiempo real y acelerada de la misma.

Metodología. Se utilizó la cepa recombinante *Pichia pastoris* X33/pGAPZaA-LaccPost-Stop (Clon 1) para la expresión de la lacasa POXA 1B (rPOXA 1B) de *Pleurotus ostreatus*. Se estandarizó la técnica para la detección de la actividad enzimática a través de dos diseños experimentales, un “D-optimal Design” y un “D-optimal Design (irregular)” para identificar las mejores condiciones de detección en tampón acetato y tampón citrato respectivamente. El complejo enzima-sustrato fue evaluada mediante análisis de acoplamiento molecular empleando Autodock Vina. Luego se llevó a cabo la producción de 3 lotes de rPOXA 1B (L1, L3 y L4) en biorreactor a escala de 10 L con volumen efectivo de trabajo (VET) de 6 L, empleando un medio de cultivo previamente mejorado en nuestro grupo de investigación. Se optimizó (a escala de laboratorio) un medio de cultivo de bajo costo a través de la implementación de tres diseños experimentales; dos “Central Composite Design” (CCD-1 y CCD-2), seguidos de un “One Factor Experimental Design” (OFED). Se demostró (a escala de laboratorio) el efecto de

la adición de metanol (CH_3OH) después del agotamiento de la glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) para lo cual se utilizaron cuatro medios de cultivo diferentes con y sin adición de CH_3OH . Para los estudios de estabilidad a tiempo real (RTS) con duración de 1 año, se utilizó parte de los concentrados enzimáticos (impuros y sin preservantes) provenientes de los lotes L1, L3 y L4, para lo cual se implementaron cinco temperaturas teóricas, -30, 4, 25, 30, 35 y 40 °C, [243.15, 277.15, 298.15, 303.15, 308.15 y 313.15 K] y utilizando la ecuación de Arrhenius se evaluó la estabilidad acelerada (AS) del concentrado de rPOXA 1B. El RTS fue soportado computacionalmente con estudios de dinámica molecular (MD) a cuatro temperaturas diferentes (-32, 5, 25 y 41°C); [241, 278, 298 y 314 K] muy cercanas a las evaluadas experimentalmente. Otra parte de los concentrados enzimáticos de los lotes L1, L3 y L4 se utilizaron en la remoción de colorantes en aguas residuales coloreadas de laboratorios (CLWW) de prácticas e investigación de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia. Se realizaron tres procesos (P1, P2 y P3) de remoción, empleando CLWW a 1500 unidades de color (UC), en una Planta Piloto de Tratamiento que consta de un tanque de homogeneización, neutralización y mezcla de 20 L, seguido de un biorreactor de aireación prolongada (flujo turbulento y oxígeno de disolución $> 1 \text{ mgL}^{-1}$) de 15 L con 10 L de VET, a temperatura ambiente del laboratorio ($\sim 19 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) y con un tiempo de retención hidráulica de 72 h, seguido de dos filtros de arena cuarcítica. Durante el curso de la investigación y de acuerdo a la exigencia de cada metodología, se midió: actividad enzimática (UL^{-1}), concentración de proteínas (mg mL^{-1}), concentración de azúcares reductores (gL^{-1}), actividad específica (Umg^{-1}), biomasa (gL^{-1}), velocidad específica de crecimiento μ_x (h^{-1}), tiempo de duplicación t_d (h), velocidad máxima de reacción V_{max} (mM min^{-1}), constante de Michaelis-Menten K_M (mM), productividad ($\text{UL}^{-1}\text{h}^{-1}$), carbono total (CT) (mgL^{-1}), nitrógeno total (NT) (mgL^{-1}), relación carbono-nitrógeno C/N, constante de desactivación k_d (meses^{-1}), vida media $t_{1/2}$ (meses), energía de desactivación E_d (kJ mol^{-1}), variación de entalpía ΔH^* (kJ mol^{-1}), variación en la energía libre de Gibb's ΔG^* (kJ mol^{-1}), variación de entropía ΔS^* ($\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$), carbono inorgánico (CI) (mgL^{-1}), carbono orgánico total (COT) (mgL^{-1}),

demanda química de oxígeno (DQO) (mgL^{-1}), demanda biológica de oxígeno a los 5 días DBO_5 (mg L^{-1}), relación COT/NT, relación DQO/COT, pH, unidades de color UC e índice de germinación IG (%).

Resultados. El uso de tampón citrato incrementó la afinidad de rPOXA 1B por el sustrato (ABTS) con una K_M inferior a la del tampón acetato; las condiciones estandarizadas fueron $\text{pH } 3.0 \pm 0.2$; $\lambda_{420 \text{ nm}}$, 2 mM ABTS y los análisis de acoplamiento molecular obtuvo un complejo de unión enzima sustrato con una energía libre de unión de -6.4 KJ mol^{-1} . En biorreactor de 10 L con el medio previamente mejorado se obtuvo $8,506.95 \pm 1,993.65 \text{ UL}^{-1}$ con actividad específica de $213.64 \pm 55.83 \text{ Umg}^{-1}$ a las 192 h de cultivo, usando tampón citrato. Después de la optimización estadística secuencial se obtuvo un medio (20 gL^{-1} glucosa USP, 50 g L^{-1} proteína de soya aislada 90 % (p/p), 11.74 g L^{-1} extracto de malta, 4.91 gL^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.16 gL^{-1} CuSO_4 y 0.1 gL^{-1} cloranfenicol) 89.84 % menos costoso, con una actividad enzimática de $12,877.3 \pm 481.2 \text{ UL}^{-1}$ y actividad específica de $1324.58 \pm 114.19 \text{ U mg}^{-1}$ en 168 h, lo que significó un incremento en la actividad enzimática del 33.94 % con relación a los resultados en biorreactor de 10 L con medio mejorado. La adición de metanol después del agotamiento de la glucosa tuvo un efecto positivo sobre la actividad enzimática y se obtuvo $14,868.06 \pm 461.58 \text{ U L}^{-1}$ con actividad específica de $1597.6 \pm 76.28 \text{ U mg}^{-1}$ en 192 h utilizando el medio optimizado de bajo costo, para un incremento de 41 % de la actividad enzimática en comparación con el mismo medio sin adición de metanol. En el RTS se recuperó 101.16, 115.81, 75.23, 46.09, 5.81 y 4.83 % de la actividad enzimática relativa, a las diferentes temperaturas ensayadas. Los estudios de AS mostraron que el concentrado de rPOXA 1B se puede conservar a 240.98 ± 5.38 , 277.40 ± 1.32 o $297.53 \pm 3.88 \text{ K}$ con $t_{1/2}$ de 230.8, 46.2 y 12.6 meses, respectivamente. Los parámetros cinéticos y termodinámicos respaldaron la alta estabilidad de rPOXA 1B con bajas variaciones de K_M y V_{max} a temperaturas de 240.98 ± 5.38 y $297.53 \pm 3.88 \text{ K}$, E_d de $41.40 \text{ KJ mol}^{-1}$ y valores apropiados de ΔH , ΔG y ΔS . La MD mostró que las fluctuaciones en la estructura 3D de POXA 1B, específicamente en regiones bucle, coils or loops con aminoácidos hidrofílicos

o de polaridad intermedia, así como en algunos residuos, se incrementa con el aumento de la temperatura; pasando de 3 residuos fluctuantes (LEU¹⁵⁹, ALA³⁹¹ y ASP⁴²⁹) a 278 K a 6 residuos (THR¹⁶⁰, ASP²⁶⁶, GLU²⁹³, ALA³³⁴, ASP³⁴¹ y LEU⁴⁵⁹) a 298 K y a 9 residuos (ASP¹⁰¹, THR¹⁶⁰, GLY²⁶⁵, ASN²⁹⁷, ALA³³⁴, GLY³⁷⁰, ALA³⁹¹, PRO³⁹³ y ASP⁴³³) a 314 K. La remoción de color promedio del CLWW (1500 UC) fue de 96.75 % y se logró la reducción de los parámetros de descarga TOC, TC, DQO y DBO₅.

Conclusiones. Con el medio optimizado se aumentó la actividad enzimática 33 % con relación al medio previamente mejorado. Se demostró el efecto positivo de añadir CH₃OH al cultivo, después del agotamiento de la glucosa, lo que generó un incremento de 41 % en comparación con el medio sin metanol. Es importante destacar que la adición de metanol no es una opción amigable con el medio ambiente, ya que el concentrado enzimático se utiliza impuro y podría contener trazas de metanol, pero resulta de utilidad si se requiere la producción de la enzima pura para usos no ambientales, además, de que rompe con el hábito de utilizar estrictamente glucosa para la expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor *pGAP*, como sucede con la mayoría de los trabajos publicados. La lacasa rPOXA 1B es una enzima estable, lo cual fue demostrado experimental y computacionalmente con $t_{1/2}$ de 230.8, 46.2 ó 12.6 meses, si es conservada impura y sin preservantes a temperaturas de 240.98 ± 5.38 , 277.40 ± 1.32 o 297.53 ± 3.88 K respectivamente, lo cual tiene gran utilidad para los grandes productores. El tratamiento secundario de CLWW (1500 UC) con el concentrado de rPOXA 1B generó una remoción de color promedio de 96 % en 72 h de tratamiento con disminución de los parámetros de vertimiento.

Abstract

Introduction. Laccases (EC 1.10.3.2) are multi-copper oxidoreductase enzymes of great importance, and biotechnological interest, due to their high oxidative potential, and the fact that during catalysis they generate H₂O instead of H₂O₂. Laccases are useful for removing (by bleaching) synthetic dyes, oxidizing phenolic compounds, and degrading pesticides, among others. However, to assume the large-scale production, commercialization, and use of laccases, it is important to know the stability, and half-life ($t_{1/2}$) of the enzyme, which would allow proposing conditions of use, and storage, adjusted to the characteristics, and origin of each enzyme.

Objective. To produce at 10 L scale, the recombinant enzyme rPOXA 1B from *Pleurotus ostreatus* expressed in *Pichia pastoris* for the removal of color in colored laboratory wastewater (CLWW), and to know its real-time, and accelerated stability.

Methodology. The recombinant strain *Pichia pastoris* X33/*pGAPZaA-LaccPost-Stop* (Clone 1) was used for the expression of the laccase POXA 1B (rPOXA 1B) from *Pleurotus ostreatus*. The technique for the detection of enzymatic activity was standardized through two experimental designs, a "D-optimal Design", and a "D-optimal Design (irregular)" to identify the best detection conditions in acetate buffer, and citrate buffer, respectively. The enzyme-substrate complex was evaluated by molecular docking analysis using Autodock Vina. Then, the production of 3 batches of rPOXA 1B (L1, L3, and L4) was carried out in a bioreactor at 10 L scale, with an effective working volume (EWV) of 6L, using a previously improved culture medium in our group of investigation. A low-cost culture medium was optimized (on a laboratory scale) through the implementation of three experimental designs; two "Central Composite Design" (CCD-1, and CCD-2), followed by a "One Factor Experimental Design" (OFED). The effect of the addition of methanol (CH₃OH) after depletion of glucose (C₆H₁₂O₆) was demonstrated (at a laboratory scale) for which four different

culture media with, and without addition of CH₃OH were used. For the real-time stability studies (RTS) for 1 year, part of the enzyme concentrates (impure and without preservatives) from batch L1, L3, and L4 were used, for which five theoretical temperatures were implemented, - 30, 4, 25, 30, 35, and 40 °C, [243.15, 277.15, 298.15, 303.15, 308.15, and 313.15 K], and using the Arrhenius equation, the accelerated stability (AS) of the rPOXA 1B concentrate was evaluated. The RTS was computationally supported with molecular dynamics (MD) studies at four different temperatures (-32, 5, 25, and 41°C); [241, 278, 298, and 314 K] very close to those evaluated experimentally. Another part of the enzyme concentrates from bath L1, L3, and L4 were used in the removal of colorants in colored wastewater from laboratories (CLWW) of practices, and research of the Faculty of Sciences of the “Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, DC, Colombia”. Three removal processes (P1, P2, and P3) were carried out, using CLWW at 1500 color units (UC), in a Pilot Treatment Plant consisting of a 20 L homogenization, neutralization, and mixing tank, followed by a bioreactor prolonged aeration (turbulent flow, and dissolution oxygen > 1 mg L⁻¹) of 15 L with 10 L of EWV, at room temperature of the laboratory (~19 ± 3 °C), and with a hydraulic retention time of 72 h, followed of two quartzite sand filters. During the course of the research, and according to the requirement of each methodology, were measured: enzyme activity (UL⁻¹), protein concentration (mg mL⁻¹), reducing sugar concentration (gL⁻¹), specific activity (Umg⁻¹), biomass (gL⁻¹), specific growth rate μ_x (h⁻¹), doubling time t_d (h), maximum reaction rate V_{max} (mM min⁻¹), Michaelis-Menten constant K_M (mM), productivity (UL⁻¹h⁻¹), total carbon (TC) (mgL⁻¹), total nitrogen (NT), (mgL⁻¹), carbon-nitrogen C/N_{ratio}, deactivation constant k_d (months⁻¹), half-life $t_{1/2}$ (months), deactivation energy E_d (kJ mol⁻¹), enthalpy variation ΔH^* (kJ mol⁻¹), variation in Gibb's free energy ΔG^* (kJ mol⁻¹), entropy change ΔS^* (J mol⁻¹K⁻¹), inorganic carbon (CI) (mgL⁻¹), total organic carbon (TOC) (mgL⁻¹), chemical oxygen demand (COD) (mgL⁻¹), biological oxygen demand at 5 days BOD₅ (mgL⁻¹), TOC/NT_{ratio}, COD/TOC_{ratio}, pH, color units UC, and germination index GI (%).

Results. The use of citrate buffer increased the affinity of rPOXA 1B for substrate (ABTS) with a lower K_M than that obtained in acetate buffer; the standardized conditions were pH 3.0 ± 0.2 ; $\lambda_{420 \text{ nm}}$, 2 mM ABTS and molecular docking analysis yielded a binding free energy of -6.4 KJ mol^{-1} . In a 10 L bioreactor with the previously improved medium, $8,506.95 \pm 1,993.65 \text{ UL}^{-1}$ was obtained with a specific activity of $213.64 \pm 55.83 \text{ Umg}^{-1}$ at 192 h of culture, using citrate buffer. After sequential statistical optimization, a medium was obtained (20 gL^{-1} glucose USP, 50 gL^{-1} isolated soy protein 90 % (w/w), 11.74 gL^{-1} malt extract, 4.91 gL^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.16 gL^{-1} CuSO_4 , and 0.1 gL^{-1} chloramphenicol) 89.84 % less expensive, with an enzymatic activity of $12,877.3 \pm 481.2 \text{ UL}^{-1}$, and specific activity of $1324.58 \pm 114.19 \text{ Umg}^{-1}$ in 168 h, which meant an increase of 33.94 % of enzyme activity, in relation to the results obtained at 10 L bioreactor with an improved medium. The addition of methanol after depletion of glucose had a positive effect on the enzyme activity, and $14,868.06 \pm 461.58 \text{ UL}^{-1}$ was obtained with a specific activity of $1597.6 \pm 76.28 \text{ Umg}^{-1}$ in 192 h using the optimized low-cost medium, for a 41% increase in enzyme activity compared to the same medium without the addition of methanol. In the RTS, 101.16, 115.81, 75.23, 46.09, 5.81, and 4.83 % of the relative enzyme activity were recovered, at the different temperatures tested. AS studies showed that rPOXA 1B concentrate can be stored at 240.98 ± 5.38 , 277.40 ± 1.32 , or $297.53 \pm 3.88 \text{ K}$, with $t_{1/2}$ of 230.8, 46.2, and 12.6 months, respectively. The kinetic, and thermodynamic parameters supported the high stability of rPOXA 1B with low variations of K_M , and V_{max} at temperatures of 240.98 ± 5.38 , and $297.53 \pm 3.88 \text{ K}$, E_d of $41.40 \text{ KJ mol}^{-1}$, and appropriate values of ΔH , ΔG , and ΔS . The MD indicated that fluctuations in the 3D structure of POXA 1B, specifically in loop regions, coils or loops with hydrophilic or intermediate polarity amino acids, as well as in some residues, increases with increasing temperature; going from 3 fluctuating residues (LEU¹⁵⁹, ALA³⁹¹, and ASP⁴²⁹) at 278 K to 6 residues (THR¹⁶⁰, ASP²⁶⁶, GLU²⁹³, ALA³³⁴, ASP³⁴¹, and LEU⁴⁵⁹) at 298 K, and to 9 residues (ASP¹⁰¹, THR¹⁶⁰, GLY²⁶⁵, ASN²⁹⁷, ALA³³⁴, GLY³⁷⁰, ALA³⁹¹, PRO³⁹³, and ASP⁴³³) at 314 K. The average of color removal of the CLWW (1500

UC) was 96.75 %, and the reduction of the discharge parameters TOC, TC, COD, and BOD₅ was achieved.

Conclusions. With the optimized medium, the enzyme activity was increased by 33 % about the previously improved medium. The positive effect of adding CH₃OH to the culture, after depletion of glucose, was demonstrated, which generated an increase in enzyme activity of 41% compared to the medium without methanol. It is important to note that the addition of methanol is not an environmentally friendly option, since the enzyme concentrate is used impure, and may contain traces of methanol, but it is useful if the production of the pure enzyme is required for non-environmental uses. Furthermore, it breaks the habit of strictly using glucose for the expression of recombinant proteins under the control of the *pGAP* promoter, as is the case with most of the published works. Laccase rPOXA 1B is a stable enzyme, which was demonstrated experimentally, and computationally with $t_{1/2}$ of 230.8, 46.2 or 12.6 months, if it is preserved impure, and without preservatives at temperatures of 240.98 ± 5.38 , 277.40 ± 1.32 or 297.53 ± 3.88 K respectively, which is very useful for large scale producers. The secondary treatment of CLWW (1500 UC) with the rPOXA 1B concentrate generated an average of color removal of 96 % in 72 h of treatment with a decrease in the discharge parameters.

Capítulo 1. Descripción general de la tesis

Abreviaturas

ABTS: (2,2'azino bis (3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato))

CLWW: Agua residual coloreada de laboratorio. *Abreviatura en Inglés* (Colored laboratory wastewater)

HBT: (1-hidroxibenzotriazol)

rPOXA 1B: Lacasa recombinante de *Pleutorus ostreatus* expresada en *Pichia pastoris*.

1.1 Introducción

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son enzimas multi-cobre oxidasas que han sido encontradas en plantas, hongos, bacterias, algas e insectos; estas enzimas catalizan la oxidación de una amplia variedad de compuestos aromáticos orgánicos (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013); actividad enzimática que puede ser ampliada a compuestos no fenólicos con la adición de mediadores redox (Soares *et al.*, 2001; Camarero *et al.*, 2004; Forootanfar *et al.*, 2016). La producción heteróloga de la lacasa en menor tiempo y en concentraciones superiores a las secretadas naturalmente por los hongos es una estrategia para satisfacer la demanda industrial y ambiental, lo que permite su aplicación en la remoción de colorantes (entre otros usos reportados), (Singh *et al.*, 2016). Así como es importante determinar la acción de las lacasas sobre diferentes tipos de contaminantes, también es importante producir la enzima en medios de bajo costo para satisfacer la creciente demanda; por otra parte es importante estudiar las condiciones de almacenamiento que favorecen su estabilidad (Dedeyan *et al.*, 2000; Ihssen *et al.*, 2015).

1.2 Planteamiento del problema

Los procesos industriales generan efluentes contaminados con alta toxicidad, que en muchos lugares se descartan a los cuerpos de aguas superficiales, después de un tratamiento parcial insuficiente o sin tratar; causando efectos negativos al medio ambiente (Muhammad Bilal *et al.*, 2016). Dentro de los diferentes contaminantes, el agua residual con colorante es una de las problemáticas de mayor consideración (Yagub *et al.*, 2014). Los colorantes sintéticos se han convertido en un componente integral de las economías actuales, debido a la versatilidad, la estabilidad, la facilidad de preparación y los costos bajos. Son usados en diferentes industrias y procesos como en la industria textil, la farmacéutica, la alimentaria, la cosmética, la papelera y por los prestadores de servicio para tinciones biológicas (Rawat *et al.*, 2016; Rivera-Hoyos *et al.*, 2018; Tkaczyk *et al.*, 2020). No obstante, se desconoce la cantidad exacta de colorantes producidos y consumidos por todas las industrias y prestadores de servicio a nivel mundial (Forgacs *et al.*, 2004).

El banco mundial estima que entre 17 y 20 % de los contaminantes del agua provienen de la industria textil ([The World Bank, 2014](#)); pues se estima un consumo mundial de más de 10,000 toneladas/año, con reporte de pérdidas que varían entre el 1 y 10 % durante las operaciones de teñido y acabado ([Forgacs et al., 2004](#); [Yagub et al., 2014](#)). En la industria de alimentos los colorantes son aditivos de alta regulación ([Lehto et al., 2017](#)) y en el sector de prestadores de servicio (hospitales, universidades) son usados en procesos de tinciones biológicas o procedimientos médicos ([Gautam et al., 2007](#); [Shakir et al., 2010](#)). No obstante, aunque se reconoce que el agua residual generada contiene residuos de colorantes ([Hussain et al., 2019](#)), el porcentaje y/o el tipo de colorantes eliminados no son conocidos con exactitud, aumentando la problemática ambiental. En la industria de alimentos se reconoció que una empresa de bebidas gasificadas generó 1.72 L de agua residual por 1 L de bebida producida ([Alam et al., 2007](#)) y en industrias de confitería se reportó agua residual coloreada con hasta 263 mg PtCo L⁻¹ ([Benincá et al., 2013](#)). Así mismo, en prestadores de servicio como los hospitales se reporta el consumo agua entre 400 a 1200 L día⁻¹ cama⁻¹ que al ser descartado contiene residuos coloreados ([Gautam et al., 2007](#)).

Con la dependencia cada vez mayor de las industrias y del sector de prestadores de servicio por los colorantes se ha aumentado el nivel de descarga de efluentes coloreados en los cuerpos de agua; generando impactos negativos sobre el equilibrio ambiental y la salud humana, vegetal y animal, en particular para la biota acuática ([Rawat et al., 2016](#); [Hussain et al., 2019](#)). La descarga de agua coloreada, además, de ocasionar disminución del paso de la luz solar a través del agua, disminuyendo la actividad fotosintética y el oxígeno disponible para la biota de los cuerpos de agua superficiales ([Robinson et al., 2001](#); [Bisschops and Spanjers, 2003](#); [Holkar et al., 2016](#)), también es señalada de causar genotoxicidad y microtoxicidad ([Hussain et al., 2019](#)).

Los estándares ambientales a nivel mundial se han hecho más estrictos, promoviendo el uso de diversos métodos para lograr que el agua residual descargada sea lo más limpia posible y garantizar la sostenibilidad del medio ambiente (Hussain *et al.*, 2019; Lellis *et al.*, 2019). Los tratamientos físico-químicos para eliminar el color de los efluentes incluyen coagulación, floculación, filtración y adsorción por membranas, entre otros, pero se ha encontrado que estos tratamientos tienen el inconveniente de generar lodos, hacen difícil la regeneración de adsorbentes y saturan rápidamente las membranas (de Arruda Guelli Ulson de Souza *et al.*, 2010).

Últimamente los tratamientos e investigaciones se han encaminado al uso de microorganismos y/o enzimas para la bioremediación de las aguas residuales ya que es considerado un procesos ambientalmente amigable, debido a que no se utilizan compuestos químicos tóxicos (Deshmukh *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016). No obstante, el uso de microorganismos puede ser limitado, debido a que se pueden afectar por pH extremos y cargas elevadas de materia orgánica (lodos) que afectan el desempeño de los sistemas o unidades de tratamientos biológicos (Xiao *et al.*, 2015), los efluentes contienen trazas de metales como Cr^{3+} , As^{3+} , Cu^+ y Zn^{2+} que limitan su crecimiento, haciendo que la eliminación del contaminante sea lenta (Ghaly *et al.*, 2014), que no se logre la adaptación del microorganismo a las condiciones del agua residual (Yang *et al.*, 2012) y que se inhiba la biodegradación por transformación de compuestos de toxicidad baja a uno de toxicidad alta (Punzi *et al.*, 2015); lo que ha promovido el uso de enzimas para acelerar la velocidad de las reacciones de bioremedación (Singh *et al.*, 2016).

Las enzimas oxidoreductasas como las lacasas han sido estudiadas debido a su capacidad para atacar subunidades fenólicas de lignina (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013). No obstante, para dar respuesta a las necesidades ambientales y transferir la tecnología es importante la obtención de cantidades altas de lacasas (Songulashvili *et al.*, 2015). Las investigaciones enfocadas en la producción de lacasa a escala de biorreactor han sido

limitadas, lo que también ha llevado a realizar evaluaciones de degradación de colorantes a escalas muy bajas (0.2 – 30 mL), ([Hong et al., 2007](#); [Wang et al., 2016](#)), resultados que podrían ser insuficientes para los altos reportes de vertimientos con colorantes a escala mundial. Junto a la producción, también se requiere conocer las condiciones de almacenamiento de la enzima, ya que los productos enzimáticos normalmente son inestables y con tiempos bajos de conservación, por lo que requiere mantener una cadena de frío (congelamiento) que implica un costo elevado ([Chen et al., 2017](#)); lo que resulta crucial para la transferencia de la tecnología al sector productivo.

1.3 Justificación

En las últimas décadas se ha estimulado una mayor conciencia ambiental, enfocada hacia el control y disminución de la contaminación del agua por efluentes coloreados ([Almeida and Corso, 2014](#)), debido al mayor conocimiento de los efectos ecotóxicos de los colorantes ([Rawat et al., 2016](#)). Consecuentemente, se han generado diversos tratamientos dirigidos a la decoloración o la reducción de la toxicidad de estos efluentes ([Bhatia et al., 2017](#)).

Las enzimas han adquirido mayor relevancia, debido a las aplicaciones en diferentes procesos industriales y ambientales ([Adrio and Demain, 2014](#)). Las lacasas catalizan la oxidación de una amplia gama de sustratos como orto y para-difenoles, fenoles metoxi sustituidos, aminas aromáticas, ácidos fenólicos, entre otros ([Rivera-Hoyos et al., 2013](#); [Abd El Monssef et al., 2016](#)); aunque la mayoría de los sustratos de las lacasas son compuestos fenólicos, la actividad de la enzima puede extenderse a compuestos no fenólicos con el uso de mediadores como el ABTS (2,2'azino bis (3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato)) y el HBT (1-hidroxibenzotriazol), ([Rivera-Hoyos et al., 2013](#)).

En la actualidad, más de 100 lacasas de Basidiomicetos y Ascomicetos han sido purificadas y caracterizadas. Dentro de estos, *Pleurotus* ha sido muy estudiado debido a la capacidad para degradar colorantes sintéticos y también en la degradación de otros

contaminantes como hidrocarburos aromáticos policíclicos, pesticidas, polietileno, explosivos y antibióticos (Hadibarata *et al.*, 2013; Mauricio-Gutierrez *et al.*, 2014; Rodrigues da Luz *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2017; Gómez-Méndez *et al.*, 2018; Rivera-Hoyos *et al.*, 2018). Hongos como *Pleurotus ostreatus* pueden producir 11 diferentes isoenzimas (Giardina *et al.*, 1999); sin embargo, la producción a mayor escala está limitada por la complejidad del cultivo líquido, el tiempo de crecimiento, la logística de producción y costo del cultivo sólido.

En este orden de ideas, la producción de lacasas heterólogas usando hospederos de fácil manipulación como las levaduras, disminuye los costos de producción, acorta el tiempo de cultivo y mejora la productividad (Kunamneni *et al.*, 2008a; Kunamneni *et al.*, 2008b; Rivera-Hoyos *et al.*, 2013). *P. pastoris* es considerado el hospedero más usado y más exitoso en la expresión de proteínas recombinantes, principalmente para biofármacos y enzimas de uso industrial o ambiental (Lin Cereghino and Cregg, 2000; Córdoba *et al.*, 2003; Looser *et al.*, 2015), también es uno de los sistemas de expresión más utilizados para la producción de lacasas fúngicas. Las razones del uso de *P. pastoris* son: su alto nivel de expresión, la capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono (Poutou *et al.*, 2005; Poutou-Piñales *et al.*, 2010) la ventaja de crecer cultivos de alta densidad, la producción de grandes cantidades de proteínas recombinantes (Antosová and Sychrová, 2016), la respuesta positiva a diferentes estrategias de fermentación (Hong *et al.*, 2002), la alta expresión extracelular de proteínas recombinantes (Yang *et al.*, 2015) y que es un microorganismo GRAS (General Recognized as Safe), (Ahmad *et al.*, 2014).

La aplicación de las lacasas en la remoción de colorantes requiere la producción de grandes volúmenes, que sean rentables económicamente, pues las industrias de enzimas los comercializan liofilizados o en concentrados de alta pureza; generando costos de producción elevados, lo que genera una distribución comercial limitada y restricciones en la aplicación en diferentes tipos de industrias o ambientes

contaminados; por ello es importante la producción de concentrados enzimáticos (impuros) para la tratabilidad de contaminantes. En consecuencia, el uso de enzimas recombinantes permite alcanzar la capacidad de producción de acuerdo con la demanda; por consiguiente, para llevar a mayor escala la producción de una enzima debe trazarse una estrategia de escalado que permita conocer los parámetros cinéticos a diferentes escalas (Doran, 1998; Adrio and Demain, 2014) para el mejoramiento de la producción.

Además, del efecto de las lacasas sobre diferentes tipos de contaminantes, también se ha tratado de comprender más sobre las condiciones de uso, como por ejemplo la temperatura o el pH que favorecen su estabilidad (Dedeyan et al., 2000; Ihssen et al., 2015), pues las condiciones de reacción no pueden ser generalizadas, debido a que cada lacasa responde de forma diferente ante condiciones similares, causado por las propiedades estructurales de cada enzima (Yang et al., 2015). Los estudios de estabilidad durante el almacenamiento de la enzima constituyen un paso importante que se relaciona con la calidad del producto y las condiciones de uso (Egan and Schofield, 2009), debido a que la pérdida de actividad enzimática se traduce en una inestabilidad operativa (Fágáin, 1995).

La producción y uso de la lacasa rPOXA 1B a mayor escala es importante para la aplicación de la enzima. Sin embargo, se requiere investigación para optimizar medios de cultivo de bajo costo que obtengan un rendimiento y una productividad alta; fundamentales para el escalado industrial, así como los estudios de estabilidad a tiempo real y acelerada o la evaluación de la remoción de colorantes de aguas residuales no domésticas (CLWW). Todos estos estudios serán el insumo importante para generar un prototipo del proceso y comenzar la búsqueda de un socio comercial que pueda llevar a cabo la producción a escala industrial, así como la implementación del uso y a futuro la comercialización del producto.

1.4 Antecedentes del grupo de investigación

Algunos trabajos desarrollados dentro del Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI) de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, para la producción de lacasas son: el estudio de estabilidad termodinámica (durante 1 hora de exposición) de la lacasa recombinante rPOXA 1B de *Pleurotus ostreatus* en *P. pastoris*, encontrando que la enzima se mantuvo estable a temperaturas entre 10 y 50 °C y a pH 4 con una actividad enzimática residual superior al 90 % (Rivera-Hoyos, 2016). Para la lacasa rGLCC1 de *Ganoderma lucidum* expresada en *P. pastoris* se realizaron análisis similares y se encontró que la enzima mantuvo su actividad relativa entre 75 y 100 %, en rangos de pH y temperatura de 2 a 11 y de 10 a 60 °C, respectivamente (Morales-Álvarez *et al.*, 2017a).

Se han realizado ensayos de tratabilidad; como el tratamiento secuencial con *T. versicolor* y TiO₂ para el tratamiento de aguas residuales papeleras (Pedroza *et al.*, 2007), el análisis de remoción del colorante negro reactivo 5 empleando a *T. versicolor* inmovilizado en estropajo (Puentes-Cárdenas *et al.*, 2012), la evaluación de adsorción y detoxificación de los colorantes trifenilmetánicos (Cristal Violeta y Verde Malaquita), usando *G. lucidum* y *P. ostreatus* y los concentrados de las lacasas rGLCC1 (proveniente de *G. Lucidum* expresada en *P. pastoris*) y rPOXA 1B (proveniente de *P. ostreatus* expresada en *P. pastoris*) (Morales-Álvarez *et al.*, 2017b), la evaluación de consorcios microbianos usando hongos y bacterias en planta piloto para el tratamiento de aguas residuales procedentes de tinciones biológicas (Pedroza-Camacho *et al.*, 2018), la evaluación de un tratamiento biológico secundario de aguas residuales textiles no convencionales con una biomasa fúngica ligninolítica activa acoplada a un tratamiento terciario físico-químico de TiO (Blanco-Vargas *et al.*, 2018) y la evaluación de un consorcio fúngico/bacteriano, para establecer el potencial de remoción a escala de laboratorio bajo condiciones no estériles, empleando un residuo líquido sintético que contenía colorantes trifenilmetánicos y azoicos (Hernández-Sáenz *et al.*, 2020).

1.5 Objetivo general

Producir a escala de 10 L (prototipo, escala piloto) la enzima rPOXA 1B de *Pleurotus ostreatus* en *Pichia pastoris* para la remoción de colorantes.

1.5.1 Objetivos específicos

1. Estandarizar la producción en biorreactor de 10 L y optimizar un medio de bajo costo para la lacasa rPOXA1B de *Pleurotus ostreatus* en *Pichia pastoris*.
2. Determinar la estabilidad a tiempo real y acelerada del concentrado de la lacasa rPOXA 1B producida en *P. pastoris* y correlacionar la estabilidad con análisis de dinámica molecular.
3. Evaluar la remoción de colorantes en agua residual coloreada de laboratorio (CLWW) usando concentrado de rPOXA1B sin purificar.

1.6 Descripción general de la metodología

Se realizó la estandarización de la actividad rPOXA 1B en buffer citrato (Capítulo 3) cuyos resultados tuvieron una influencia transversal en los diferentes ensayos realizados durante la investigación. Se evaluó la producción de la enzima rPOXA 1B en biorreactor de 10 L utilizando un medio mejorado (Ardila-Leal *et al.*, 2019) y se produjeron 3 lotes de la enzima rPOXA 1B, los cual fueron concentrados (Ardila-Leal *et al.*, 2019), (Capítulo 4) para realizar los estudios de estabilidad a tiempo real y acelerada durante 12 meses; los cuales fueron acompañados de estudios de estabilidad computacional (Capítulo 6). En simultáneo se hizo un estudio de optimización a escala de laboratorio, para diseñar de un medio de bajo costo (Ardila-Leal *et al.*, 2020), cuyos resultados fueron de gran importancia para la producción de la rPOXA 1B en biorreactor de 10 L (Capítulo 5). Finalmente, a partir de concentrado enzimático se realizaron estudios de tratabilidad a escala piloto de agua residual coloreada de laboratorio (CLWW), (Ardila-Leal *et al.*, 2020), (Capítulo 7).

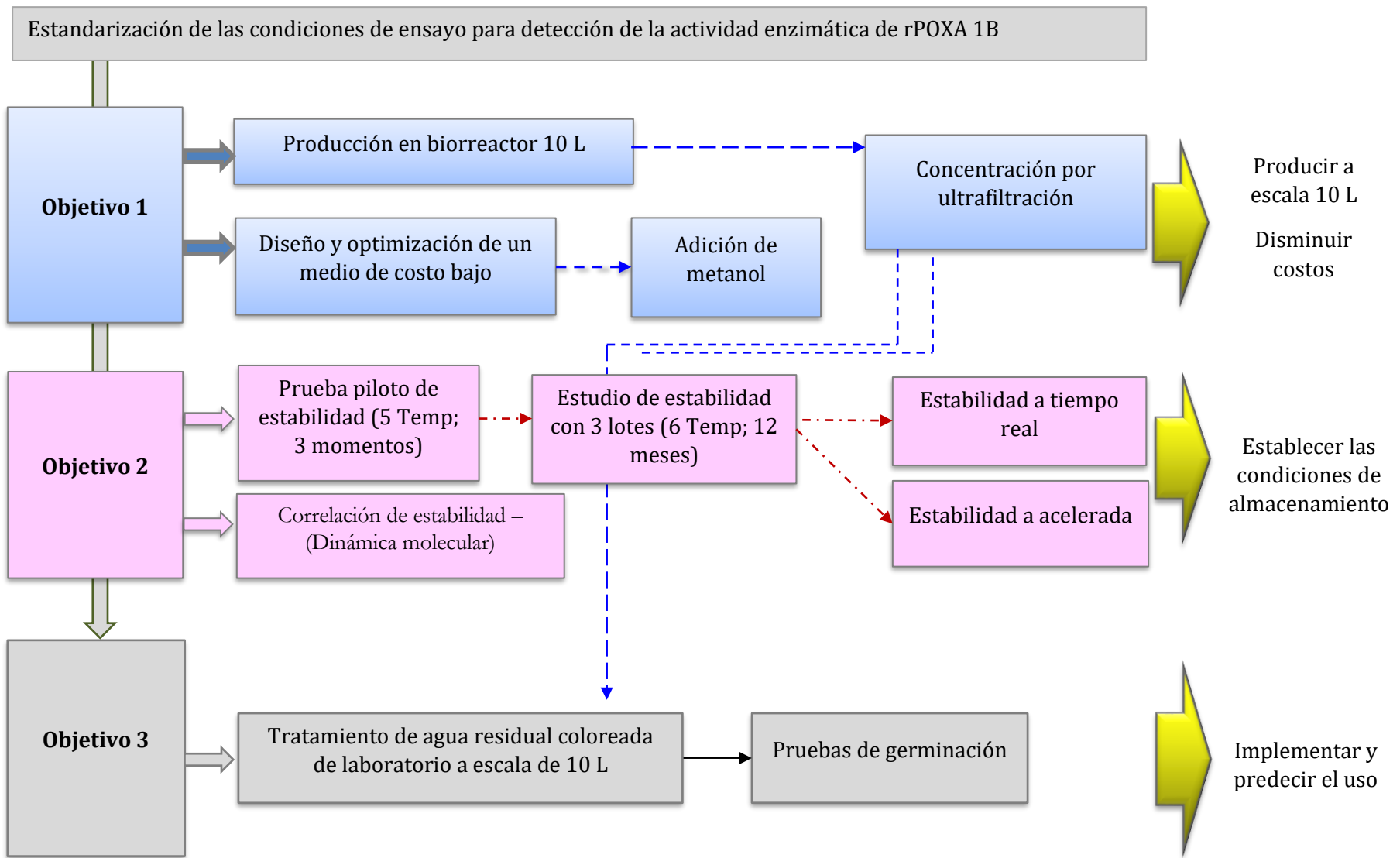


Figura 1.1 Esquema general de la metodología.

1.7 Referencias

- Abd El Monssef, R.A., E.A. Hassan and E.M. Ramadan, (2016). Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment. **Annals of Agricultural Science**, 61 (1): 145-154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aogas.2015.11.007>
- Adrio, J.L. and A.L. Demain, (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, 4: 117-1139. <http://dx.doi.org/10.3390/biom4010117>
- Ahmad, M., M. Hirz, H. Pichler and H. Schwab, (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98: 5301-5317. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>
- Alam, A.S.M.M., K.M. Hossain, B. Hossain, A. Ahmed and M.J. Hoque, (2007). A study on industrial waste effluents and their management at selected food and beverage industries of Bangladesh. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, 11 (4): 5-9.
- Almeida, E.J.R. and C.R. Corso, (2014). Comparative study of toxicity of azo dye Procion Red MX-5B following biosorption and biodegradation treatments with the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. **Chemosphere**, 112: 317-322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.060>
- Antosová, Z. and H. Sychrová, (2016). Yeast Hosts for the production of recombinant laccases: A review. **Molecular Biotechnology**, 58: 93-116. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-015-9910-1>
- Ardila-Leal, L.D., D.A. Albarracín-Pardo, C.M. Rivera-Hoyos, E.D. Morales, R.A. Poutou-Piñales, *et al.*, (2019). Media improvement for 10 L bioreactor production of rPOXA 1B laccase by *P. pastoris*. **3Biotech**, 9 (12): Article 447. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-019-1979-y>
- Ardila-Leal, L.D., V. Hernández-Rojas, D.N. Céspedes-Bernal, J.F. Mateus-Maldonado, C.M. Rivera-Hoyos, *et al.*, (2020). Tertiary treatment (*Chlorella* sp.) of a mixed effluent from two secondary treatments (immobilized recombinant *P. pastoris* and rPOXA 1B concentrate) of coloured laboratory wastewater (CLWW). **3 Biotech**, 10 (5): 233. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-020-02232-2>
- Benincá , C., P. Peralta-Zamora , C.R. Granhen Tavares and L. Igarashi-Mafra, (2013). Degradation of an Azo Dye (Ponceau 4R) and Treatment of Wastewater from a Food Industry by Ozonation. **Ozone: Science & Engineering**, 35: 295-301. 10.1080/01919512.2013.794691
- Bhatia, D., N.R. Sharma, J. Singh and R.S. Kanwar, (2017). Biological methods for textile dye removal from wastewater: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 47 (19): 1836-1876. <http://doi.org/10.1080/10643389.2017.1393263>
- Bisschops, I. and H. Spanjers, (2003). Literature review on textile wastewater characterisation. **Environmental Technology & Innovation**, 24 (11): 1399-1411. <http://dx.doi.org/10.1080/09593330309385684>

- Blanco-Vargas, A., C.F. Ramírez-Sierra, M. Duarte-Castañeda, M. Beltrán-Villarraga, L.K. Medina, *et al.*, (2018). A novel textile wastewater treatment using ligninolytic co-culture and photocatalysis with TiO₂. **UNIVERSITAS SCIENTIARUM**, 23 (3): 437-464. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.SC23-3.antw>
- Camarero, S., O. García, T. Vidal, J. Colom, J.C. del Río, *et al.*, (2004). Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. **Enzyme and Microbial Technology**, 35: 113-120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.10.019>
- Chen, Y.-C., T. Smith, R.H. Hicks, A. Doekhie, F. Koumanov, *et al.*, (2017). Thermal stability, storage and release of proteins with tailored fit in silica. **Scientific Report**, 7: 46568. <http://doi.org/10.1038/srep46568>
- Córdoba, H., N. Algecira, R.A. Poutou and L.A. Barrera, (2003). *Pichia pastoris* una Alternativa para la Producción de Glicoproteínas Humanas de Uso Terapéutico. Estrategias de Fermentación. **Revista Colombiana de Biotecnología**, 5 (2): 73-84.
- de Arruda Guelli Ulson de Souza, S.M., K.A. Santos Bonilla and A.A. Ulson de Souza, (2010). Removal of COD and color from hydrolyzed textile azo dye by combined ozonation and biological treatment. **Journal of Hazardous Materials**, 179: 35-42. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.02.053>
- Dedeyan, B., A. Klonowska, S. Tagger, T. Tron, G. Iacazio, *et al.*, (2000). Biochemical and Molecular Characterization of a Laccase from *Marasmius quercophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 63 (3): 925-929.
- Deshmukh, R., A.A. Khardenavis and H.J. Purohit, (2016). Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. **Indian Journal of Microbiology**, 56 (3): 247-264. <http://dx.doi.org/10.1007/s12088-016-0584-6>
- Doran, P.M., (1998) Principios de Ingeniería de los Bioprocesos. Acribia S. A., Zaragoza, España.
- Egan, W. and T. Schofield, (2009). Basic principles of stability. **Biologicals**, 37 (6): 379-386. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.08.012>
- Fágain, C.Ó., (1995). Understanding and increasing protein stability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, 1252 (1): 1-14. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838\(95\)00133-F](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838(95)00133-F)
- Forgacs, E., T. Cserháti and G. Oros, (2004). Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. **Environment International**, 30: 953-971.
- Forootanfar, H., S. Rezaei, H. Zeinvand-Lorestani, H. Tahmasbi, M. Mogharabi, *et al.*, (2016). Studies on the laccase-mediated decolorization, kinetic, and microtoxicity of some synthetic azo dyes. **Journal of Environmental Health Science**, 14: 7. <http://dx.doi.org/10.1186/s40201-016-0248-9>
- Gautam, A.K., S. Kumar and P.C. Sabumon, (2007). Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater. **Journal of Environmental Management**, 83: 298-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2006.03.009>
- Ghaly, A.E., R. Ananthashankar, M. Alhattab and V.V. Ramakrishnan, (2014). Production, Characterization and Treatment of Textile Effluents: A Critical Review. **Chemical Engineering & Process Technology**, 5: 182. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7048.1000182>

- Giardina, P., G. Palmieri, A. Scalonì, B. Fontanella, V. Faraco, *et al.*, (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical Journal**, 341: 655-663.
- Gómez-Méndez, L.D., D.A. Moreno-Bayona, R.A. Poutou-Piñales, J.C. Salcedo-Reyes, A.M. Pedroza-Rodríguez, *et al.*, (2018). Biodeterioration of plasma pretreated LDPE sheets by *Pleurotus ostreatus*. **Plos One**, 13 (9): e0203786. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0203786>
- Hadibarata, T., L.A. Adnan, A.R.M. Yusoff, A. Yuniarto, M.M.F.A. Zubir, *et al.*, (2013). Microbial decolorization of an azo dye reactive black 5 using white-rot fungus *Pleurotus eryngii* F032. **Water, Air, & Soil Pollution**, 224 (6): 1595. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-013-1595-0>
- Hernández-Sáenz, D., C.S. Puentes-Morales, J.F. Mateus-Maldonado, L.D. Pedroza-Camacho, J. Ramírez-Rodríguez, *et al.*, (2020). Evaluación del consorcio entre *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* y bacterias aeróbicas para remoción de colorantes sintéticos. **Revista Colombiana de Biotecnología**, 12: 45-59. <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.82735>
- Holkar, C.R., A.J. Jadhav, D.V. Pinjari, N.M. Mahamuni and A.B. Pandit, (2016). A critical review on textile wastewater treatments: Possible approaches. **Journal of Environmental Management**, 182: 351-366. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.090>
- Hong, F., N.Q. Meinander and L.J. Jönsson, (2002). Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, 79 (4): 438-449.
- Hong, Y.-z., H.-m. Zhou, X.-m. Tu, J.-f. Li and Y.-z. Xiao, (2007). Cloning of a laccase gene from a novel Basidiomycete *Trametes* sp. 420 and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. **Current Microbiology**, 54: 260-265.
- Hussain, S., N. Khan, S. Gul, S. Khan and H. Khan, (2019) Contamination of Water Resources by Food Dyes and Its Removal Technologies. Contamination of Water Resources by Food Dyes and Its Removal Technologies. IntechOpen, pp. 1-14.
- Ihssen, J., R. Reiss, R. Luchsinger, L. Thöny-Meyer and M. Richter, (2015). Biochemical properties and yields of diverse bacterial laccase-like multicopper oxidases expressed in *Escherichia coli*. **Scientific Report**, 5: Art. ID 10465. <http://dx.doi.org/10.1038/srep10465>
- Kunamneni, A., S. Camarero, C. García-Burgos, F.J. Plou, A. Ballesteros, *et al.*, (2008a). Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. **Microbial Cell Factories**, 7: 32. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-7-32>
- Kunamneni, A., F.J. Plou, A. Ballesteros and M. Alcalde, (2008b). Laccases and their applications: a patent review. **Recent Patents on Biotechnology**, 2: 10-24.
- Lehto, S., M. Buchweitz, A. Klimm, R. Straßburger, C. Bechtold, *et al.*, (2017). Comparison of food colour regulations in the EU and the US: a review of current provisions. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 34 (3): 335-355. <http://doi.org/10.1080/19440049.2016.1274431>
- Lellis, B., C.Z. Fávoro-Polonio, J.A. Pamphile and J.C. Polonio, (2019). Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. **Biotechnology Research and Innovation**, 3: 275-290. <http://doi.org/10.1016/j.biori.2019.09.001>

- Lin Cereghino, J. and J.M. Cregg, (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, 24: 45-66. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>
- Liu, Y., M. Yan, Y. Geng and J. Huang, (2016). Laccase immobilization on poly(p-phenylenediamine)/Fe₃O₄ nanocomposite for reactive Blue 19 dye removal. **Applied Sciences**, 6: 232. <http://dx.doi.org/10.3390/app6080232>
- Looser, V., B. Bruhlmann, F. Bumbak, C. Stenger, M. Costa, *et al.*, (2015). Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. **Biotechnology Advances**, 33 (6): 1177-1193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.008>
- Mauricio-Gutierrez, A., T. Jimenez-Salgado, A. Tapia-Hernandez, J. Cavazos-Arroyo and B. Perez-Armendariz, (2014). Biodegradation of hydrocarbons exploiting spent substrate from *Pleurotus ostreatus* in agricultural soils. **African Journal of Biotechnology**, 13 (33): 3385-3393.
- Morales-Álvarez, E.D., C.M. Rivera-Hoyos, Á.M. Cardozo-Bernal, R.A. Poutou-Piñales, A.M. Pedroza-Rodríguez, *et al.*, (2017a). Plackett-Burman Design for rGILCC1 laccase activity enhancement in *Pichia pastoris*: Concentrated enzyme kinetic characterization. **Enzyme Research**, 2017: Article ID 5947581. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/5947581>
- Morales-Álvarez, E.D., C.M. Rivera-Hoyos, L.E. Chaparro-Núñez, C.E. Daza, R.A. Poutou-Piñales, *et al.*, (2017b). Decolorization and detoxification of Malachite Green by *Ganoderma lucidum*: key operating parameters and adsorption studies. **Journal of Environmental Engineering**, 143 (4): 04016093. [http://dx.doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001180](http://dx.doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001180)
- Muhammad Bilal, Muhammad Asgher, Hafiz M. N. Iqbal, Hongbo Hu and Xuehong Zhang, (2016). Gelatin-immobilized manganese peroxidase with novel catalytic characteristics and its industrial exploitation for fruit juice clarification purposes. **Catalysis Letter**, 146 (11): 2221-2228. <http://dx.doi.org/10.1007/s10562-016-1848-9>
- Pedroza, A.M., R. Mosqueda, N. Alonso-Vante and R. Rodríguez-Vázquez, (2007). Sequential treatment via *Trametes versicolor* and UV/TiO₂/RuxSey to reduce contaminants in waste water resulting from the bleaching process during paper production. **Chemosphere**, 67 (4): 739-801.
- Pedroza-Camacho, L.D., J.C. Lores-Acosta, J.F. Rojas-Enríquez, J.F. Mateus-Maldonado, C.S. Puentes, *et al.*, (2018). Effect of domestic wastewater as co-substrate on biological stain wastewater treatment using fungal/Bacterial consortia in pilot plant and greenhouse reuse. **Journal of Water Resource and Protection**, 10: 369-393. <http://doi.org/10.4236/jwarp.2018.103020>
- Pereira, A.R.B., P.M. Pereira, A.D.S. de França, M. da Silva and V.S. Ferreira-Leitão, (2016). Propazine degradation by intra-and extracellular enzymes from *Pleurotus ostreatus* INCQS 40310. **Biocatalysis and Biotransformation**, 34 (2): 66-75.
- Poutou, R.A., H. Córdoba, B.E. Quevedo, P. Landázuri, O.Y. Echeverri, *et al.*, (2005). Expresión de iduronato 2-sulfato sulfatasa humana recombinante (IDShr) en *Pichia pastoris*. **Universitas Scientiarum**, 10 (1): 75-96.

- Poutou-Piñales, R.A., H.A. Córdoba-Ruiz, L.A. Barrera-Avellaneda and J.M. Delgado-Boada, (2010). Carbon source feeding strategies for recombinant protein expression in *Pichia pastoris* and *Pichia methanolica*. **African Journal of Biotechnology**, 9 (15): 2173-2184.
- Puentes-Cárdenas, J., A. Florido-Cuellar, J. Cardona-Bedoya, P. Bohorquez-Echeverry, C. Campos-Pinilla, *et al.*, (2012). Simultaneous decolorization and detoxification of black reactive 5 using TiO₂ deposited over borosilicate glass. **Universitas Scientiarum**, 17 (1): 53-63. <http://dx.doi.org/10.11144/javeriana.SC17-1.sdad>
- Punzi, M., A. Anbalagan, R.A. Börner, B.-M. Svensson, M. Jonstrup, *et al.*, (2015). Degradation of a textile azo dye using biological treatment followed by photo-Fenton oxidation: evaluation of toxicity and microbial community structure. **Chemical Engineering Journal**, 270: 290-299. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2015.02.042>
- Rawat, D., V. Mishra and R.S. Sharma, (2016). Detoxification of azo dyes in the context of environmental processes. **Chemosphere**, 155: 591-605. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.068>
- Rivera-Hoyos, C.M., (2016). Expresión y producción de una lacasa recombinante de *Pleurotus ostreatus* como alternativa para el tratamiento de los subproductos líquidos que se obtienen en el proceso de blanqueamiento de pulpa de celulosa. Poutou-Piñales, R.A. and Pedroza-Rodríguez, A.M., Tesis de Doctorado. Pontificia Universidad Javeriana.
- Rivera-Hoyos, C.M., E.D. Morales-Álvarez, J. Abelló-Esparza, D.F. Buitrago-Pérez, N. Martínez-Aldana, *et al.*, (2018). Detoxification of pulping black liquor with *Pleurotus ostreatus* or recombinant *Pichia pastoris* followed by CuO/TiO₂/visible photocatalysis. **Scientific Report**, 8: 3503. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-21597-2>
- Rivera-Hoyos, C.M., E.D. Morales-Álvarez, R.A. Poutou-Piñales, A.M. Pedroza-Rodríguez, R. Rodríguez-Vázquez, *et al.*, (2013). Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, 27 (3-4): 67-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2013.07.001>
- Robinson, T., G. McMullan, R. Marchant and P. Nigam, (2001). Remediation of dyes in textile e,uent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, 77: 247-255.
- Rodrigues da Luz, J.M., S.A. Paes, K.V.G. Ribeiro, I.R. Mendes and M.C.M. Kasuya, (2015). Degradation of Green Polyethylene by *Pleurotus ostreatus*. **Plos One**, 10 (6): e0126047. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0126047>
- Shakir, K., A.F. Elkafrawy, H.F. Ghoneimy, S.G.E. Beheir and M. Refaat, (2010). Removal of rhodamine B (a basic dye) and thoron (an acidic dye) from dilute aqueous solutions and wastewater simulants by ion flotation. **water r e s e a r c h**, 44: 1449-1461. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.10.029>
- Singh, V.K., M.K. Nandi and N.K. Singh, (2016). Accelerated stability study of chitrak haritaki avaleha. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 8 (2): 221-223.
- Soares, G.a.M.B., M.T. Pessoa de Amorim and M. Costa-Ferreira, (2001). Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. **Journal of Biotechnology**, 89: 123-129. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00302-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00302-9)

- Songulashvili, G., D. Spindler, G.A. Jimenéz-Tobón, C. Jaspers, G. Kerns, *et al.*, (2015). Production of a high level of laccase by submerged fermentation at 120-L scale of *Cerrena unicolor* C-139 grown on wheat bran. **Comptes Rendus Biologies**, 338: 121-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2014.12.001>
- The World Bank, (2014) The Bangladesh Responsible Sourcing Initiative, a new model for green growth? The World Bank, Washington DC.
- Tkaczyk, A., K. Mitrowska and A. Posyniak, (2020). Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: A review. **Science of the Total Environment**, 717: 137222. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137222>
- Wang, B., Y. Yan, Y. Tian, W. Zhao, Z. Li, *et al.*, (2016). Heterologous expression and characterisation of a laccase from *Colletotrichum lagenarium* and decolourisation of different synthetic dyes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 32: 40. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-015-1999-7>
- Xiao, B., C. Liu, J. Liu and X. Guo, (2015). Evaluation of the microbial cell structure damages in alkaline pretreatment of waste activated sludge. **Bioresource Technology**, 196: 109-115. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.056>
- Yagub, M.T., T.K. Sen, S. Afroze and H.M. Ang, (2014). Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, 209: 172-184.
- Yang, J., T.B. Ng, J. Lina and X. Ye, (2015). A novel laccase from basidiomycete *Cerrena* sp.: Cloning, heterologous expression, and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, 77: 344-349.
- Yang, Q., J. Wang, H. Wang, X. Chen, S. Ren, *et al.*, (2012). Evolution of the microbial community in a full-scale printing and dyeing wastewater treatment system. **Bioresource Technology**, 117: 155-163. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.059>
- Zeng, S., X. Qin and L. Xia, (2017). Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. **Biochemical Engineering Journal**, 119: 92-100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.12.016>

Capítulo 2. Marco teórico

Abreviaturas

AB80:	Azul Ácido 80. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Acid blue 80)
AB129:	Azul Ácido 129. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Acid blue 129)
ABTS:	2,2'azino bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)
A07:	Naranja ácido 7. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Acid Orange 7)
AR:	Rojo alizarina. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Alizarin red)
ARD:	Agua residual doméstica
ARnD:	Agua residual no doméstica
BB:	Azul de Bromofenol. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Bromophenol Blue)
BB K-3R:	Azul Brillante Reactivo K-3R. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Brilliant Blue Reactive K-3R)
BB K-GR:	Azul Brillante Reactivo K-GR. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Brilliant Blue Reactive K-GR)
BB X-BR:	Azul Brillante Reactivo X-BR. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Brilliant Blue Reactive X-BR)
BI:	Azul índigo. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Blue indigo)
CCR:	Rojo cochinilla. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Cochineal red)
CG-250:	Coomassie G-250
CM:	Carmoisine
CR:	Rojo Congo. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Congo red)
CV:	Cristal Violeta
DB3:	Azul Disperso 3. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Disperse Blue 3)
DBR KR:	Azul Oscuro Reactivo KR. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Dark Blue Reactive KR)
DBO:	Demanda bioquímica de oxígeno
DQO:	Demanda química de oxígeno
DMP:	2,6 dimetoxifenol
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
FADH₂:	Flavina adenina dinucleótido (forma reducida)
FT:	Fósforo total

GRAS:	Reconocido como seguro. <i>Abreviatura en Inglés</i> General Recognized as Safe
GB:	Verde Brillante
HBT:	1-hidroxibenzotriazol
HPI:	Hidroxiftalimida
MG:	Verde de Malaquita. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Malachite Green)
NADH₂:	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NADPH₂:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NT:	Nitrógeno total
pAOX:	Promotor alcohol oxidasa
pGAP:	Promotor gliceraldehído 3-Fosfato deshidrogenasa
PB:	Azul patentado. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Patented blue)
RBBR:	Azul Brillante Remazol R. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Brilliant Blue Remazol R)
RO:	Naranja Reactivo 1. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Reactive Orange)
RR X-3B:	Rojo Reactivo X-3B (Reactive Red X-3B)
SA:	Siringaldehído
SDT:	Sólidos disueltos totales
SY:	Amarillo Ocaso. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Sunset Yellow)
TEMPO:	2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi
TNC:	Centro de cobre trinuclear. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Trinuclear copper enter)
VA:	Ácido violúrico. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Violuric acid)
VAN:	Vainillin
VB:	Azul Victoria. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Victoria Blue)
VM:	Violeta de Metil. <i>Abreviatura en Inglés</i> (Methyl Violet)

2.1 Introducción

Las industrias textil, papelera y del cuero son responsables de descargar el mayor volumen y concentración de efluentes contaminados con colorantes (Routoula and Patwardhan, 2020). Sin embargo, los colorantes también son utilizados por empresas prestadoras de servicios (hospitales y/o universidades), (Pedroza-Camacho *et al.*, 2018) así como en la industria de alimentos (Benincá *et al.*, 2013). Para la mayoría de los colorantes no se han establecido límites máximos de descarga o no se conocen los efectos toxicológicos sobre el medio ambiente y la salud humana (Khattab *et al.*, 2020). No obstante, sí se conoce que la contaminación con colorantes en cuerpos de agua disminuye la penetración de luz solar (Sarayu and Sandhya, 2012), aumenta la demanda bioquímica (DBO₅) y química de oxígeno (DQO), impide la fotosíntesis, inhibe el crecimiento de las plantas. Estos colorantes son recalcitrantes, se bioacumulan, generan toxicidad, son mutagénicos y carcinogénicos (Lellis *et al.*, 2019).

Los tratamientos usados para la remoción de color pueden ser clasificados como químicos, físicos, biológicos y/o procesos híbridos; obteniendo en algunos tratamientos efectividad alta en la remoción de color (Holkar *et al.*, 2016). No obstante, los tratamientos químicos y físicos tienen la desventaja de generar lodos difíciles de manejar, tienen un costo elevado y requieren áreas extensas para el procesamiento de material contaminado (Routoula and Patwardhan, 2020). En contraste, los tratamientos biológicos son ambientalmente amigables, de bajo costo y generan menor cantidad de lodos (Senthivelan *et al.*, 2016; Bhatia *et al.*, 2017).

Los microorganismos como los hongos, las bacterias, las levaduras y las algas pueden decolorar e incluso mineralizar completamente los colorantes. Los hongos de pudredumbre blanca son los más eficientes para descomponer los colorantes sintéticos, debido a que producen enzimas que catalizan las reacciones para la remoción y degradación de colorantes (Ali, 2010). No obstante, la eficiencia en la remoción del color está controlada por las condiciones del cultivo como el pH, la carga de nutrientes, el tiempo de tratamiento, la aireación, relación C/N, morfología de la biomasa, inóculo,

adición de cosustratos y la producción de subproductos tóxicos (Pedroza-Camacho et al., 2018; Choi, 2021); haciendo que los tratamientos para la remoción de color a gran escala sean limitados, así como el uso de los microorganismos (Choi, 2021). Debido a la importancia de las enzimas en la decoloración y al hecho de que algunos compuestos fenólicos pueden inhibir el crecimiento de los hongos en los procesos de biorremediación (Majeau et al., 2010), se considera que las enzimas son una alternativa de fácil uso y manipulación, que podría ser empleada en las industrias para disminuir la contaminación ambiental que generan (Adrio and Demain, 2014).

Las ventajas de las enzimas radican en la alta eficiencia catalítica, la alta o baja especificidad por el sustrato (lo que puede manejarse a conveniencia), el menor tiempo de reacción, el consumo bajo de energía, condiciones de reacción fáciles de propiciar y que normalmente no generan toxicidad (Senthivelan et al., 2016). El potencial catalítico de las enzimas de origen microbiano ha permitido su uso en industrias de alimentos y bebidas, papel, cosmética, farmacéutica, detergentes, textil, cuero, síntesis orgánica y de polímeros, así como en el tratamiento de agua residuales (Singh et al., 2016).

De manera más específica, las lacasas (EC 1.10.3.2) son enzimas con una alta eficiencia catalítica (González Arzola et al., 2009; Rivera-Hoyos et al., 2013) y han sido aplicadas en la deslignificación de compuestos lignocelulósicos, en biopulpeo y bioblanqueo, en la transformación de colorantes, en el tratamiento de aguas residuales y en la degradación de compuestos recalcitrantes, entre otros (Aghaie-Khouzani et al., 2012; Rivera-Hoyos et al., 2013; Forootanfar et al., 2016; Senthivelan et al., 2016; Ferraroni et al., 2017; Zeng et al., 2017; Sharma et al., 2018).

Las lacasas son enzimas multi-cobre oxidasas (p-difenol: dióxido de oxidoreductasas) (Antosová and Sychrová, 2016) encontradas en hongos, plantas, insectos y otras fuentes naturales (Rivera-Hoyos et al., 2013; Asano et al., 2014; Otto and Schlosser, 2014; Patel et al., 2014). A diferencia de las peroxidasas, las lacasas no generan peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sino agua (H_2O) cuando catalizan las reacciones (Loera Corral et al., 2006; Morozova et al., 2007; Rivera-Hoyos et al., 2013); lo que ha generado gran interés

biotecnológico. Las lacasas catalizan la oxidación de una amplia variedad de compuestos aromáticos orgánicos (Rivera-Hoyos et al., 2013), principalmente compuestos fenólicos e inorgánicos (Patel et al., 2014), pueden degradar colorantes sintéticos (Aghaie-Khouzani et al., 2012; Forootanfar et al., 2016), oxidar compuestos fenólicos (Ferraroni et al., 2017), degradar pesticidas (Zeng et al., 2017) o ser utilizadas en procesos industriales que impliquen procesos de bioconversión; disminuyendo la acumulación de desechos (Britos and Trelles, 2016); capacidad que puede ser ampliada con la adición de mediadores redox (Soares et al., 2001; Camarero et al., 2004; Forootanfar et al., 2016). El potencial catalítico de las enzimas se encuentra relacionado con la estabilidad estructural (3D), (Suplatov et al., 2014).

Las lacasas más importantes para aplicaciones industriales son aquellas con alto potencial redox (E^0) (Liu et al., 2014), ya que un alto potencial redox, aumenta el rango de sustratos transformables por la enzima (Macellaro et al., 2014). Debido al alto rendimiento, las lacasas más utilizadas en la industria proviene de hongos (Antosová and Sychrová, 2016), no obstante, los hongos tienen algunas limitaciones como cambios en la reología del medio por crecimiento micelial, demandan una alta disponibilidad de oxígeno y requieren tiempos de cultivo prolongados (Patel et al., 2009; Bertrand et al., 2017; Postemsky et al., 2017). Las limitaciones han llevado a la expresión heteróloga de lacasas en hospederos como *Saccharomyces cerevisiae* (Miele et al., 2010), *Yarrowia lipolytica* (Kalyani et al., 2015), *Pichia pastoris* (Rivera-Hoyos et al., 2015; Campos et al., 2016) y *Kluyveromyces lactis* (Faraco et al., 2008), entre otras.

En este orden de ideas, la producción de lacasas heterólogas en levaduras, disminuye los costos de producción y mejora la productividad (Kunamneni et al., 2008a; Kunamneni et al., 2008b; Rivera-Hoyos et al., 2013). *Pichia pastoris*, ha sido un sistema de expresión exitoso para la producción de proteínas recombinantes (Lin Cereghino and Cregg, 2000; Looser et al., 2015) debido a su alto nivel de expresión, a la capacidad de usar diferentes fuentes de carbono y a que responde a diversas estrategias de cultivo

para la producción de los metabolitos de interés (Córdoba *et al.*, 2003; Poutou-Piñales *et al.*, 2010; Burgard *et al.*, 2017; Stasyk *et al.*, 2018; Ardila-Leal *et al.*, 2021).

Así como se ha estudiado la acción de las lacasas sobre diferentes tipos de contaminantes y la mejor forma de producirla, ha sido importante conocer las condiciones que favorecen su estabilidad (Dedeyan *et al.*, 2000; Ihssen *et al.*, 2015), pues cada enzima responde de forma diferente ante condiciones similares (Yang *et al.*, 2015b). Los análisis de estabilidad son útiles para predecir o determinar bajo diferentes condiciones el momento en que comienza la pérdida de la actividad enzimática, bajo la premisa que aún en condiciones óptimas de almacenamiento es razonable suponer cambios en la estructura y/o funcionamiento de las moléculas (Kirkwood and Palombo, 1997).

Este capítulo muestra a partir de una perspectiva histórica la importancia de los colorantes y como el progreso en el uso del color aumentó la producción y uso de tintes y pigmentos que generaron un impacto ambiental negativo. A partir de la necesidad de eliminar colorantes sintéticos en aguas residuales se han desarrollado estrategias para mitigar el impacto ambiental negativo, con especial énfasis en la aplicación biotecnológica de la enzima lacasa, con la finalidad de potenciar su acción y de ofrecer una alternativa viable y económica para pequeñas, medianas y grandes empresas que emplean los colorantes.

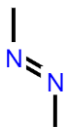
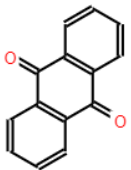
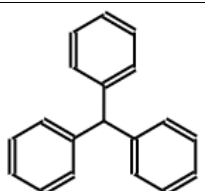
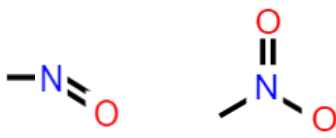
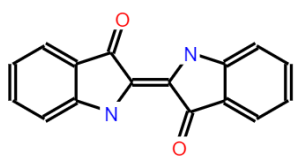
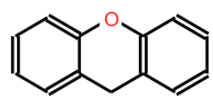
2.2 Colorantes y clasificación

Los colorantes son sustancias naturales o artificiales que aportan color a diferentes tipos de fibras empleadas en las industrias textil, farmacéutica, alimentaria, cosmética, plástica, fotográfica, papelera, entre otras (Drumond Chequer *et al.*, 2013). Pueden ser clasificados como pigmentos o tintes (colorantes). La diferencia radica en que los pigmentos son prácticamente insolubles y las partículas que los componen son de 1-2 μm ; en cambio los tintes se disuelven fácilmente y tienen un tamaño de partícula de 0.025-1.0 μm (Braun, 1983; Esteves Torres *et al.*, 2016). Las ventajas industriales para

el uso de colorantes artificiales se basan en características fundamentales como: 1) son químicamente estables en el tiempo, 2) son inertes a la degradación física, química y biológica, 3) son capaces de conferir color a la fibra a teñir a través de procesos reproducibles, manteniendo la intensidad de color (Zucca *et al.*, 2015) y 4) son de bajo costo (Paz *et al.*, 2017).

Los colorantes absorben luz en el espectro visible (400-700 nm), tienen conjugación extendida y uno o más cromóforos (Kuenemann *et al.*, 2017). Las moléculas portadoras del color, conocidas como cromóforos contienen heteroátomos como N, O, y S e incluyen enlaces como $-N=N-$ (azo), $=C=O$ (carbonilo), NO o N-OH (nitroso), $-NO_2$ o NO-OH (nitro) y C=S (sulfuro), (Pereira and Alves, 2011). Los grupos cromóforos son grupos insaturados que consisten en átomos o grupos de átomos, en los cuales la disposición de enlaces sencillos y dobles sucesivos resuenan, permitiendo así la absorción de rayos de luz (Berradi *et al.*, 2019). Los colorantes sintéticos presentan una considerable diversidad estructural y por tanto, poseen propiedades químicas y físicas muy diferentes (Pereira and Alves, 2011). En la Tabla 2.1 se observan los principales cromóforos que influyen en la clasificación de los colorantes. Además, de los cromóforos, la mayoría de los colorantes también tienen grupos auxocromos, que no son responsables del color sino de la intensidad (tono) y que mejoran la afinidad del colorante por la fibra; algunos de estos incluyen enlaces como $-NH_2$ (amina), $-COOH$ (carboxilo), HSO_3^- (sulfonato) y $-OH$ (hidroxilo), (International Agency for Research on Cancer, 2010; Pereira and Alves, 2011).

Tabla 2.1. Clasificación de los colorantes dependiendo de la estructura del cromóforo.

Clases químicas de colorante	Estructura del cromóforo	Ejemplos de colorantes
Azo		Naranja de metil Rojo Congo Naranja G Amaranto
Antraquinona		Azul Brillante de Remazol R Azul brillante reactivo X-BR Azul reactivo 4 Rojo de alizarina s
Triarilmetano		Verde de Malaquita Cristal Violeta Azul de bromofenol Azul brillante Coomassie G250
Nitro y nitroso		Amarillo de naftol S Amarillo disperso 26 Amarillo disperso 14
Índigo		Índigo carmín Índigo brillante B Azul ciba B
Xanteno		Rodamina 6G Rodamina 123 Fluoresceína

2.3 Historia de los colorantes

El color ha sido usado desde la prehistoria como arte simbólico de la sociedad, una forma de comunicación visual y un mecanismo de expresión asociado a la evolución cultural de la humanidad (Morriss-Kay, 2010; Gilbert, 2017; Robert, 2017), ya que el uso del color en diferentes entornos prehistóricos ha sido vinculado al desarrollo artístico y al desarrollo cognitivo de los individuos (Morriss-Kay, 2010; Duarte, 2014)

y se cree que el color estuvo asociado a un sistema de colores simbólicos que fueron extendidos y compartidos por muchas sociedades en diferentes períodos de tiempo (Hovers *et al.*, 2003).

Los pigmentos surgieron al descubrir mezclas de suelos u otros materiales con agua, saliva o grasa animal y fueron usados para colorear diferentes superficies (Barnett *et al.*, 2006). Probablemente, el uso de los primeros pigmentos fue para marcar la piel (Morriss-Kay, 2010), con fines rituales o como protección para el sol o los insectos (Hodgskiss and Wadley, 2017). Sin embargo, Duarte (2014) propone que el ocre también pudo ser incluido en la dieta de los humanos prehistóricos; generando un aporte de hierro esencial para desarrollo (Duarte, 2014). Como evidencia, en una cueva de hace 165,000 años se encontraron 57 fragmentos de ocre rojo, de las cuales se cree que 12 fueron usados, debido a que se observaron procesos de raspado y/o molido sobre los fragmentos (Marean *et al.*, 2007). Sin embargo, la evidencia más clara en el uso de pigmentos fue observada en las pinturas rupestres en rocas expuestas al aire libre o en cuevas (Barnett *et al.*, 2006; Robert, 2017).

En el registro prehistórico, así como la frecuencia de uso de los diferentes pigmentos se incrementó con el tiempo, aunque ocurrió de manera desigual en momentos y regiones diferentes. El uso inicial de los pigmentos se puede ubicar en la Edad de Piedra Media/Paleolítico Medio en África y en Europa (150,000 – 30,000 a.C.), (Hovers *et al.*, 2003). El uso de pigmentos provenientes de arcilla de ocre data de hace 100000 a 70,000 años, como se puede observar en la cueva de Blombos en Sudáfrica con grabados de líneas paralelas (Dickerson and Fortner, 2017; Henshilwood *et al.*, 2018); así como los reportes que datan de hace 40,000 años en las cuevas de Indonesia (cueva de Pettakere), Australia (meseta de Arnhem), Francia (cueva de Chauvet), España (cueva de El Castillo) y Rumanía (cueva de Caliboaia), (Figura 2.1), (Dickerson and Fortner, 2017). Sin embargo, el uso de estos pigmentos en el arte rupestre se extendió hasta tiempos más recientes, pues las últimas pinturas encontradas se realizaron en el siglo XV en diferentes cavernas y cuevas en la isla de Mona (Oeste de Puerto Rico), (Figura 2.1), (Samson *et al.*, 2017).

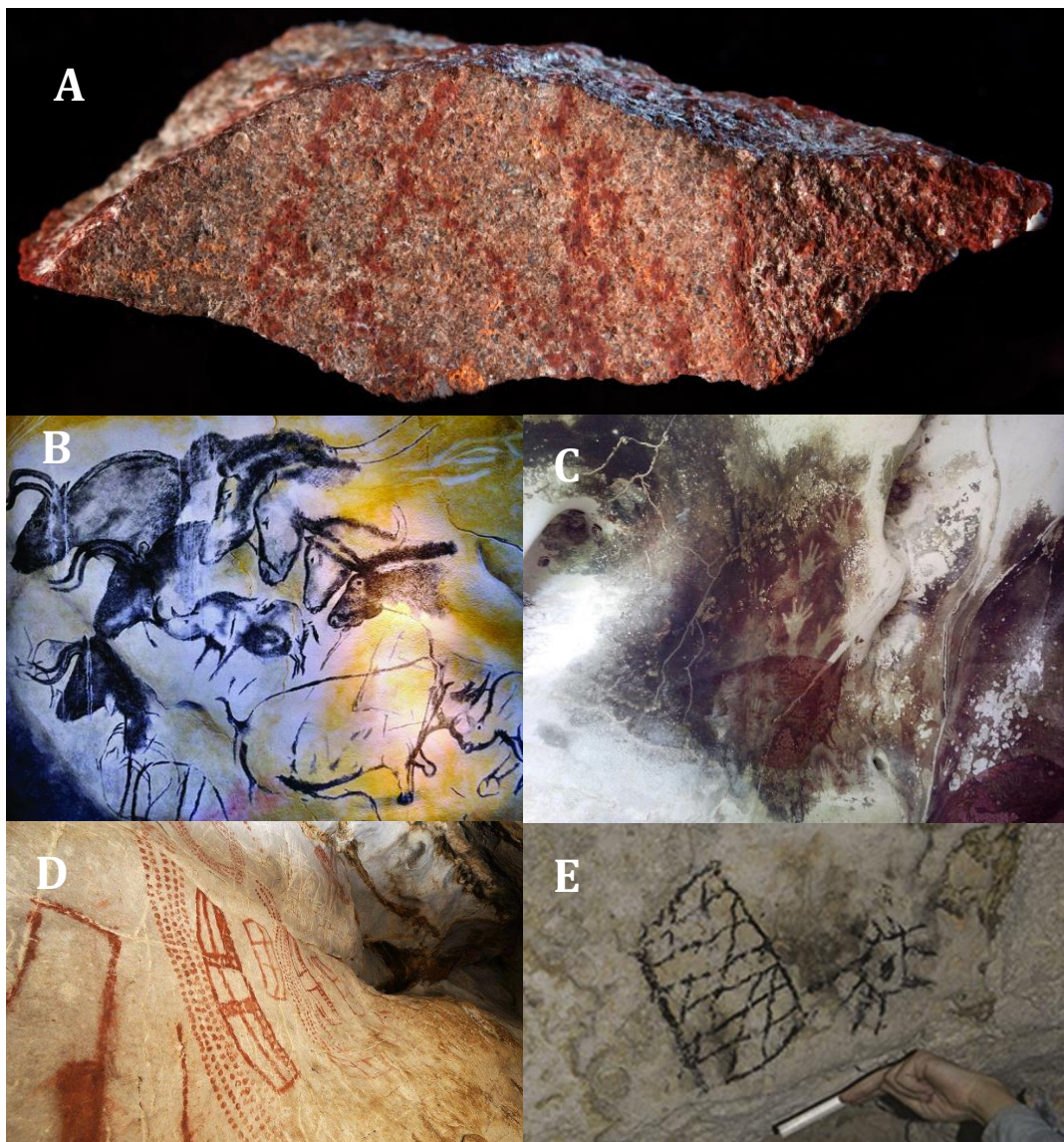


Figura 2.1 Pigmentos usados en algunas cuevas con pinturas rupestres elaborados durante la edad de piedra media. A. Pigmento ocre en la Cueva de Blombos, Sur de la Ciudad del Cabo ([Henshilwood et al., 2018](#)); créditos Foster; B. Pigmento carbón en la Cueva Chauvet, France ([Dickerson and Fortner, 2017](#)); créditos T. Thoams; C. Cueva de Pettakere, Maros, Indonesia (<https://reydekish.com/2015/09/21/cuevas-de-indonesia/>); D. Pigmento ocre en la Cueva de El Castillo, España (<https://www.efetur.com/noticia/expresiones-ser-human/>), créditos Pedro Puente/EFE y E. Pigmento carbón en la Cueva de la isla de Mona ([Samson et al., 2017](#)).

El amplio registro prehistórico del uso de pigmentos indica que los pigmentos rojos y negros derivados de rocas naturales u otras componentes geológicas, estuvieron presentes en casi todos los asentamientos y canteras del Paleolítico hasta el Paleolítico superior (35,000 – 10,000 a. C.), ([Hovers et al., 2003](#); [Orna, 2015](#)). Según diferentes reportes, el óxido de hierro u ocre eran los componentes para los colores rojos, naranjas y amarillos y el carbón para el color negro ([de Balbín Behrmann and Alcolea González, 2009](#)). Posterior a este período, hubo una rápida diversificación en el uso del ocre sobre diferentes entornos y objetos, ocasionado por la amplia difusión del ocre como constructo simbólico ([Hovers et al., 2003](#)).

Las primeras etapas de la civilización humana iniciaron durante el Neolítico tardío (6,000 – 3,500 a.C.) y la Edad del Bronce (3,000 – 1,200 a.C.), debido al cambio de vida del hombre prehistórico, que pasó de nómada a sedentario, como consecuencia del desarrollo de la agricultura ([Chekalin et al., 2018](#)). Con el desarrollo de las civilizaciones los pigmentos empezaron a usarse en los gráficos elaborados en paredes de templos, tumbas, cerámicas o en las viviendas, se usó para teñir fibras textiles y continuó su uso sobre la piel y el cabello ([Abel, 2012](#); [Pugh and Cecil, 2012](#)). También se usaron pigmentos para resaltar la escritura de tablillas cuneiformes, desarrolladas durante el auge de las civilizaciones en Mesopotamia (3,000 – 2,000 a.C.), ([Chiriu et al., 2017](#)). No obstante, dependiendo del propósito, el pigmento elaborado tenía composición diferente. Por ejemplo, en la civilización Maya (2,000 a. C. hasta 900 d. C.), el pigmento utilizado para decorar cerámica con motivos de líneas rojas estaba enriquecido con hierro y cromo, mientras que el pigmento rojo para la decoración en rojo y negro era enriquecido con Cerio ([Pugh and Cecil, 2012](#)).

En la prehistoria el acceso a colores diferentes al ocre y negro fue un problema ([Berke, 2002](#)). Por ejemplo, el color azul (muy apreciado y tan caro como el oro), inicialmente sólo se obtenía de depósitos de lapislázuli en Afganistán ([Wyart et al., 1981](#)); lo que propició que diferentes civilizaciones desarrollaran procesos para obtener el color. Los antiguos egipcios asociaban el color azul con el cielo y el agua; siendo los primeros en

producir de forma artificial un colorante azul, conocido como azul egipcio, el cual se desarrolló entre 2900–2750 a.C. durante la cuarta dinastía (2630 a.C, Seneferu a 2500 a. C, Shepseskaf), (Abel, 2012). Las civilizaciones egipcias utilizaron el azul egipcio con frecuencia durante los siguientes milenios. La edad de oro de su uso fue probablemente el período del Imperio Nuevo (1580-1085 a. C.), que coincide con el período artístico más productivo del antiguo Egipto (Berke, 2002).

Sin embargo, los egipcios no fueron los únicos en generar técnicas para la obtención del color azul, los chinos desarrollaron el pigmento Han Blue durante el período de la Guerra China alrededor del año 500 a.C. (Berke and Wiedemann, 2000) y la civilización Maya desarrollo el pigmento Maya Blue que tiene reportes de uso en estructuras del período Preclásico Superior (350-150 a.C.), (Polette-Niewold *et al.*, 2007; Fernández-Sabido *et al.*, 2012).

El color púrpura fue otro color que impactó diferentes civilizaciones y fue tan exclusivo que sólo las personas con riquezas o poder podían llevar prendas teñidas con ese color; los fenicios fueron quienes se destacaron en el procesamiento y comercialización del color púrpura “Tyrian”, el cual era obtenido a partir de los caracoles (*Murex brandaris* o *Murex trunculus*) y se presume que el desarrollo de este color se generó en la edad de Bronce tardía (1550 – 1200 a.C.), (Jensen, 1963; Stieglitz, 1994).

La obtención de colores a partir de pigmentos o tintes fue una actividad constante en las diferentes civilizaciones, llegando a obtener diferentes colores a partir de minerales, vegetales o insectos (Barnett *et al.*, 2006). La Era Medieval (Edad media – Siglos V a XV) se destacó por el uso de colores brillantes, claros y bien definidos (Barnett *et al.*, 2006); esta época se caracterizó por un bajo desarrollo de colorantes nuevos, pero con mejoras en los procesos de teñido y del transporte de colorantes a través de toda Europa (Abel, 2012). En el Renacimiento (Siglos XV a XVI d. C) la obtención de nuevos colorantes mantuvo una tendencia similar a la Era Medieval; durante el renacimiento el progreso cultural y artístico impulso la obtención a bajo costo de colores ampliamente usados como el oro o dorando, desarrollándose pigmentos sustitutos de oro, ya que, durante

la Era Medieval eran obtenidos de láminas muy finas de los metales que se adherían a la superficie (Barnett et al., 2006).

En 1630 el químico Cornelius Drebbel para mejorar la estabilidad de los colorantes naturales mezcló el rojo cochinilla (colorante obtenido de insectos) con estaño y generó el primer colorante erróneamente señalado como sintético (Becker, 2016). En 1704 Diesbach sintetizó el primer pigmento conocido como Lago Rojo, lo que generó el desarrollo de muchos otros pigmentos. Carl Scheele en 1788 desarrolló el pigmento Verde Esmeralda o Verde Scheele; colorante con una alta toxicidad debido a que estaba compuesto por acetoarsenito de cobre, por lo que se usó sólo hasta 1960 (Barnett et al., 2006).

En 1826 el químico alemán Otto Unverdorben fue el primero en preparar anilina a partir de destilación destructiva del índigo. Investigaciones posteriores para obtener nuevos colorantes incluía procesos metodológicos con la anilina sin saberlo; sin embargo, fue el químico August Wilhelm Von Hofmann quien describió que todas las sustancias estudiadas eran la misma (Johnston, 2008). Hofmann continuó con sus investigaciones, pero fue su estudiante Henry Perkin el que desarrollo y patentó el primer colorante sintético llamado malveína proveniente del alquitrán de hulla en 1854 (Robinson et al., 2001; Abel, 2012). Perkin definitivamente resolvió el problema de manufactura, marcando el inicio de diferentes investigaciones para conseguir colorantes sintéticos nuevos (Johnston, 2008).

El uso de ingredientes destilados de alquitrán de hulla permitió el desarrollo de nuevos tintes, y para 1869 algunos tintes naturales como el Alizarin ya habían sido remplazados por colorantes sintéticos a una fracción del precio (Abel, 2012). Desde entonces, la producción de colorantes se ha diversificado, hasta alcanzar reportes de más de 100.000 colorantes sintéticos (Paz et al., 2017). A principios del siglo XX, la producción de colorantes se concentraba en Europa, actualmente, los mayores productores son China e India, que también son los principales proveedores de tejidos a nivel mundial (Tkaczyk et al., 2020).

2.4 Industrias y sectores que aplican colorantes sintéticos

Actualmente las clases químicas de colorantes que se emplean con mayor frecuencia a escala industrial son azo, antraquinona, índigo, xanteno y triarilmetano (Pereira and Alves, 2011). En particular, se destaca el uso de compuestos aromáticos con estructuras complejas como las antraquinonas (Routoula and Patwardhan, 2020). La mayoría de los colorantes sintéticos se utilizan en las industrias textil y de curtiembres para teñir una gran variedad de productos. No obstante, existen otras industrias y sectores que emplean colorantes orgánicos sintéticos como son la industria cosmética, la industria papelería, la industria alimentaria, la industria farmacéutica y los prestadores de servicios (Hospitales - Universidades), (Tkaczyk et al., 2020), sector de alta importancia para la presente investigación

El sector de los prestadores de servicios emplea colorantes en las técnicas de tinciones biológicas (Hospitales - Universidades), (Tkaczyk et al., 2020). El tipo de colorantes que se encuentran en aguas residuales de los prestadores de servicio varía dependiendo de la metodología de tinción que se lleva a cabo. Por ejemplo, en los laboratorios de investigación biomédica que realizan procedimientos con fines de diagnóstico se pueden encontrar colorantes como Hematoxilina, Eosina Y, Rosa de Bengala u Auramine O. Aunque el volumen de las soluciones de colorantes es relativamente pequeño, la concentración es muy alta (entre ~ 1 a 10 g L^{-1}); generando aguas residuales con alta toxicidad (Sioi et al., 2006). Frecuentemente los prestadores de servicios generan volúmenes considerables de aguas residuales que se pueden diferenciar dependiendo del procedimiento de vertimiento y del origen del colorante en aguas residuales domésticas (ARD) y aguas residuales no domésticas (ARnD). El ARD puede estar contaminada de manera fortuita, por lo que el nivel de contaminación puede ser bajo, pero el ARnD se almacenan en contenedores especiales que permiten la recolección para posteriormente ser tratados por empresas especializadas que realizan la neutralización y disposición final (Pedroza-Camacho et al., 2018).

Los colorantes usados en la industria textil son los de mayor impacto a escala mundial, la aplicación de los colorantes se asocia al costo y a las características de fijación. Por ejemplo, los colorantes azo tienen propiedades de bajo costo, alta intensidad y solidez de color, (Khattab et al., 2020), lo que ha llevado a que sean la clase de colorantes de uso más frecuente (~60 %). Los segundos tintes más utilizados después de los azo son las antraquinonas y se caracterizan por el rendimiento de teñido, la fácil accesibilidad y el bajo costo (Varjani et al., 2020). Sin embargo, el uso de los diferentes tintes depende de propiedades como la afinidad por la fibra, la difusión, la reactividad y la estabilidad de la unión entre el tinte y la fibra (Khattab et al., 2020).

En la industria del papel los colorantes se utilizan para hacer papel de colores brillantes, que se utiliza en la fabricación de adornos decorativos, entre otros. Sin embargo, el uso de colorantes que generan desechos en esta industria está asociado principalmente a la tinción artesanal de papel (Saakshy et al., 2016).

En la industria cosmética productos como lápices labiales, coloretes, sombras de ojos, delineadores de ojos y esmaltes de uñas contienen uno o más colorantes (tintes o pigmentos) con una concentración que oscila entre el 1 y el 25 % para proporcionar los colores deseados (Weisz et al., 2017). No obstante, el sector más importante en el uso del color está asociado a la producción de tintes para el cabello, pues representa casi el 80 % de los productos cosméticos en Europa (Tkaczyk et al., 2020).

Los colorantes en la industria alimentaria se utilizan para hacer que los productos sean más atractivos o compensar las variaciones de color después del procesamiento de alimentos (Tkaczyk et al., 2020); se pueden encontrar en bebidas carbonatadas, bebidas de frutas, bebidas energéticas, caramelos, cereales, postres y bocadillos, entre otros (Stevens et al., 2014). Actualmente se conocen más de 60 colorantes alimentarios sintéticos; entre los más comunes se encuentran los tintes aniónicos Amarillo Ocaso (E-110), Tartrazina (E-102) y Ponceau 4R (E-124) de la clase azo; Verde Sólido FCF (E-143) de la clase trifenilmetano y Amarillo de Quinoleína (E-104) de la clase quinoftalona (Tikhomirova et al., 2018). Aunque el tipo de colorante y la concentración

permitida en los alimentos están reglamentados en cada país, diferentes investigaciones han demostrado el uso de colorantes no permitidos o que exceden el límite máximo permitido; lo que genera riesgo para los consumidores (Tripathi *et al.*, 2007; Rajapaksha *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2017).

Por lo general, los colorantes aprobados para los alimentos apoyados en la normativa emitida por la Comisión del Codex Alimentario (CAC) son también usados en la industria farmacéutica (Šuleková *et al.*, 2017; Gičević *et al.*, 2020), por lo que es común encontrar en los productos farmacéuticos colorantes como Tartrazina (E-102), Amarillo Ocaso (E-110), Ponceau 4R (E-124), Azorubina/Carmoisina (E-122), Amaranto (E-123), Azul Brillante (E-133) y Rojo Allura (E-129), (Gičević *et al.*, 2020).

2.5 Impacto de los colorantes sintéticos sobre el medio ambiente

Se estima que el mayor generador de aguas residuales coloreadas es la industria textil (Hadibarata *et al.*, 2012; Senthivelan *et al.*, 2016). En promedio el 20 % del colorante usado para la tinción de fibras textiles no es fijado a las fibras y se elimina en las aguas residuales (Kant, 2012); generando niveles elevados de contaminación (Kant, 2012). Sin embargo, el daño ambiental no depende únicamente de la cantidad de colorante vertido, sino también de las propiedades ecotoxicológicas de los mismos, de la mezcla de colorantes de diferentes clases químicas y de las otras sustancias que componen el efluente de las industrias (Clarke and Anliker, 1980; Tkaczyk *et al.*, 2020).

El agua residual coloreada que se vierte a los cuerpos de agua superficiales o subterráneos se caracteriza por tener colorantes apreciables a simple vista (<1 ppm), (Golka *et al.*, 2004; Mojsov *et al.*, 2016) que ocasionan la disminución de la concentración de oxígeno disuelto en el agua (Ali, 2010), además, de incrementar los valores de los parámetros fisicoquímicos y biológicos como: la demanda química de oxígeno (DQO), (Zhou *et al.*, 2017), la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), los sólidos disueltos totales (SDT), el nitrógeno total (NT), el fósforo total (FT) y los compuestos orgánicos no biodegradables. Por otra parte los colorantes tienen pH

alcalinos y metales pesados como cromo (Cr), arsénico (Ar) y zinc (Zn), (Berradi et al., 2019).

En general, los colorantes sintéticos son poco biodegradables debido a sus características y estructura, lo que genera un efecto adverso sobre el medio ambiente (Husain, 2006). La mayoría de los colorantes sintéticos son recalcitrantes, carcinogénicos y tóxicos para los ecosistemas (Aghaie-Khouzani et al., 2012). Por otra parte el efecto negativo de los colorantes se puede biomagnificar, generando tasas mayores de contaminación en los niveles tróficos más altos (Lellis et al., 2019). Sin embargo, es importante señalar que la toxicidad y los efectos negativos de cada colorante deben ser evaluados individualmente, ya que el daño que puede causar depende de la estructura y la concentración (dosis de exposición), (Ferraz et al., 2011), lo que también ha llevado a que algunos colorantes pueden persistir en el medio ambiente por tiempo prolongado (~50 años o más), (Pereira and Alves, 2011). La persistencia de los colorantes está estrechamente relacionada con su reactividad química, por lo que los compuestos insaturados son menos persistentes que los saturados. La persistencia de compuestos aromáticos aumenta con el número de sustituyentes y los sustituyentes halógenos aumentan la persistencia de los colorantes (Berradi et al., 2019), demostrando la pertinencia de evaluar la degradación de colorantes de manera individual y combinada.

Los colorantes de la clase azo han sido muy estudiados por su uso y efectos negativos; se reporta que entre el 60 y el 70% de los colorantes de esta clase son tóxicos, cancerígenos y/o resistentes a los tratamientos fisicoquímicos convencionales (Berradi et al., 2019). La toxicidad de muchos de los colorante azo se genera principalmente después de la reducción del colorante, debido a que se forman aminas aromáticas como por ejemplo la bencidina y su contraparte, como la dimetoxi y la dimetilbencidina, la cual puede mostrar efecto mutagénico conduciendo a enfermedades como el cáncer. El efecto cancerígeno de las aminas aromáticas se produce a través de la oxidación metabólica a intermediarios electrófilos reductores como las sales de diazonio las cuales se unen covalentemente al ADN a través de un proceso irreversible. Una

variación de este mecanismo es la reducción de uno o dos enlaces azo que se encuentran en ciertos colorantes a la correspondiente amina mono-azo aromática tóxica (Sarayu and Sandhya, 2012; Sarkar *et al.*, 2017; Varjani *et al.*, 2020).

Cuando los colorantes azo iónicos son descartados en aguas superficiales o residuales, pueden unirse a la materia orgánica suspendida y mediante interacciones electrostáticas adherirse a sedimentos o lodos de aguas residuales, aumentando la persistencia (Soriano *et al.*, 2014), adicionalmente el agua coloreada o los lodos contaminados pueden entrar en contacto con los animales acuáticos, transfiriendo la toxicidad a través de la cadena trófica hasta llegar al ser humano, causando trastornos de salud como hipertensión, calambres, náuseas, hemorragias, ulceración de la piel o las membranas mucosas y dependiendo de la exposición al colorante pueden haber daños graves en riñón, sistema reproductivo, hígado, cerebro y sistema nervioso central (Sarayu and Sandhya, 2012; Sarkar *et al.*, 2017). Parrot *et al.* (2016) evaluaron los efectos de colorantes azo sobre el pez de cabeza gorda (*Pimephales promelas*) en estado embrionario (larva) mediante la comparación de los efectos a diferentes concentraciones; encontrando que con el uso de 25.4 mg L⁻¹ y 16.7 mg L⁻¹ de los colorantes azo Amarillo disperso 7 y Rojo Sudan G, respectivamente, se disminuía la supervivencia de las larvas, muriendo entre 4 y 10 días después de la eclosión (Parrott *et al.*, 2016).

Algunas investigaciones han considerados los colorantes antraquinoides la clase más tóxica y aunque son ampliamente utilizados, las investigaciones sobre biotransformación y toxicidad siempre han sido limitadas en comparación con los colorantes azoicos; situación que es extrapolable a otras clases de colorantes. Novotný *et al.* (2006) evaluaron la toxicidad de dos tintes azo (Naranja reactivo 16 (RO16); Rojo Congo (CR)) y dos antraquinonas (Azul Brillante Remazol R (RBBR); Azul Disperso 3 (DB3)) utilizando la bacteria *Vibrio fischeri*, la microalga *Selenastrum capricornutum* y el ciliado *Tetrahymena pyriformis*; encontrando que el colorante DB3 fue el más tóxico y mostró efectos mutagénicos en todas las cepas de *S. typhimurium* utilizadas después de la activación metabólica “*in vitro*” (Novotný *et al.*, 2006). La evaluación de otros

antraquinoides ha generado diferentes resultados. El azul Reactivo 4 fue considerado como fitotóxico, citotóxico y genotóxico (Chaudhari *et al.*, 2017), pero los colorantes Azul Ácido 80 (AB80) y Azul Ácido 129 (AB129) evaluados a concentraciones altas no causaron efecto negativo en larvas de peces de cabeza gorda (*Pimephales promelas*) después de 14 días después de exposición (Parrott *et al.*, 2016).

Los colorantes triarilmetano han sido reconocidos por afectar gravemente el sistema metabólico, acumularse y de penetrar en la piel y actuar como irritante si se ingiere o inhala, inducir efectos cancerígenos, producir sarcomas y de causar metahemoglobinemia cuando hay sobreexposición (Mittal *et al.*, 2010). Una investigación realizada en cuerpos de agua de Bélgica para identificar el nivel y la acumulación de colorantes tóxicos en la especie silvestre en vía de extinción *Anguilla anguilla* (Anguila europea) encontró que la anguila estaba contaminada con colorantes triarilmetano Verde de Malaquita (MG), Cristal violeta (CV) y Verde Brillante (GB). Entre los tres colorantes el MG ha sido muy estudiado debido a que es considerado un tóxico multiorgánico, que afecta el sistema inmunológico y reproductivo y posee propiedades genotóxicas y cancerígenas, efectos que son una amenaza para esta y otras especies en peligro crítico de extinción (Belpaire *et al.*, 2015).

En una investigación controlada se empleó efluente de la industria textil (que contenía el tinte Índigo), para evaluar el efecto sobre el crecimiento, la producción de biomasa y la plasticidad fenotípica de la microalga *Scenedesmus quadricauda* donde se demostró el estrés ambiental que ocasiona el colorante, ya que la tasa de crecimiento de la microalga disminuyó a medida que aumentaba la concentración del efluente y a concentraciones altas de colorante la clorofila a, la densidad celular y el peso seco fueron afectados negativamente (Chia and Musa, 2014).

No obstante, el tipo de colorante no debe ser considerado como el único factor responsable de los efectos negativos sobre el medio ambiente. Croce *et al.* (2017) realizaron bioensayos de toxicidad usando *Daphnia magna* y *Raphidocelis subcapitata*

en presencia de 42 colorantes comerciales; encontraron que 9 de los colorantes eran tóxicos para *Daphnia magna* a concentraciones inferiores de 100 mg L⁻¹, mientras que 30 de los colorantes fueron tóxicos para *Raphidocelis subcapitata*; demostrando la sensibilidad de algunas especies y efectos negativos de diferentes colorantes al medio ambiente (Croce *et al.*, 2017).

2.6 Tratamientos de aguas residuales coloreadas

La eliminación del color es uno de los indicadores más importantes para el tratamiento de aguas residuales que contienen tintes debido a los efectos medioambientales negativos que ocasionan (Berkessa *et al.*, 2020); siendo la etapa más crítica para un tratamiento efectivo es la caracterización del efluente, debido a que los efluentes generados en las distintas industrias difieren en cuanto a los parámetros de vertimiento establecidos en los diferentes países (Khan *et al.*, 2020). Los parámetros de calidad del agua son una forma de conocer los cambios que ocurren en el agua residual cuando se efectúan los tratamientos (Gulzar *et al.*, 2017).

Reducir el costo del tratamiento y eliminar el mayor porcentaje de los contaminantes antes de la descarga de aguas residuales a los cuerpos de agua es el objetivo de diferentes investigaciones que incluyen procesos químicos, físicos, bioquímicos, biológicos e híbridos (Holkar *et al.*, 2016; Hussain *et al.*, 2019; Berkessa *et al.*, 2020). No obstante, en el tratamiento de aguas residuales usualmente se pueden utilizar múltiples tratamientos que combinan procesos físicos, químicos y/o biológicos para eliminar la mayor cantidad de contaminantes de los efluentes (Chatzisymeon *et al.*, 2006; Berkessa *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2020).

Entre los tres tratamientos (biológico, químico y físico), la eliminación de colorantes a través de procesos físicos es la más frecuente. Estos métodos son seleccionados por su simplicidad y eficiencia e incluyen métodos convencionales como la adsorción, la coagulación o floculación, el intercambio iónico, la irradiación, la filtración por membrana, la nanofiltración/ultrafiltración y la ósmosis inversa (Tabla 2.2)

(Katheresan *et al.*, 2018). Se caracterizan por seguir procesos no destructivos, no obstante, dependiendo del tratamiento empleado se pueden generar lodos peligrosos de difícil eliminación y tratamiento, aun así, es una opción viable para colorantes que durante su tratamiento generan productos más tóxicos que el colorante original (Hussain *et al.*, 2019).

Los tratamientos químicos de aguas son de alto costo al compararlos con los tratamientos físicos o biológicas. Aunque en los tratamientos químicos algunos pueden ser eficientes en la eliminación de color (Tabla 2.3), (Katheresan *et al.*, 2018), el consumo de sustancias oxidantes fuertes, como el cloro y el ozono, para promover la degradación química en algunos procesos es tan alto, que a gran escala terminan generando una problemática nueva, además, requieren equipos específicos que tienen un alto costo y generan un consumo energético alto (Khattab *et al.*, 2020).

Tabla 2.2 Algunos tratamientos físicos empleados en la remoción de colorantes.

Tratamiento	Colorante	Remoción de color	Parámetros que influyen en la operación	Ventajas	Desventajas	Referencia
Adsorción (Carbón activado - materiales adsorbentes)	Verde Claro SF	Asociado a los parámetros de operación	El tiempo de contacto, tamaño de partícula del absorbente, concentración del absorbente, pH	Entre el 75 y 86 % de adsorción tuvo lugar en las primeras 2 h	Se requieren procesos de desorción para retirar el colorante, costos de operación relativamente altos.	(Mittal et al., 2010)
	Cristal violeta	Entre 72.2 y 97.8 % *	pH, material adsorbente, temperatura de adsorción, área superficial del adsorbente	Alta capacidad de adsorción	Se requieren temperaturas elevadas (70 °C), lo que aumenta los costos operativos.	(Fabryanty et al., 2017)
Nanofiltración (membrana compuesta)	Rojo Congo, Azul de Metilo, Amarillo Ocaso y Rojo Neutro	Entre 80.6 ± 0.5 y 99.8 ± 0.1 % *	Composición y corte de peso molecular de las membranas, flujo de alimentación y carga de los colorantes.	Alta eficiencia y posible reutilización del colorante obtenido.	La adsorción del colorante en la membrana, alto costo y se requieren procedimientos de limpieza de las membranas.	(Liu et al., 2017)
Coagulación - floculación	Negro ácido 210	93.2 %	pH y dosis del coagulante.	Simple y económico	Se requiere algunos productos químicos considerados tóxicos, generación de lodos	(Puchana-Rosero et al., 2018)
Irradiación (Membranas fotocatalíticas)	Azul de metileno, Rojo reactivo KE-3B, Naranja reactivo XBR	Entre 31.0 y 85.0 % *	Composición, hidrofobicidad y porosidad de la membrana, pH y sales, estructura del cromóforo, tiempo de irradiación	Degradación bajo irradiación de luz visible	Se emplean solventes tóxicos. La presencia de sales disminuye la remoción de color	(Alyarnezhad et al., 2020)

*Dependiente del tratamiento y el colorante

Tabla 2.3 Algunos tratamientos físicos empleados en la remoción de colorantes.

Tratamiento	Colorante	Remoción de color	Parámetros que influyen en la operación	Ventajas	Desventajas	Referencia
Ozonización	Agua residual con color	25.0 %	pH, producción de ozono, concentración del colorante	Fácil aplicación industrial (tratamiento in situ) y no se generan lodos	Alto costo por consumo de energía, baja eficiencia de remoción. La calidad del efluente	(Asaithambi <i>et al.</i> , 2017)
Sonolisis	Agua residual con color	15.0 %	pH, poder de sonicación	No hay producción adicional de lodos.	Alto costo y consumo de energía, baja eficiencia de remoción requiere altos volúmenes de oxígeno disuelto	(Nidheesh <i>et al.</i> , 2013; Asaithambi <i>et al.</i> , 2017)
Oxidación electroquímica	Efluente sintético con 16 colorantes	Entre 26.0 y 85.0 %*	Salinidad, pH, tipo y concentración de electrolito y tiempo de tratamiento	La decoloración del efluente es rápida y eficiente, es de fácil implementación	Proceso con alto consumo energético, requiere de compuestos catalíticos	(Chatzisyneon <i>et al.</i> , 2006)
Proceso de oxidación avanzado (UV / H ₂ O ₂)	Verde Reactivo 19	99 %	Nivel de irradiación, pH, relación Colorante/H ₂ O ₂ , estructura del colorante	Fácil manejo, estabilidad alta, disponibilidad de H ₂ O ₂ , no hay formación de lodos y tasa alta de mineralización	Costoso y se generan productos indeseables	(Zuorro and Lavecchia, 2014)
Fenton y foto-Fenton	Naranja reactivo 4	Entre 56.2 y 98.1 % *	pH	No se requieren sistemas presurizados complicados para el proceso de oxidación y los reactivos son económicos	Requiere pH ácidos (3.0), no se pueden eliminar los tintes dispersos y de tina, generación alta de lodos de hierro	(Muruganandham and Swaminathan, 2004; Nidheesh <i>et al.</i> , 2013; Katheresan <i>et al.</i> , 2018)

*Depende del tratamiento y el colorante

Los métodos biológicos se consideran alternativas viables para el tratamiento de aguas residuales coloreadas debido a que son: ecológicos, rentables, dependiendo del tratamiento producen menos lodos, frecuentemente se obtienen metabolitos no peligrosos o alcanzan la mineralización completa y consumen niveles bajos de agua (Berkessa et al., 2020). No obstante, algunos estudios han encontrado que los métodos biológicos requieren tiempos prolongados de procesamiento y algunos métodos son ineficaces para eliminar tintes poliméricos altamente estructurados de baja biodegradabilidad. Además, no pueden aplicarse en algunas de las aguas residuales coloreadas debido a la toxicidad de los tintes comerciales en los microorganismos utilizados en el proceso. Los tratamientos biológicos generan la eliminación de colorantes mediante procesos como la adsorción por biomasa microbiana, la biodegradación con cultivos fúngicos, cultivos microbianos, cultivos mixtos, alga o enzimas (Nidheesh et al., 2013), llevado a evaluar tratamientos que no requieren del uso directo del microorganismo, como la adsorción por biomasa microbiana (biosorción) (Lellis et al., 2019).

La biosorción emplea células vivas o muertas, estas últimas tienen ventajas como biosorbentes ya que no requieren nutrientes, se pueden almacenar y utilizar durante períodos prolongados (Solís et al., 2012). Aun así, el tratamiento por biosorción no elimina completamente el problema, ya que, al quedar atrapado en la matriz del adsorbente, se necesitan tratamientos posteriores para eliminar la matriz contaminada, limitando el tratamiento de grandes volúmenes de efluentes obtenidos en las diferentes industrias (Ali, 2010). Aun así, la biosorción ha sido muy empleada como estrategia de remoción de color, ya que el costo de operación es bajo y se pueden utilizar sistemas híbridos que aumentan la eficiencia en la remoción del color (Lellis et al., 2019).

Almeida and Corso (2014) evaluaron la biosorción del Rojo Procion MX-5B empleando biomasa de *Aspergillus niger* (pellet) y encontraron que después de 3 h de incubación a 30 °C el porcentaje de decoloración fue sólo el 30 % y los análisis UV-Vis mostraron que no hubo cambios en la estructura del colorante. En este estudio también se evaluó la biodegradación empleando el hongo *Aspergillus terreus*, el cual logró 98 % de

decoloración después de 336 h de tratamiento (Almeida and Corso, 2014), pero aunque la decoloración fue eficiente, el tiempo de tratamiento no fue apropiado para su aplicación a mayor escala. Además, del tiempo de tratamiento, la eficiencia en la remoción es influenciada por factores como la relación carga orgánica/colorante, la temperatura, la concentración de oxígeno en el sistema, la agitación, el pH, la concentración de sales, la concentración de colorante y la carga microbiana (Holkar et al., 2016; Varjani et al., 2020).

Es importante conocer el tipo de microorganismo a utilizar en degradación de colorantes ya que algunas bacterias, hongos o algas son capaces de degradar los colorantes debido a la capacidad para producir ciertas enzimas (Legerská et al., 2016; Collivignarelli et al., 2019). En general la biodegradación de los colorantes mediada por enzimas es más eficiente (Choi, 2021) ya que la actividad catalítica aumenta la velocidad de reacción y se requiere de pequeñas cantidades de la enzima. Por lo tanto, los microorganismos que producen enzimas pueden actuar sobre los colorantes y disminuir o eliminar de forma eficiente la contaminación del agua (Sarkar et al., 2017). Sin embargo, los microorganismos pueden ser afectados por el pH, las sustancias químicas, la alta salinidad y por los compuestos orgánicos tóxicos (Solís et al., 2012); propiciando ventajas al uso de enzimas como estrategia alterna para el tratamiento de colorantes y otros compuestos contaminantes industriales.

Las enzimas son catalizadores con variada especificidad que por lo general producen subproductos de menor toxicidad, son de alta eficiencia y se ha demostrado que tienen potencial en el tratamiento de colorantes (Sarkar et al., 2017; Routoula and Patwardhan, 2020). Algunas de las razones que han limitado el uso de enzimas es que se considera que su producción es costosa (Sarkar et al., 2017). No obstante, las ventajas de uso de las enzimas como: ser relativamente más fáciles de usar, la especificidad por el sustrato, la fácil regulación de la actividad catalítica y la implementación han diversificado su uso (Sarkar et al., 2017).

Algunas de las enzimas que se han usado para la degradación de colorantes incluyen la lignina peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14), la manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13), la azoreductasa (EC 1.7.1.6) o la lacasa (Lac, EC 1.10.3.2), (Legerská et al., 2016; Collivignarelli et al., 2019). Cada una de estas enzimas tiene características propias que definen su eficiencia de biodegradación y condiciones de trabajo. No obstante, entre las enzimas mencionadas las lacasas se caracterizan por no requerir peróxido de hidrógeno como ocurre con LiP y MnP, ni requerir cofactores como NADH₂, NADPH₂ y FADH₂ para la activación de la catálisis como ocurre con las azoreductasas (Legerská et al., 2016).

2.7 Lacasas

Las lacasas (p-difenol: dióxido oxidoreductasas) son enzimas oxidoreductasas multicobre (Antosová and Sychrová, 2016), capaces de catalizar la reducción de oxígeno molecular (O₂) a agua (H₂O), (Morozova et al., 2007). La lacasa se reportó por primera vez como parte de la secreción de savia, generada por el árbol japonés *Rhus vernicifera* por Yoshida en 1883 (Yoshida, 1883). Actualmente se conoce que las lacasas se encuentran ampliamente distribuidas en plantas y hongos degradadores de la lignina (Basidiomicetos, Ascomicetos y Deuteromicetes), (Ramírez and Cocha, 2003; Shraddha et al., 2011; Patel et al., 2014); también se ha demostrado la producción de lacasas en bacterias (Yue et al., 2017), algas (Otto and Schlosser, 2014) e insectos (Asano et al., 2014).

Las lacasas más estudiadas han sido las fúngicas, debido a su alto potencial redox, en las que se conocen funciones como la degradación y mineralización de la lignina (característica asociada a los diferentes hongos), la síntesis de pigmento (melaninas, que se producen contra el estrés ambiental), la formación de cuerpos fructíferos, la morfogénesis fúngica, la desintoxicación, la esporulación y en algunos hongos se demuestra su participación en procesos patogénicos (hongos patógenos), (Thurston, 1994; Dwivedi et al., 2011). En plantas las lacasas participan en la formación de barreras protectoras insolubles (secreción de laca) contribuyendo en la defensa de la

planta, la polimerización de la lignina (Berthet *et al.*, 2012), la homeostasis de las citoquininas, la polimerización de flavonoides en capas de semillas y la resistencia a contaminantes fenólicos (Otto and Schlosser, 2014). En bacterias las lacasas están involucradas en la producción de melanina, la resistencia de las esporas, la morfogénesis, la desintoxicación del cobre y la oxidación del manganeso (Alexandre and Zhulin, 2000; Strong and Claus, 2011). En insectos las lacasas tienen como función la esclerotización y pigmentación de la cutícula (Asano *et al.*, 2014). Por último, en las algas las lacasas están vinculadas a la detoxificación de compuestos fenólicos, la síntesis de biopolímeros asociados a la pared celular y la adquisición de nutrientes a través de la transformación de sustratos lignocelulósicos (Otto and Schlosser, 2014).

2.8 Conformación del centro activo de las lacasas

El sitio activo de la lacasas tiene cuatro Cu^{+2} , distribuidos en tres sitios (Sitarz *et al.*, 2016), identificados como cobre tipo I (CuT1), tipo II (CuT2) y tipo III (CuT3), donde el cobre CuT2 y un par de cobre CuT3 conforman el centro de cobre trinuclear (TNC) (Figura 2.1), (Komori and Higuchi, 2010; Tonin *et al.*, 2016). Comúnmente las lacasas presentan la misma arquitectura estructural, compuesta por tres dominios tipo cupredoxina, dispuestos secuencialmente (Dominios 1, 2 y 3), donde el CuT1 se encuentra en el dominio 1 y los cobre que componen TNC (CuT2 y dos CuT3) se unen a los dominios 1 y 3 (Komori and Higuchi, 2010; Hakulinen and Rouvinen, 2015).

El sitio CuT1 es mononuclear y confiere el color azul a la enzima a causa de las características espectroscópicas. El CuT1 se encuentra incrustado en el dominio 3, aproximadamente a 6.5 Å debajo de la superficie de la enzima; en una depresión de la superficie, delimitada por un giro β , que pertenece al dominio 1, y dos giros β del dominio 3, involucrados en la unión del sustrato (Piontek *et al.*, 2002). La coordinación de CuT1 se diferencia en función del microorganismo de origen.

A pesar de que, en varios estudios teóricos, se demostró que los iones Cu (II) prefieren la coordinación cuadrada-plana y cuadrada-piramidal (Stanek *et al.*, 2018), la mayoría

de las lacasas fúngicas se caracterizan por la ausencia de un cuarto ligando axial en CuT1 (Cannatelli and Ragauskas, 2017). En estos casos el CuT1 se encuentra coordinado con tres ligandos que corresponden a 2 residuos de Histidina y un residuo de Cisteína (Figura 2.1), (Jones and Solomon, 2015; Plegaria *et al.*, 2015). La tricoordinación es favorecida presumiblemente porque la tetracoordinación reduce la exposición catiónica al disolvente, disminuyendo su polarización (Vázquez-Lima and Guadarrama, 2012). La ausencia del cuarto ligando se compensa con un enlace Cu-S más fuerte, influyendo sobre el E^0 .

En lacasas de origen bacteriano el CuT1 puede estar tetracoordinado a un ligando axial como Metionina o Glutamina, mientras que las lacasas fúngicas poseen un residuo no coordinador como Leucina o Fenilalanina en lugar de la Metionina axial. Estas diferencias en la geometría de coordinación en las lacasas influye en la estructura electrónica y la transferencia de electrones al CuT1 (Figura 2.2), (Olbrich *et al.*, 2019).

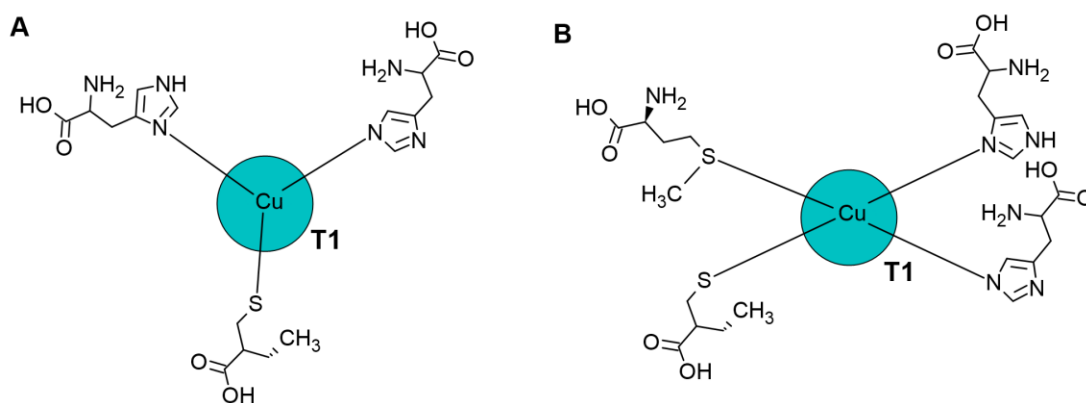


Figura 2.2 Coordinación de ligando en el cobre T1. A Coordinación del cobre en lacasas fúngicas (tricoordinación) B. Tetracoordinación en lacasas no fúngicas.

El CuT2 es un sitio de cobre mononuclear (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013) que no muestra una característica de absorbancia, pero tiene una constante de acoplamiento paralelo hiperfino, similar a la de un centro de cobre tetragonal típico (Jones and Solomon, 2015). Este cobre se encuentra coordinado por dos residuos de Histidina y un átomo de

Oxígeno como un ligando hidróxido (OH⁻) y está ubicado estratégicamente cerca a los cobres T3, formando una configuración coplanar trigonal (Sitarz et al., 2016).

El sitio de cobre CuT3 es binuclear, y está compuesto por un par de átomos de cobre identificados como CuT3 α y CuT3 β (Rivera-Hoyos et al., 2013; Sitarz et al., 2016). Los cobres del sitio CuT3 tienen una absorbancia débil en el espectro UV (cercano a 330 nm) y no tiene señal de resonancia paramagnética electrónica (EPR), debido al acoplamiento antiferromagnético (AF) que resulta de un ligando que forma un puente de hidróxido entre los cobres (Jones and Solomon, 2015). Cada uno de los cobres del sitio se encuentran coordinados a 3 Histidinas y comparten el grupo hidróxido.

Aunque es común que las lacasas tengan los cuatro átomos de cobre, también se ha encontrado que las lacasas que no tienen el característico color azul, pueden tener átomos de zinc o hierro en lugar de cuatro átomos de cobre (Patel et al., 2014). En la lacasa pura del hongo *Myrothecium verrucaria* NF-05 después de un análisis cuantitativo se obtuvo 3.08 ± 0.3 átomos de cobre y 0.95 ± 0.2 átomos de hierro por molécula de proteína; sin embargo, la investigación no definió la disposición de los átomos metálicos y cual cobre fue reemplazado por el átomo de hierro (Zhao et al., 2012). En la lacasa pura del hongo *Phellinus ribis* los análisis del espectro UV-VIS no mostraron el pico cercano a los 600 nm característico de CuT1 y después del análisis cuantitativo se obtuvo 2.0 ± 0.3 átomos de zinc y 0.9 ± 0.2 átomos de cobre por molécula de proteína; no obstante, los análisis de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente, mostraron que la enzima contenía iones de zinc, cobre y manganeso (Min et al., 2001). La lacasa pura POXA1 de *Pleurotus ostreatus* fue analizada por absorción atómica, encontrando que tenía 0.7 ± 0.2 de cobre/mol, 0.7 ± 0.2 de hierro/mol y 0.2 ± 0.2 de zinc/mol de proteína, lo que sugeriría una isoenzima con una estequiometría cobre/hierro/zinc de 1:1:2 (Palmieri et al., 1997).

2.9 Mecanismo catalítico de la lacasas

Para iniciar la actividad catalítica se cree que las lacasas deben estar en estado de reposo con todos los cobres en estado oxidado (Cu^{2+}), (Hakulinen and Rouvinen, 2015). El ciclo catalítico en las lacasas comienza con la oxidación del sustrato, el CuT1 (Cu^{2+}) es el encargado de secuestrar los electrones y transferirlos hacia el centro de cobre trinuclear a través de la vía His-Cys-His (Rivera-Hoyos et al., 2013; Hakulinen and Rouvinen, 2015; Tonin et al., 2016). Después de la oxidación de cuatro electrones, se produce la forma completamente reducida (Cu^+), durante la oxidación la transferencia intramolecular de electrones se realiza junto con una transferencia de protones, necesaria para la reducción de O_2 en H_2O , a través de grupos ionizables ubicados dentro de los canales del TNC (Figura 2.3), (Mate et al., 2010; Rivera-Hoyos et al., 2013; Hakulinen and Rouvinen, 2015; Pardo and Camarero, 2015; Senthivelan et al., 2016), (Figura 2.1).

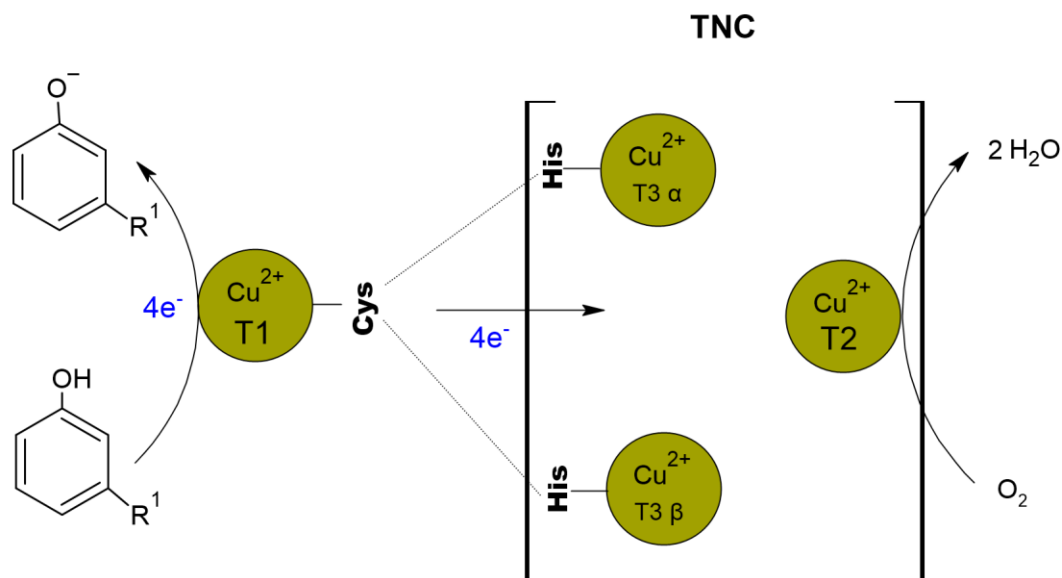


Figura 2.3. Mecanismo simplificado de la reacción de oxidación del sustrato en las lacasas. Modificado de (Rodríguez-Delgado et al., 2015).

El mecanismo de reacción de las lacasas funciona como una batería, pues almacena individualmente los electrones de la reacción de oxidación para reducir el oxígeno molecular y producir agua después de haber recibido cuatro electrones (Senthivelan et

al., 2016). Justamente, el uso de oxígeno en las reacciones ha despertado el interés por las lacasas a nivel industrial; al introducir O₂ como oxidante primario y controlar las reacciones con la inyección o eliminación de la presión parcial de O₂ durante el proceso enzimático (Hildén *et al.*, 2009).

Adicional a la funcionalidad de los cobres para la oxidación de diferentes sustratos, existe un parámetro estructural crítico en las lacasas. Se ha identificado que la presencia de una cola C-terminal en algunas lacasas puede actuar como un tapón que bloquea el acceso al canal de agua del TNC, la cual, tiene una extensión variable de residuos dependiendo del origen de la enzima (Pardo and Camarero, 2015). Giardina *et al.* (1999) realizó un análisis automático de secuencia de la cola C-terminal de POXA 1B pura; determinando que era heterogénea. Durante los análisis identificaron tres secuencias: -Leu-Pro-Ala-Pro-Leu-Lys (abundancia relativa, 40 - 45 %); -Leu-Pro-Ala-Pro-Leu (40 - 45 %) y -Leu-Pro-Ala-Pro (10 - 20 %). Las tres secuencias C-terminales parecían generarse a partir de la misma cadena polipeptídica y la heterogeneidad observada podría explicarse por la existencia de procesamiento C-terminal de la proteína o durante el procedimiento de purificación (Giardina *et al.*, 1999). Andberg *et al.*, (2009) generaron dos mutantes de la lacasa MaL de *M. albomyces* para evaluar el efecto de la cola C-terminal y encontraron que en el mutante DSGL₅₅₉ que tenía la delección de los cuatro últimos residuos afectaba la actividad de la enzima, haciéndola casi inactiva; en el caso de la mutación L559A la cual evitaba la escisión C-terminal se demostró cambios en la geometría del sitio trinuclear, así como, la importancia del tapón C-terminal en la actividad lacasa, la estabilidad y la cinética (Andberg *et al.*, 2009).

2.10 Potencial redox en las lacasas

Las lacasas importantes para las aplicaciones industriales son las que poseen alto potencial redox (Liu *et al.*, 2014). En las lacasas el comportamiento catalítico sobre la mayoría de los sustratos reductores depende del E^0 en el CuT1, ya que este es el aceptor de electrones (Wong, 2009). El E^0 es característico de cada enzima, con un rango que varía entre ~0.400 a 0.800 V (Zimbardi *et al.*, 2016). Las lacasas con potencial redox

bajo, oscilan entre 0.340 y 0.490 V y comúnmente tienen una Metionina como ligando axial del CuT1; las lacasas con potencial redox medio, oscilan entre 0.470 y 0.710 V y tienen una Leucina no coordinante y las lacasas con potencial redox alto oscilan entre 0.720 y 0.780 V y la mayoría presentan una Fenilalanina no coordinante (Olbrich et al., 2019).

Además, se ha detectado que para lacasas con E^0 alto existe una mayor distancia de coordinación entre el CuT1 y un residuo de His (Figura 2.2 A), (Cannatelli and Ragauskas, 2017). El aumento de la distancia se observó en la estructura de la lacasa TvL de *Trametes versicolor* y se cree que es causado por un enlace de hidrógeno entre dos residuos altamente conservados (Glu⁴⁶⁰ – Ser¹¹³) que genera el desplazamiento del segmento helicoidal donde se ubica el residuo de His⁴⁵⁸, alejando el N del residuo His⁴⁵⁸ del CuT1 (Piontek et al., 2002). Se ha propuesto que una mayor distancia entre Cu-N (His) hace que el ion Cu sea más deficiente en electrones debido a una menor contribución del N, lo que puede desestabilizar estados de oxidación más altos, aumentando así el E_0 (Giardina et al., 2010; Cannatelli and Ragauskas, 2017).

En conjunto, las variaciones en el potencial redox del CuT1 observado entre las lacasas no se pueden atribuir a una sola característica estructural, sino a la suma de factores como la geometría de coordinación de CuT1 y la naturaleza de los residuos que influyen en la accesibilidad del disolvente, los enlaces de hidrógeno y la anisotropía dieléctrica (Giardina et al., 2010).

El potencial redox es un parámetro clave en las enzimas, ya que a mayor potencial redox, el rango de sustratos que puede transformar se amplía (Macellaro et al., 2014), por lo que el E^0 restringe los sustratos que las enzimas pueden oxidar. Sin embargo, la capacidad oxidativa también se puede mejorar con el uso de mediadores; lo que podría ser un obstáculo a nivel industrial debido al alto costo y la toxicidad de los mediadores. Por este motivo, las lacasas con alto potencial redox son más atractivas para fines biotecnológicos y ambientales (Zimbardi et al., 2016).

2.11 Estabilidad de las lacasas

Los estudios de estabilidad utilizan diferentes metodologías de análisis para identificar la respuesta de la enzima expuesta a diversas condiciones. Las metodologías de análisis más frecuentes para el estudio de la estabilidad proteica se orientan a determinar la estabilidad cinética y la estabilidad termodinámica (Karlström *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2014; Morales-Álvarez *et al.*, 2017b; Ardila-Leal *et al.*, 2019), pues permiten identificar el efecto de diferentes factores (temperatura, pH, presión e inhibidores de la reacción) sobre la actividad y conformación de las enzimas; generando resultados que facilitan la detección de las condiciones óptimas para el funcionamiento y almacenamiento de la enzima estudiada. La estabilidad termodinámica se define por la energía de estabilización libre de las enzimas (ΔG_{stab} donde se refleja la diferencia entre las energías libres de los estados plegados y desplegados de la proteína) y por la temperatura de fusión de la proteína (melting temperature (T_m); temperatura a la cual el 50 % de la proteína se desdobra). La estabilidad cinética depende de la barrera energética para la inactivación irreversible y se expresa como la vida media de la enzima ($t_{1/2}$) a una temperatura definida. Por lo general las dos estabilidades se correlacionan, ya que al aumentar la resistencia de la enzima al desdoblamiento (mayor T_m) también aumenta su resistencia a la inactivación (mayor $t_{1/2}$), (Brissos *et al.*, 2014).

Evaluar la estabilidad a diferentes temperaturas y pHs ha sido uno de los objetivos más importantes para caracterizar adecuadamente una enzima. Li *et al.* (2016) evaluaron el efecto del pH y la temperatura sobre la lacasa LS-10C de *Trametes sp.*, para ello incubaron la enzima a pHs entre 2.5–7.0 y entre 20–70 °C durante una hora, obteniendo un rango de pH óptimo de 4.0-4.5 y 40 °C como temperatura optima (Li *et al.* (2016). Bertrand *et al.* (2016) encontraron que en la lacasa Lac6c de *Trametes versicolor* después de 120 min de exposición a temperaturas entre 25 y 70 °C presentaba variaciones en la actividad relativa entre el 20 y 75 %; no obstante, la consideraron muy estable, debido a que mantenía un promedio de la actividad relativa de 50 %. Con relación al pH detectaron que variaba considerablemente, manteniendo 3, 7, y 28 % de su actividad relativa a pH 3, 4 y 5, respectivamente, después de 4 h de exposición

(Bertrand *et al.*, 2016). Bao *et al.* (2013) encontraron que la lacasa lac1 de *Coprinus comatus* mantenía una actividad residual de 51 % después de una hora a 60 °C; en cuanto al pH encontraron que el óptimo variaba dependiendo del sustrato usado para evaluar la actividad residual, obteniendo con ABTS (2,2'azino bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)), guayacol, DMP (2,6 dimetoxifenol) y la siringaldazina pH óptimos de 3.0, 6.0, 5.0 y 6.0, respectivamente (Bao *et al.*, 2013). Estas investigaciones demuestran la importancia de conocer la estabilidad enzimática de cada isoenzima para definir condiciones de uso y almacenamiento más eficiente; así como los diferentes sustratos sobre el cual la enzima puede actuar, ya que cada isoenzima tiene afinidades que varían dependiendo de las condiciones.

Existen estudios de estabilidad que se han orientado a determinar los cambios conformacionales de una molécula, bajo la influencia de diferentes factores en un tiempo de almacenamiento, conocido como método indicador de estabilidad (SIM – sigla en inglés); método que evalúa los cambios de las moléculas sin la interferencia de excipientes, impurezas y productos que induzcan la degradación, aplicado principalmente a productos de uso farmacéutico (Blessy *et al.*, 2014). De manera general, cuando se estudia la estabilidad de proteínas y/o enzimas, suele realizarse de tres formas: a tiempo real (Pabari *et al.*, 2015), de forma acelerada (Jain and Roy, 2011), o computacionalmente (simulación dinámica computacional), (Christensen and Kepp, 2013; Magliery, 2015). En todos los casos, el estudio conduce al monitoreo periódico de los cambios en las características de la proteína y/o enzima (bioquímica, conformacional, actividad enzimática, entre otras) en un período de tiempo prolongado, bajo la influencia de diferentes temperaturas.

Si el estudio de estabilidad es a tiempo real (Pabari *et al.*, 2015), se emplean temperaturas que hayan demostrado que no alteran significativamente las características de la proteína y/o enzima; incluyendo la temperatura a la cual la proteína y/o enzima presenta actividad enzimática óptima o mantiene su conformación nativa. Cuando se hace el estudio de estabilidad acelerada (Jain and Roy, 2011), se suelen emplear condiciones bajo estrés para la proteína y/o enzima como temperaturas

altas (Ej. ≥ 40 °C). En el caso de la simulación dinámica computacional, se evalúan diferentes temperaturas hasta encontrar la más apropiada para el desempeño o funcionamiento de la proteína y/o enzima; el procesamiento de los datos identifica los sitios críticos en la estabilidad de diferentes enzimas (Christensen and Kepp, 2013; Magliery, 2015), así como comparar lacasas de diferentes orígenes para determinar cuáles presentan una estabilidad significativamente mayor (Awasthi et al., 2014).

2.12 Características de la Lacasa POXA 1B

Las isoenzimas de lacasa producidas por *Pleurotus ostreatus*, un hongo basidiomiceto de podredumbre blanca, han sido ampliamente estudiadas (Giardina et al., 1999; Rivera-Hoyos et al., 2013). Se ha reportado que *P. ostreatus* secreta 8 isoformas de lacasa, de las cuales seis han sido aisladas y caracterizadas (POXA 1B, POXA 1W, POXA 2, POXA 3a, POXA 3b y POXC), (Morozova et al., 2007). POXA 1B es una enzima monomérica con una masa molecular de 57 kDa, un punto isoeléctrico (pI) de 6.9, posee un contenido de cobre de 3.7 mol/mol de proteína y es capaz de oxidar los sustratos ABTS, siringaldazina y 2,6 dimetoxifenol (DMP), (Giardina et al., 1999) con un potencial redox de 0.650 V vs., electrodo de hidrógeno normal (NHE), (Macellaro et al., 2014). En cuanto a la estabilidad a diferentes pHs Giardina et al., (1999) encontraron que la estabilidad era mayor a pH alcalino, mientras Ardila-Leal et al., (2019) encontraron que la enzima recombinante POXA 1B fue más estable a pH 4.0 ± 0.2 . Diferencias que pueden estar relacionadas a las características de exposición en cada una de las enzimas, ya que la estabilidad de POXA 1B por Giardina et al. (1999) fue obtenida después de un proceso de purificación (Giardina et al., 1999).

2.13 Producción y expresión heteróloga de lacasas fúngicas

Las lacasas más utilizadas en la industria provienen de los hongos, los cuales a menudo presentan rendimientos altos y producen varias isoformas de lacasa. No obstante, la eficiencia catalítica de cada isoforma es diferente (Antosová and Sychrová, 2016). Además, la obtención de lacasas empleando el hongo nativo, presenta dos limitaciones, la primera se relaciona con el efecto negativo sobre las propiedades del medio debido

a que el crecimiento morfológico afecta la reología del caldo de cultivo y la segunda que el micelio de los hongos puede envolverse alrededor del impulsor y esparcirse por la línea de alimentación o muestreo. Algunas especies de hongos (Basidiomicetos) producen cantidades altas de lacasa; sin embargo, la producción podría no satisfacer la demanda industrial debido a que presentan dificultades como largos períodos de cultivo (Bertrand et al., 2017), requieren mayor control de las condiciones de crecimiento y demandan alta disponibilidad de oxígeno (Admassu et al., 2015). Esta problemática se observa en los resultados obtenidos por Postemsky et al., (2017) cuando evaluaron la producción de lacasa de *Ganoderma lucidum* en 3.5 Kg de cascarilla de girasol lograron obtener sólo 16 Ug^{-1} de lacasa (Postemsky et al., 2017), mientras que Patel et al., (2009) evaluaron la producción de lacasa del hongo *Pleurotus ostreatus* en 5 g de paja de trigo con cobre, encontrando que alcanzaba $14,189 \text{ Ug}^{-1}$ de lacasa después de 8 días de incubación (Patel et al., 2009). Las dificultades en la producción y obtención de enzimas han propiciado que el 90 % de las enzimas industriales sean obtenidas con microorganismos manipulados genéticamente (expresión heteróloga), (Hölker et al., 2004).

Las lacasas han sido expresadas en hospederos como *Saccharomyces cerevisiae* (Miele et al., 2010), *Yarrowia lipolytica* (Kalyani et al., 2015), *Pichia pastoris* (Rivera-Hoyos et al., 2015; Campos et al., 2016), *Kluyveromyces lactis* (Faraco et al., 2008) e incluso hongos filamentosos como *Aspergillus niger* (Record et al., 2002), *Aspergillus sojae* (Hatamoto et al., 1999) y *Trichoderma reesei* (Rautio et al., 2007). Aun así, *P. pastoris* es el hospedero de expresión más exitoso usado en la producción de proteínas recombinantes, principalmente para productos biofarmacéuticos y enzimas de uso industrial (Córdoba et al., 2003; Looser et al., 2015) y uno de los más usados para la expresión de lacasas fúngicas (Tabla 2.4). Las razones que influyen en el uso de *P. pastoris* son: su alto nivel de expresión, la capacidad de usar diferentes fuentes de carbono (Poutou et al., 2005; Poutou-Piñales et al., 2010), la posibilidad de crecer en cultivos de alta densidad celular y la producción de grandes cantidades de proteínas recombinantes (Antosová and Sychrová, 2016), la respuesta positiva a diferentes estrategias de fermentación (Hong et al., 2002), la alta expresión extracelular de las

proteínas recombinantes (Yang *et al.*, 2015a), es un microorganismo GRAS (General Recognized as Safe), (Ahmad *et al.*, 2014) y la ausencia de la enzima α -1,3-mannosil transferasa (EC 2.4.1.132) que produce los enlaces de manosilo α -1,3 característicamente producido en *S. cerevisiae* y que no son deseables, especialmente para la producción de proteínas recombinantes de uso en la industria farmacéutica debido al patrón de hiperglicosilación que genera en la proteína clonada (Çelik and Çalık, 2012).

El uso industrial de lacasas requiere que se optimicen las condiciones de producción. Una de las estrategias para aumentar la producción de lacasas recombinantes es utilizando promotores fuertes en la construcción genética. En *P. pastoris*, el promotor más utilizado es el promotor alcohol oxidasa (*pAOX*), (Antosová and Sychrová, 2016; Burgard *et al.*, 2017), que es inducido por metanol; no obstante, el metanol es tóxico, puede afectar la estabilidad de las enzimas, incrementar la actividad proteolítica y generar dificultades en el plegamiento de la enzima (Zhang *et al.*, 2009; Antosová and Sychrová, 2016). El uso de promotores alternativos que no requieren el uso de metanol como el promotor constitutivo de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (E.C. 1.2.1.12), (*pGAP*) ha sido usado satisfactoriamente en la producción de lacasas de origen fúngico (Antosová and Sychrová, 2016).

La expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris* bajo el control del *pGAP* tiene ventajas, debido a que elimina el riesgo y disminuye el costo asociado al almacenamiento y el uso de grandes volúmenes de metanol, además, disminuye considerablemente la generación de calor y los requerimientos de oxígeno durante la producción (García-Ortega *et al.*, 2013) y por otro lado se pueden utilizar diferentes fuentes de carbono para la expresión como glucosa y glicerol entre otras (Zhang *et al.*, 2009).

Tabla 2.4 Algunas lacasas fúngicas con expresión heteróloga en *P. pastoris*.

Lacasa	Origen de la enzima	Referencias
rPOXA 1B	<i>Pleurotus ostreatus</i>	(Rivera-Hoyos et al., 2015; Ardila-Leal et al., 2019)
rGILCC1	<i>Ganoderma lucidum</i>	(Rivera-Hoyos et al., 2015; Morales-Álvarez et al., 2017a)
lcc3	<i>Tremetes trogii</i>	(Campos et al., 2016)
CILAC11	<i>Colletotrichum lagenarium</i>	(Wang et al., 2016a)
rLAC-EN3-1	<i>Ganoderma sp.</i>	(Zhuo et al., 2015)
Lac3/Lac4	<i>Coprinus comatus</i>	(Gu et al., 2014)
Lac1	<i>Cerrena sp. HYB07</i>	(Yang et al., 2015a)
Lac1	<i>Coprinus comatus</i>	(Bao et al., 2013)
lac48424-1	<i>Trametes sp. 48424</i>	(Fan et al., 2011)
rLAC5930	<i>Trametes sp. 5930</i>	(Yang et al., 2011)
Lac2	<i>Lenzites gibbosa</i>	(Zheng et al., 2014)
Lcc1A/Lcc1B	<i>Lentinula edodes</i>	(Wong et al., 2012)
lcc	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	(Lu et al., 2009)
lacD	<i>Fome lignosus</i>	(Hu et al., 2009)
rLacD	<i>Trametes sp.</i>	(Hong et al., 2007)

2.14 Aplicaciones biotecnológicas de las lacasas

La lacasa es considerada la enzima con mayor disponibilidad para diferentes aplicaciones comerciales (Kuddus et al., 2013). Las lacasas catalizan reacciones químicas sobre una amplia gama de sustratos y su capacidad para oxidar los sustratos está relacionada con la presencia de grupos fenólicos como se observan en el sustrato modelo (la lignina), (Munk et al., 2015). Los compuestos fenólicos son sustratos típicos para las lacasas porque sus potenciales redox (0.5 a 1.0 V vs. NHE) son lo suficientemente bajos como para permitir la extracción de electrones (Munk et al., 2015). El mecanismo catalítico de las lacasas sobre compuestos fenólicos e inorgánicos, es llevado a cabo por mecanismos de acoplamiento oxidativo (Sharma et al., 2018) o por la oxidación monoelectrónica de difenoles y aminas aromáticas, en este último caso

se elimina un electrón y un protón del grupo hidroxilo o amino formando un radical fenoxilo o amino, respectivamente (Patel et al., 2014).

El fenol es uno de los contaminantes más peligrosos para el medio ambiente. Debido a su uso en la industria petroquímicas, la coquización, los plásticos, las refinerías de papel y petróleo, así como las industrias de resinas fenólicas, entre otros, se ha investigado la lacasa como estrategia en la eliminación del fenol (Asadgol et al., 2014). Aunque la acción de la lacasa es comúnmente relacionada con compuestos fenólicos, la baja especificidad de las lacasas les permite catalizar compuestos no fenólicos como los colorantes. Por las razones anteriores las lacasas son útiles en la deslignificación de compuestos lignocelulósicos, biopulpeo, bioblanqueo, transformación de colorantes de la industria textil, remoción de colorantes, tratamiento de aguas residuales y degradación de diferentes compuestos recalcitrantes (Monteiro and De Carvalho, 1998; Aghaie-Khouzani et al., 2012; Forootanfar et al., 2016; Ferraroni et al., 2017; Zeng et al., 2017; Rivera-Hoyos et al., 2018). Algunas otras aplicaciones de las lacasas se observan en la Tabla 2.2.

A pesar del amplio uso de las lacasas, se ha demostrado que no siempre son efectivas en la eliminación de algunos compuestos; lo que ha impulsando el uso de agentes mediadores como estrategia de degradación (Routoula and Patwardhan, 2020). La ventaja de los mediadores se debe a que permiten que los sustratos de gran tamaño o con potencial redox muy alto puedan interactuar con el centro activo de la lacasa (Antosová and Sychrová, 2016). Así mismo, se sabe que la acción de las lacasas se incrementa con el uso de mediadores químicos como ABTS, 1-hidroxibenzotriazol (HBT), hidroxifalimida (HPI), 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO), acetosiringone, ácido violúrico (VA), sirringaldehído (SA) y vainillina (VA), (Solís-Oba et al., 2005; Ashe et al., 2016; Choi, 2021), (Tabla 2.2); siendo el ABTS es el más utilizado (Pogni et al., 2015). Cada mediador requiere condiciones óptimas diferentes para la reacción con un compuesto diana y puede oxidar el sustrato por algunos de los tres mecanismos reportados (transferencia de átomos de hidrógeno, transferencia de electrones y mecanismos iónicos), (Ashe et al., 2016).

Diferentes investigaciones han demostrado el efecto de la lacasa sobre diferentes compuestos contaminantes al usar mediadores (Hu et al., 2009; Campos et al., 2016). Ashe et al. (2016) evaluaron siete mediadores redox que seguían los tres mecanismos oxidativos: transferencia de átomos de hidrógeno (SA, HBT, VA, VAN y HPI), transferencia de electrones (ABTS) y mecanismos iónicos (TEMPO) con el objetivo de mejorar la oxidación de trazas de compuestos orgánicos usando la enzima cruda de *P. ostreatus*; en este trabajo se logró una alta degradación de compuestos fenólicos usando los mediadores ABTS y VA, mientras que para los compuestos no fenólicos los mediadores VA y HBT fueron más eficientes (Ashe et al., 2016). La efectividad de los mediadores probablemente depende de la reactividad química del radical formado después de la etapa de oxidación inicial (González Arzola et al., 2009). Sin embargo, en algunas investigaciones el uso de mediadores causa el efecto contrario al que normalmente se requiere. Leme Ike et al. (2019) evaluaron la degradación del antraceno usando la lacasa Lac1Lg, obtenida de *Leucoagaricus gongylophorus*, encontrando el ABTS disminuyó el 14 % de la degradación, efecto que fue atribuido a reacciones secundarias que reducían la eficacia del tratamiento (Leme Ike et al., 2019).

Tabla 2.6 Algunas aplicaciones de las lacasas.

Origen de la lacasa	Aplicación	Uso de mediador	Referencia
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Obtención de biocolorantes	-	(Wlizio <i>et al.</i> , 2020)
<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	Biodegradación de antraceno	ABTS	(Leme lke <i>et al.</i> , 2019)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Degradación de HAPs en biosólidos	-	(Taha <i>et al.</i> , 2018)
<i>Moniliophthora roreri</i>	Degradación de hormonas y antiinflamatorios.	-	(Bronikowski <i>et al.</i> , 2017)
<i>Trametes versicolor</i> (Sigma)	Biosensor para detectar el catecol	-	(Palanisamy <i>et al.</i> , 2017)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Degradación de trazas de contaminantes orgánicos	HBT - HPI - SA - TEMPO - VA - ABTS - VAN	(Ashe <i>et al.</i> , 2016)
<i>Lentinus edodes</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Ganoderma lucidum</i>	Biosíntesis de nanopartículas de oro	-	(Vetchinkina <i>et al.</i> , 2016)
<i>Cerrena unicolor</i>	Degradación de antibióticos	ABTS	(Yang <i>et al.</i> , 2017)
<i>Trametes versicolor</i> (Sigma)	Biocatalizador para células de biocombustible enzimático (EBC)	-	(Christwardana <i>et al.</i> , 2016)
<i>Lenzites betulinus</i>	Degradación de organofosforados (clorpirifos)	-	(Wang <i>et al.</i> , 2016b)
<i>Trametes versicolor</i>	Degradación del herbicida Isoproturon	HBT - acetosiringona	(Zeng <i>et al.</i> , 2017)
<i>Trametes versicolor</i>	Biosensor para cuantificación de pesticidas en frutas	-	(Paulino Ribeiro <i>et al.</i> , 2014)
<i>Trametes versicolor</i> (TvL)	Biosensores para compuestos fenólicos	-	(Casero <i>et al.</i> , 2013)
<i>Trametes versicolor</i> (comercial)	Transformaciones orgánicas	-	(Hajdok <i>et al.</i> , 2012)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Biosensores	-	(Franzoi <i>et al.</i> , 2010)

2.14.1 Degradación de colorantes sintéticos por lacasas

La remoción de colorantes sintéticos es una aplicación en donde las lacasas han demostrado su potencial (Campos et al., 2016) debido a que los colorantes son contaminantes orgánicos que generan impacto negativo al medio ambiente (Pype et al., 2019). Actualmente se producen más de 10.000 colorantes y pigmentos diferentes clasificados como antraquinonas, azo (Fernández et al., 2009; Zeng et al., 2012), índigos (Yang et al., 2014), trifenilmetanos (Qing Yang et al., 2009; Morales-Álvarez et al., 2016; Morales-Álvarez et al., 2017b) y neolanos (Zouari-Mechichi et al., 2006) que se utilizan en procesos de teñido e impresión en industrias de alimentos, papel, plástico, textil, cosméticos y tinciones biológicas en todo el mundo (Upadhyay et al., 2016).

Las ventajas del uso de las lacasas para la remoción de colorantes es que producen cantidades bajas de lodo, tienen una eficiencia catalítica alta, los tiempos de reacción son bajos, consumos bajos de energía y no son tóxicas (Senthivelan et al., 2016). Sin embargo, durante la aplicación de las lacasas existen múltiples factores que afectan el porcentaje de decoloración y que son importantes tener en cuenta. Aunque se conoce que el tipo de colorante influye en la decoloración, se ha demostrado que las isoenzimas de un mismo organismo generan porcentajes de decoloración diferente. Zhuo et al. (2019) evaluaron las tasas de decoloración de los colorantes Verde de Malaquita (MG), Azul Brillante Remazol R (RBBR), Azul de Bromofenol (BB) y Naranja de Metil (MO) usando las lacasas recombinantes LACC6, LACC9 y LACC10 de *Pleurotus ostreatus*, y encontraron que la eficiencia de degradación y la resistencia al tinte variaban considerablemente entre cada isoenzima; la lacasa LACC6 generó porcentajes más altos de remoción con 91.5, 84.9, 79.1 y 73.1 % de decoloración para MG, RBBR, BB y MO, respectivamente, mientras que con las lacasas LACC10 y LACC9 se alcanzaron porcentajes de decoloración entre 71.1 - 54.8 % y 7.1 - 67.9 %, respectivamente, demostrando que la efectividad en la decoloración depende de la isoforma utilizada (Zhuo et al., 2019). Así mismo, Gu et al. (2014) evaluaron la eficiencia en la decoloración de 13 colorantes (Azul Brillante Remazol R (RBBR), Azul Brillante Reactivo X-BR (BB X-BR), Azul Brillante Reactivo K-GR (BB K-GR), Azul Brillante Reactivo K-3R (BB K-3R), Naranja Reactivo 1 (RO), Rojo Reactivo X-3B (RR X-3B), Rojo Congo (CR), Azul Oscuro

Reactivo KR (DBR KR), Coomassie G-250 (C), Verde de Malaquita (MG), Azul de Bromofenol (BB), Violeta de Metil (VM) y Azul Victoria (VB)) usando las lacasas Lac3 y Lac4 de *Coprinus comatus*. En el estudio encontraron que la lacasa Lac3 tuvo mayor eficiencia de decoloración que Lac4 con excepción del colorante BB, sobre el cual lac4 obtuvo ~63 % de remoción y Lac3 ~57 %. La lacasa Lac3 removió entre el ~ 67 y 90 % de color frente a los colorantes RBBR, BB K-GR, DBR KR y entre el ~ 33 y 48 % frente a los colorantes BB X-BR, CR, C, VM y VB. Finalmente, los colorantes con menor degradación (~10 % de remoción) fueron RO y RR X-3B, demostrando que las diferencias entre las enzimas y entre las estructuras de los colorantes influyen sobre la decoloración (Gu et al., 2014).

Fan et al., (2011) evaluaron la decoloración de MO, MG, BB y Cristal Violeta (CV) utilizando el sobrenadante de *Trametes* sp. 48424 y la enzima recombinante rLAC48424-1 de *Trametes* sp. En el estudio encontraron que la decoloración de MG BB y CV fue de ~97, 90 y 68 % de remoción para ambas enzimas, pero la enzima recombinante rLAC48424-1 aumentó 14 % la decoloración del MO; aún así la decoloración de CV fue muy baja e indicaron que el uso de mediadores (ABTS) como estrategia podría aumentar la decoloración (Fan et al., 2011).

Colao et al., (2006), usando la lacasa recombinante lcc1 de *Trametes trogii* evaluaron la decoloración de los colorantes Rojo alizarina (AR), Carmoisine (CM), Rojo cochinilla (CCR), Amarillo Ocaso (SY), Azul patentado (PB) y Azul índigo (BI) usando la adición o no del mediador VA; encontrando que el uso del mediador aumento la decoloración de los colorantes AR, CM, CCR, SY, PB y BI en ~23, 87, 75, 67, 81 % (Colao et al., 2006). No obstante, los mediadores no siempre son tan eficientes y la diferencia de la decoloración con o sin mediador en algunas investigaciones podría determinar el uso. Gu et al., (2014) evaluaron la decoloración de MG en presencia y ausencia del mediador HBT con una decoloración de 89.7% y un aumento de decoloración de sólo el 6.6% cuando se aplicaba el mediador (Gu et al., 2014). Es importante señalar que el uso de mediadores implica un costo adicional para la industria y que no siempre es sostenible (Zucca et al.,

2011) a menos que el aumento de la decoloración sea considerable una vez evaluado el costo.

La concentración de los colorantes, el pH y la temperatura son algunos de los otros factores que afectan la degradación. [Hadibarata et al. \(2012\)](#) evaluaron la decoloración del Azul Brillante Remazol R (RBBR) usando la lacasa de *Polyporus* sp. S133, y encontraron que a concentración de colorante $\leq 300 \text{ mg L}^{-1}$ se decoloraba hasta 90 %, pero sólo se obtenía 75 % de remoción de color cuando la concentración oscilaba entre 400 y 500 mg L^{-1} . También encontraron que el pH óptimo fue de 5.0 ± 0.2 y que valores superiores o inferiores generaban una decoloración deficiente ([Hadibarata et al., 2012](#)). [Forootanfar et al., \(2016\)](#) usando la lacasa de *Paraconiothyrium variabile*, evaluaron la decoloración y el efecto del pH y la temperatura sobre la decoloración de los colorantes Naranja Ácido 67 (AO), Amarillo Disperso 79 (DY-79), Amarillo Básico 28 (BY), Rojo Básico 18 (BR), Amarillo Directo 107 (DY-107) y Negro Directo 166 (DB); obteniendo una decoloración de 65.3, 53.3, 46.7, 40.7, 34.0 y 26.2 %, respectivamente. Cuando se evaluó el pH y la temperatura se encontró que independientemente del colorante el pH óptimo fue 5.0 ± 0.2 y que valores de pH diferentes afectaban el porcentaje de decoloración. Cuando evaluaron la temperatura, encontraron que la óptima para los colorantes DY-79 (60 %), AO (71.3 %) y BY (58.4 %) fue 45 °C y para los colorantes BR (48 %), DY-107 (50 %) y DB fue 55 °C ([Forootanfar et al., 2016](#)). Pese a que la temperatura influye sobre el porcentaje de decoloración, se debe analizar qué tan viable es usar temperaturas elevadas, ya que a escala industrial el manejo de una temperatura constante diferente a la temperatura ambiente podría representar un costo adicional excesivo.

Además, de reconocer los factores que influyen en la decoloración, también es importante comprender las vías a través de las cuales se logra la transformación de los colorantes. Varias investigaciones han evaluado los mecanismos de degradación de colorantes pertenecientes a la clase azo, antraquinoides, trifenilmetano e índigo a través de Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS); análisis

que permite la identificación de productos intermedios y de los productos de transformación después del tratamiento (Legerská et al., 2016; Zhuo et al., 2019).

La degradación de los colorantes azo con lacasas inicia con la escisión asimétrica del enlace azo seguido de la escisión oxidativa, la desulfonación, la desaminación, la desmetilación o dihidroxilación, según la estructura del colorante (Legerská et al., 2016). Se ha reportado la decoloración de colorantes de la clase azo como Naranja Metil (MO) utilizando la lacasa de *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146 (Telke et al., 2010), Rojo Congo (CO), con la lacasa Tplac de *Trametes pubescens* (Si et al., 2013), Naranja ácido 7 (AO7) usando una lacasa (no especificada), (Mani et al., 2019). En las tres investigaciones se identificó que en los colorantes azo el primer paso en la decoloración es la escisión del enlace -N=N-, lo que resulta en la obtención de dos productos intermedios asimétricos (A y B), (Figura 2.4), (Telke et al., 2010; Si et al., 2013; Mani et al., 2019). El mecanismo que lleva a cabo la lacasa para la escisión de colorantes azo es a través de la formación de un centro de reacción deficiente en electrones (carbocación). El carbocación genera un intermedio altamente reactivo, que está sujeto al ataque nucleófilico (-OH, -SO o iones halógenos), lo que resulta en una escisión asimétrica del enlace azo (Telke et al., 2010).

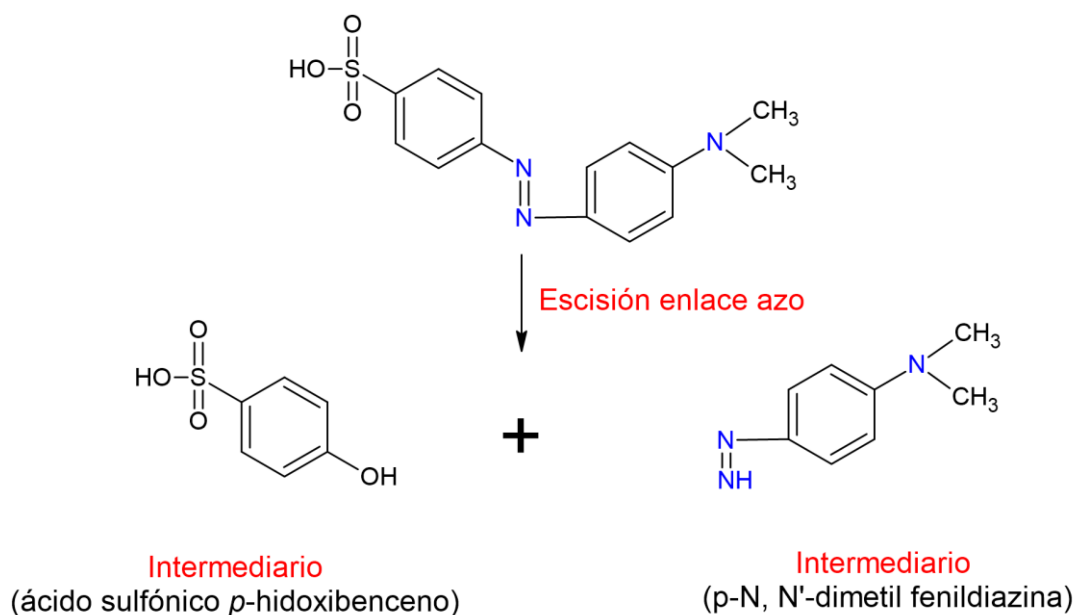


Figura 2.4 Ruta de degradación del colorante azo Naranja de metil por lacasas propuesta por [Telke et al. \(2010\)](#). Se observa la escisión del colorante y la obtención de los colorantes intermediarios inmediatos.

Dentro de los colorantes de la clase antraquinona, quizá uno de los más evaluados ha sido el RBBR. [Osma et al. \(2010\)](#) usaron la lacasa de *Trametes pubescens* para degradar RBBR y analizar los productos intermedios y los productos de transformación; y encontraron la formación de dos intermediarios después de 2 horas de tratamiento (m/z 304.30 y m/z 342.24), pese a que aún no se observaba decoloración, al final del tratamiento se observó la formación de dos subproductos y el rompimiento del cromóforo ([Figura 2.5](#)), ([Osma et al., 2010](#)). Resultados similares fueron obtenidos por [Hadibarata et al. \(2012\)](#), ellos evaluaron la transformación de RBBR con la lacasa inmovilizada de *Polyporus* sp., y encontraron que dos subproductos intermediarios (m/z 304.3 y m/z 342.2) debido al rompimiento del enlace -NH- que se une al cromóforo del colorante. Además, indicaron que el peso molecular de los metabolitos fue inferior pero que seguían siendo tóxicos ([Hadibarata et al., 2012](#)).

[Navada et al. \(2018\)](#) usando la lacasa de *Phomopsis* sp., encontraron que la degradación de RBBR se generó por abstracción de electrones, formando un intermedio radical inestable; luego se generaron procesos de oxidación enzimática, hidroxilación, desaminación, para finalmente escindir el anillo aromático, obteniéndose los intermedios m/z 229, 227, 336, 225 y 223 ([Navada et al., 2018](#)), pero a diferencia de [Hadibarata et al., \(2012\)](#) encontraron que los compuestos de masas bajas no eran tóxicos. [Zhuo et al. \(2019\)](#) después de un tratamiento con la lacasa de *Pleurotus ostreatus* HAUCC propusieron que el RBBR se divide en dos subproductos (m/z 324 y m/z 281) y se siguen los mismos procesos mencionados hasta la apertura del anillo del cromóforo ([Figura 2.5](#)), ([Zhuo et al., 2019](#)). [Pype et al. \(2019\)](#) realizaron un análisis para comparar métodos de evaluación de la decoloración del RBBR usando la lacasa comercial de *Trametes versicolor*. Estos autores, además de los resultados ya reportados, identificaron que durante de degradación el color cambiaba de azul a naranja, cambio atribuido al intermedio que quedaba con el cromóforo antraquinona

sin degradar (inmediatamente después de la escisión de RBBR), adicionalmente, demostraron una subestimación de la degradación real de hasta 10 %, ocasionada por los métodos de determinación de la degradación del color (Pype et al., 2019).

Colorantes de la clase trifenilmetano también han sido estudiados para identificar los metabolitos e intermediarios que se forman durante la degradación con lacasas. Yang et al. (2015) evaluó la degradación de MG mediada por LacA (*Cerrena* sp. HYB07). Durante la degradación se identificaron siete intermediarios resultantes de la transformación; entre estos, tres fueron más persistentes, pero disminuyeron después de una incubación prolongada (tetrademetil MG (m/z 273.14), (metil aminofenil) -fenilmetanona (m/z 212.11) y (aminofenil) -fenilmetanona (m/z 198.09)). A partir de los resultados obtenidos se propuso el modelo de degradación de MG de dos vías paralelas. La vía I inicia con la N-desmetilación sucesiva. No obstante, la N-desmetilación inicial no decolora el MG y para ello debe producirse una mayor degradación o polimerización que destruya el cromóforo. En la vía II el MG se hidroxila a su forma carbinol, la cual se degrada rápidamente entre el carbono central y el anillo de fenilo N,N-dimetilamino. Sin embargo, esta vía sólo ha sido reportada en presencia de un mediador (Yang et al., 2015b). Zhuo et al. (2019) usando la lacasa de *Pleurotus ostreatus* HAUCC para degradar MG observó que la degradación alcanzaba el 91.7 %. Los análisis de las vías de transformación demostraron que se siguió las dos rutas de degradación. No obstante, para la vía II de degradación proponen que los mediadores naturales presentes (moléculas pequeñas no especificadas) en el fluido extracelular pudieron ser facilitadores de la degradación del color (Zhuo et al., 2019).

2.15 Conclusiones

El uso de colorantes ha marcado una historia de progreso, evolución y desarrollo cognitivo para la humanidad y aunque el color en tiempos prehistóricos había sido obtenido de fuentes naturales (carbón, ocre, plantas o insectos) donde los niveles de contaminación por color eran muy bajos, la obtención de los colorantes sintéticos cambió la forma de producir y utilizar los colorantes, generando con el desarrollo industrial el aumento de los niveles de contaminación ambiental.

Los colorantes sintéticos son compuestos poco biodegradables que generan un efecto adverso en el medio ambiente, generando alteraciones mutagénicas, metabólicas, la inducción de efectos cancerígenos y hasta la bioacumulación, entre otros; afectando especialmente los organismos que habitan en los cuerpos de aguas y al ser humano. Por lo tanto, el tratamiento de aguas residuales se ha implementado como mecanismo para solucionar el daño causado por el hombre, con el propósito de disminuir la carga contaminante y la estrategia más conveniente depende de las ventajas y desventajas de cada tipo de tratamiento y del volumen del efluente a tratar. En este orden de ideas, las enzimas permiten procesos más amigables con el medio ambiente y más ecológicos, por tanto con menor impacto al medio ambiente.

Entre las diferentes enzimas para este tipo de tratamientos, las lacasas tienen la capacidad de degradar diferentes colorantes sintéticos, lo que requiere de la evaluación y/o control de factores que intervienen durante la reacción enzimática como tipo de lacasa y su potencial redox, el uso de mediadores, la concentración del colorante, las características estructurales de los colorantes, el pH y la temperatura de reacción, entre otros.

2.16 Referencias

- Abel, A., (2012) The history of dyes and pigments: from natural dyes to high performance pigments. DCC (Europe) Ltd, United Kingdom.
- Admassu, H., W. Zhao, R. Yang, M.A.A. Gasmalla and W. Zhang, (2015). Recent Advances on Efficient Methods for α -Amylase Production by Solid State Fermentation (SSF). **International Journal of Advanced Research**, 3 (9): 1485-1493.
- Adrio, J.L. and A.L. Demain, (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, 4: 117-1139. <http://dx.doi.org/10.3390/biom4010117>
- Aghaie-Khouzani, M., H. Forootanfar, M. Moshfegh, M.R. Khoshayand and M.A. Faramarzi, (2012). Decolorization of some synthetic dyes using optimized culture broth of laccase producing ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. **Biochemical Engineering Journal**, 60: 9-15.
- Ahmad, M., M. Hirz, H. Pichler and H. Schwab, (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98: 5301-5317. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>
- Alexandre, G. and I.B. Zhulin, (2000). Laccases are widespread in bacteria. **TRENDS in Biotechnology**, 18 (2): 41-42.
- Ali, H., (2010). Biodegradation of Synthetic Dyes—A Review. **Water Air Soil Pollution**, 213: 251-273. <http://doi.org/10.1007/s11270-010-0382-4>
- Almeida, E.J.R. and C.R. Corso, (2014). Comparative study of toxicity of azo dye Procion Red MX-5B following biosorption and biodegradation treatments with the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. **Chemosphere**, 112: 317-322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.060>
- Alyarnezhad, S., T. Marino, J.B. Parsa, F. Galiano, C. Ursino, *et al.*, (2020). Polyvinylidene fluoride-graphene oxide membranes for dye removal under visible light irradiation. **Polymers**, 12: 1509. <http://doi.org/10.3390/polym12071509>
- Andberg, M., N. Hakulinen, S. Auer, M. Saloheimo, A. Koivula, *et al.*, (2009). Essential role of the C-terminus in *Melanocarpus albomyces* laccase for enzyme production, catalytic properties and structure. **FEBS Journal**, 276: 6285–6300.
- Antosová, Z. and H. Sychrová, (2016). Yeast Hosts for the production of recombinant laccases: A review. **Molecular Biotechnology**, 58: 93–116. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-015-9910-1>
- Ardila-Leal, L.D., D.A. Albarracín-Pardo, C.M. Rivera-Hoyos, E.D. Morales, R.A. Poutou-Piñales, *et al.*, (2019). Media improvement for 10 L bioreactor production of rPOXA 1B laccase by *P. pastoris*. **3Biotech**, 9 (12): Article 447. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-019-1979-y>
- Ardila-Leal, L.D., R.A. Poutou-Piñales, E.D. Morales-Álvarez, C.M. Rivera-Hoyos, A.M. Pedroza-Rodríguez, *et al.*, (2021). Methanol addition after glucose depletion improves rPOXA 1B production under the *pGap* in *P. pastoris* X33. Breaking the habit. **SN Applied Science**, 3 (1): 103. <http://doi.org/10.1007/s42452-020-04093-z>

- Asadgol, Z., H. Forootanfar, S. Rezaei, A.H. Mahvi and M.A. Faramarzi, (2014). Removal of phenol and bisphenol-A catalyzed by laccase in aqueous solution. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, 12: 93.
- Asaithambi, P., B. Sajjadi, A.R.A. Aziz and W.M.A.B.W. Daud, (2017). Ozone (O₃) and sono (US) based advanced oxidation processes for the removal of color, COD and determination of electrical energy from landfill leachate. **Separation and Purification Technology**, 172: 442-449.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2016.08.041>
- Asano, T., M. Taoka, Y. Yamauchi, R.C. Everroad, Y. Seto, *et al.*, (2014). Re-examination of a α -chymotrypsin-solubilized laccase in the pupal cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*: Insights into the regulation system for laccase activation during the ecdysis process. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 55: 61-69.
- Ashe, B., L.N. Nguyen, F.I. Hai, D.-J. Lee, J.P. van de Merwe, *et al.*, (2016). Impacts of redox-mediator type on trace organic contaminants degradation by laccase: Degradation efficiency, laccase stability and effluent toxicity. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 113: 169-176.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.027>
- Awasthi, M., N. Jaiswal, S. Singh, V.P. Pandey and U.N. Dwivedi, (2014). Molecular docking and dynamics simulation analyses unraveling the differential enzymatic catalysis by plant and fungal laccases with respect to lignin biosynthesis and degradation. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 9: 41-47.
<http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2014.975282>
- Bao, S., Z. Teng and S. Ding, (2013). Heterologous expression and characterization of a novel laccase isoenzyme with dyes decolorization potential from *Coprinus comatus*. **Molecular Biology Reports**, 40: 1927-1936.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11033-012-2249-9>
- Barnett, J.R., S. Miller and E. Pearce, (2006). Colour and art: A brief history of pigments. **Optics and Laser Technology**, 38: 445-453.
<http://doi.org/10.1016/j.optlastec.2005.06.005>
- Becker, D., (2016) Color Trends and Selection for Product Design. Every Color Sells A Story. Elsevier Inc.
- Belpaire, C., T. Reyns, C. Geeraerts and J. Van Loco, (2015). Toxic textile dyes accumulate in wild European eel *Anguilla anguilla*. **Chemosphere**, 138: 784-791.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.007>
- Benincá, C., P. Peralta-Zamora, C.R. Granhen Tavares and L. Igarashi-Mafra, (2013). Degradation of an Azo Dye (Ponceau 4R) and Treatment of Wastewater from a Food Industry by Ozonation. **Ozone: Science & Engineering**, 35: 295-301.
<http://dx.doi.org/10.1080/01919512.2013.794691>
- Berke, H., (2002). Chemistry in ancient times: The development of blue and purple pigments. **Angewandte Chemie International Edition**, 41 (14): 2483-2487.
[http://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2483::AID-ANIE2483>3.0.CO;2-U](http://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2483::AID-ANIE2483>3.0.CO;2-U)
- Berke, H. and H.G. Wiedemann, (2000). The Chemistry and Fabrication of the Anthropogenic Pigments Chinese Blue and Purple in Ancient China. **East Asian Science, Technology, and Medicine**, 17: 94-120.

- Berkessa, Y.W., B. Yan, T. Li, V. Jegatheesan and Y. Zhang, (2020). Treatment of anthraquinone dye textile wastewater using anaerobic dynamic membrane bioreactor: Performance and microbial dynamics. **Chemosphere**, 238: 124539. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124539>
- Berradi, M., R. Hsissou, M. Khudhair, M. Assouag, O. Cherkaoui, *et al.*, (2019). Textile finishing dyes and their impact on aquatic environs. **Heliyon**, 5: e02711. <http://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02711>
- Berthet, S., J. Thevenin, D. Baratiny, N. Demont-Caulet, I. Debeaujon, *et al.*, (2012). Chapter 5 - Role of Plant Laccases in Lignin Polymerization. **Advances in Botanical Research**, 61: 145-172. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-416023-1.00005-7>
- Bertrand, B., F. Martinez-Morales and M.I.R. Trejo-Hernandez, (2017). Upgrading laccase production and biochemical properties: Strategies and challenges. **Biotechnology Progress**, 33 (4): 1015-1034. <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.2482>
- Bertrand, B., M. Trejo-Hernández, D. Morales-Guzmán, L. Caspeta, R. Suárez Rodríguez, *et al.*, (2016). Functional expression, production, and biochemical characterization of a laccase using yeast surface display technology. **Fungal Biology**, 120 (12): 1609-1622. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.08.009>
- Bhatia, D., N.R. Sharma, J. Singh and R.S. Kanwar, (2017). Biological methods for textile dye removal from wastewater: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 47 (19): 1836-1876. <http://doi.org/10.1080/10643389.2017.1393263>
- Blessy, M., R. Patel, D., P.N. Prajapati and Y.K. Agrawal, (2014). Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 4 (3): 159-165. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2013.09.003>
- Braun, H., (1983). Particle Size and Solubility of Disperse Dyes. **Coloration Technology**, 13 (1): 62-72. <http://doi.org/10.1111/j.1478-4408.1983.tb03728.x>
- Brissos, V., N. Gonçalves, E.P. Melo and L.O. Martins, (2014). Improving Kinetic or Thermodynamic Stability of an Azoreductase by Directed Evolution. **Plos One**, 9 (1): e87209. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0087209>
- Britos, C.N. and J.A. Trelles, (2016). Development of strong enzymatic biocatalysts for dye decolorization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 7: 228-233. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.06.009>
- Bronikowski, A., P.L. Hagedoorn, K. Koschorreck and V.B. Urlacher, (2017). Expression of a new laccase from *Moniliophthora roreri* at high levels in *Pichia pastoris* and its potential application in micropollutant degradation. **AMB Express**, 7: 73.
- Burgard, J., M. Valli, A.B. Graf, B. Gasser and D. Mattanovich, (2017). Biomarkers allow detection of nutrient limitations and respective supplementation for elimination in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. **Microbial Cell Factories**, 16: 117. <http://doi.org/10.1186/s12934-017-0730-9>
- Camarero, S., O. García, T. Vidal, J. Colom, J.C. del Río, *et al.*, (2004). Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. **Enzyme**

- and Microbial Technology**, 35: 113-120.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.10.019>
- Campos, P.A., L.N. Levin and S.A. Wirth, (2016). Heterologous production, characterization and dye decolorization ability of a novel thermostable laccase isoenzyme from *Trametes trogii* BAFC. **Process Biochemistry**, 51: 895-903.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.03.015>
- Cannatelli, M.D. and A.J. Ragauskas, (2017). Two decades of laccases: Advancing sustainability in the chemical industry. **The Chemical Record**, 17: 122-140.
<http://dx.doi.org/10.1002/tcr.201600033>
- Casero, E., M.D. Petit-Domínguez, L. Vázquez, I. Ramírez-Asperilla, A.M. Parra-Alfambra, *et al.*, (2013). Laccase biosensors based on different enzyme immobilization strategies for phenolic compounds determination. **Talanta**, 115: 401-408.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.05.045>
- Çelik, E. and P. Çalık, (2012). Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnology Advances**, 30: 1108-1118.
- Chatzisyneon, E., N.P. Xekoukoulotakis, A. Coz, N. Kalogerakis and D. Mantzavinos, (2006). Electrochemical treatment of textile dyes and dyehouse effluents. **Journal of Hazardous Materials**, B137: 998-1007.
<http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.03.032>
- Chaudhari, A.U., D. Paul, D. Dhotre and K.M. Kodam, (2017). Effective biotransformation and detoxification of anthraquinone dye reactive blue 4 by using aerobic bacterial granules. **Water Research**, 122: 603-613.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.005>
- Chekalin, E., A. Rubanovich, T.V. Tatarinova, A. Kasianov, N. Bender, *et al.*, (2018). Changes in biological pathways during 6,000 years of civilization in Europe. **Molecular Biology and Evolution**, 36 (1): 127-140.
<http://doi.org/10.1093/molbev/msy201>
- Chia, M.A. and R.I. Musa, (2014). Effect of indigo dye effluent on the growth, biomass production and phenotypic plasticity of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorococcales). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 86 (1): 419-428.
<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201420130225>
- Chiriu, D., P.C. Ricci, C.M. Carbonaro, D. Nadali, A. Polcaro, *et al.*, (2017). Raman identification of cuneiform tablet pigments: emphasis and colour technology in ancient Mesopotamian mid-third millennium. **Heliyon**, 3: e00272.
<http://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00272>
- Choi, K.-Y., (2021). Discoloration of indigo dyes by eco-friendly biocatalysts. **Dyes and Pigments**, 184: 198749. <http://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108749>
- Christensen, N.J. and K.P. Kepp, (2013). Stability Mechanisms of a Thermophilic Laccase Probed by Molecular Dynamics. **Plos One**, 8 (4): e61985.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061985>
- Christwardana, M., K.J. Kim and Y. Kwon, (2016). Fabrication of Mediatorless/Membraneless Glucose/Oxygen Based Biofuel Cell using Biocatalysts Including Glucose Oxidase and Laccase Enzymes. **Scientific Report**, 6: 30128. <http://doi.org/10.1038/srep30128>

- Clarke, E.A. and R. Anliker, (1980) Organic Dyes and Pigments. Anthropogenic Compounds. The Handbook of Environmental Chemistry. Springer, Berlin, Germany, p. 35.
- Colao, M.C., S. Lupino, A.M. Garzillo, V. Buonocore and M. Ruzzi, (2006). Heterologous expression of *lcc1* gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. **Microbial Cell Factories**, 5: 1-11. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-5-31>
- Collivignarelli, M.C., A. Abbà, M.C. Miino and S. Damiani, (2019). Treatments for color removal from wastewater: State of the art. **Journal of Environmental Management**, 236: 727-745. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.094>
- Córdoba, H., N. Algecira, R.A. Poutou and L.A. Barrera, (2003). *Pichia pastoris* una Alternativa para la Producción de Glicoproteínas Humanas de Uso Terapéutico. Estrategias de Fermentación. **Revista Colombiana de Biotecnología**, 5 (2): 73-84.
- Croce, R., F. Cinà, A. Lombardo, G. Crispeyn, C.I. Cappelli, *et al.*, (2017). Aquatic toxicity of several textile dye formulations: Acute and chronic assays with *Daphnia magna* and *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 144: 79-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.046>
- de Balbín Behrmann, R. and J.J. Alcolea González, (2009). Les colorants de l'art paléolithique dans les grottes et en plein air. **L'anthropologie**, 113: 559-601. <http://doi.org/10.1016/j.anthro.2009.09.012>
- Dedeyan, B., A. Klonowska, S. Tagger, T. Tron, G. Iacazio, *et al.*, (2000). Biochemical and Molecular Characterization of a Laccase from *Marasmius quercophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 63 (3): 925-929.
- Dickerson, R. and P. Fortner, (2017). The use of geological materials in ancient and contemporary art. **Geology Today**, 33 (5): 185-189.
- Drumond Chequer, F.M., G.A. Rodrigues de Oliveira, E.R. Anastácio Ferraz, J. Carvalho Cardoso, M.V. Boldrin Zanoni, *et al.*, (2013) Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact. Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing. Intech, pp. 151-176.
- Duarte, C.M., (2014). Red ochre and shells: clues to human evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, 29 (10): 560-565.
- Dwivedi, U.N., P. Singh, V.P. Pandey and A. Kumar, (2011). Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 68: 117-128. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.002>
- Esteves Torres, F.A., B.R. Zaccarim, L.C. de Lencastre Novaes, A.F. Jozala, C. Alves dos Santos, *et al.*, (2016). Natural colorants from filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 100: 2511-2521. <http://doi.org/10.1007/s00253-015-7274-x>
- Fabryanty, R., C. Valencia, F.E. Soetaredjo, J.N. Putro, S.P. Santoso, *et al.*, (2017). Removal of crystal violet dye by adsorption using bentonite – alginate composite. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 5: 5677-5687. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2017.10.057>
- Fan, F., R. Zhuo, S. Sun, X. Wan, M. Jiang, *et al.*, (2011). Cloning and functional analysis of a new laccase gene from *Trametes* sp. 48424 which had the high yield of laccase

- and strong ability for decolorizing different dyes. **Bioresource Technology**, 102: 3126-3137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.079>
- Faraco, V., C. Ercole, G. Festa, P. Giardina, A. Piscitelli, *et al.*, (2008). Heterologous expression of heterodimeric laccase from *Pleurotus ostreatus* in *Kluyveromyces lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 77: 1329–1335.
- Fernández, J.A., L.M. Henao, A.M. Pedroza-Rodríguez and B. Quevedo-Hidalgo, (2009). Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5. **Revista Colombiana de Biotecnología**, XI (1): 59-72.
- Fernández-Sabido, S., Y. Palomo-Carrillo, R. Burgos-Villanueva and R. de Coss, (2012) Comparative study of two blue pigments from the Maya region of Yucatan.
- Ferraroni, M., A.H. Westphal, M. Borsari, J.A. Tamayo-Ramos, F. Briganti, *et al.*, (2017). Structure and function of *Aspergillus niger* laccase McoG. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2: 1-6.
- Ferraz, E.R.A., M.D. Grando and D.P. Oliveira, (2011). The azo dye disperse orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not cause ecotoxic effects in *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*. **Journal of Hazardous Materials**, 192: 628-633. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.05.063>
- Forootanfar, H., S. Rezaei, H. Zeinvand-Lorestani, H. Tahmasbi, M. Mogharabi, *et al.*, (2016). Studies on the laccase-mediated decolorization, kinetic, and microtoxicity of some synthetic azo dyes. **Journal of Environmental Health Science**, 14: 7. <http://dx.doi.org/10.1186/s40201-016-0248-9>
- Franzoi, A.C., I. Cruz Vieiraa and J. Dupont, (2010). Biosensors of Laccase Based on Hydrophobic Ionic Liquids Derived from Imidazolium Cation. **Journal of Brazilian Chemical Society**, 21 (8): 1451-1458.
- Garcia-Ortega, X., P. Ferrer, J.L. Montesinos and F. Valero, (2013). Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris* using the constitutive *GAP* promoter. **Biochemical Engineering Journal**, 79: 172-181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.07.013>
- Giardina, P., V. Faraco, C. Pezzella, A. Piscitelli, S. Vanhulle, *et al.*, (2010). Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 67: 369-385. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-009-0169-1>
- Giardina, P., G. Palmieri, A. Scaloni, B. Fontanella, V. Faraco, *et al.*, (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical Journal**, 341: 655-663.
- Gičević, A., L. Hindija and A. Karačić, (2020) Toxicity of azo dyes in pharmaceutical industry. Springer, Cham.
- Gilbert, K.G., (2017) Dyes.
- Golka, K., S. Kopps and Z.W. Myslak, (2004). Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. **Toxicology Letters**: 203-210. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.11.016>
- González Arzola, K., M.C. Arévalo and M.A. Falcón, (2009). Catalytic efficiency of natural and synthetic compounds used as laccase-mediators in oxidising veratryl alcohol and a kraft lignin, estimated by electrochemical analysis. **Electrochimica Acta**, 54: 2621-2629. <http://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.10.059>

- Gu, C., F. Zheng, L. Long, J. Wang and S. Ding, (2014). Engineering the Expression and Characterization of Two Novel Laccase Isoenzymes from *Coprinus comatus* in *Pichia pastoris* by Fusing an Additional Ten Amino Acids Tag at N-Terminus. **Plos One**, 9 (4): e93912. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093912>
- Gulzar, T., T. Huma, F. Jalal, S. Iqbal, S. Abrar, *et al.*, (2017). Bioremediation of Synthetic and Industrial Effluents by *Aspergillus niger* Isolated from Contaminated Soil Following a Sequential Strategy. **Molecules**, 22: 2244. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22122244>
- Hadibarata, T., A.R. Mohd Yusoff and R.A. Kristanti, (2012). Decolorization and Metabolism of Anthraquinone-Type Dye by Laccase of White-Rot Fungi *Polyporus* sp. S133. **Water Air Soil Pollution**, 223: 933-941. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-011-0914-6>
- Hajdok, S., J. Conrad and U. Beifuss, (2012). Laccase-Catalyzed Domino Reactions between Hydroquinones and Cyclic 1,3-Dicarbonyls for the Regioselective Synthesis of Substituted p-Benzoquinones. **The Journal of Organic Chemistry**, 77: 445-459. <http://doi.org/10.1021/jo202082v>
- Hakulinen, N. and J. Rouvinen, (2015). Three-dimensional structures of laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 72: 857-868. <http://doi.org/10.1007/s00018-014-1827-5>
- Hatamoto, O., H. Sekine, E. Nakano and K. Abe, (1999). Cloning and Expression of a cDNA Encoding the Laccase from *Schizophyllum commune*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 63 (1): 58-64.
- Henshilwood, C.S., F. d'Errico, K.L. van Niekerk, L. Dayet, A. Queffelec, *et al.*, (2018). An abstract drawing from the 73,000-year-old levels at Blombos Cave, South Africa. **Nature**, 562: 115-127. <http://doi.org/10.1038/s41586-018-0514-3>
- Hildén, K., T.K. Hakala and T. Lundell, (2009). Thermotolerant and thermostable laccases. **Biotechnology Letters**, 31: 1117-1128.
- Hodgskiss, T. and L. Wadley, (2017). How people used ochre at Rose Cottage Cave, South Africa: Sixty thousand years of evidence from the Middle Stone Age. **Plos One**, 12 (4): e0176317. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0176317>
- Holkar, C.R., A.J. Jadhav, D.V. Pinjari, N.M. Mahamuni and A.B. Pandit, (2016). A critical review on textile wastewater treatments: Possible approaches. **Journal of Environmental Management**, 182: 351-366. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.090>
- Hölker, U., M. Höfer and J. Lenz, (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fun. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 64: 175-186. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-003-1504-3>
- Hong, F., N.Q. Meinander and L.J. Jönsson, (2002). Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, 79 (4): 438-449.
- Hong, Y.-z., H.-m. Zhou, X.-m. Tu, J.-f. Li and Y.-z. Xiao, (2007). Cloning of a laccase gene from a novel Basidiomycete *Trametes* sp. 420 and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. **Current Microbiology**, 54: 260-265.
- Hovers, E., S. Ilani, O. Bar-Yosef and B. Vandermeersch, (2003). An early case of color symbolism: Ochre use by modern humans in Qafzeh Cave. **Current Anthropology**, 44 (4): 491-522.

- Hu, M.R., Y.P. Chao, G.Q. Zhang, Z.Q. Xue and S. Qian, (2009). Laccase-mediator system in the decolorization of different types of recalcitrant dyes. **Journal of Industrial Biotechnology**, 36: 45-51. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-008-0471-1>
- Husain, Q., (2006). Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in the Decolorization and Detoxification of Textile and Other Synthetic Dyes from Polluted Water: A Review. **Critical Reviews in Biotechnology**, 26 (4): 201-221. <http://dx.doi.org/10.1080/07388550600969936>
- Hussain, S., N. Khan, S. Gul, S. Khan and H. Khan, (2019) Contamination of Water Resources by Food Dyes and Its Removal Technologies. Contamination of Water Resources by Food Dyes and Its Removal Technologies. IntechOpen, pp. 1-14.
- Ihssen, J., R. Reiss, R. Luchsinger, L. Thöny-Meyer and M. Richter, (2015). Biochemical properties and yields of diverse bacterial laccase-like multicopper oxidases expressed in *Escherichia coli*. **Scientific Report**, 5: Art. ID 10465. <http://dx.doi.org/10.1038/srep10465>
- International Agency for Research on Cancer, I., (2010) Some Aromatic Amines, Organic Dyes, and Related Exposures. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France.
- Jain, N.K. and I. Roy, (2011). Accelerated Stability Studies for Moisture-Induced Aggregation of Tetanus Toxoid. **Pharmaceutical Research**, 28: 626-639. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-010-0316-2>
- Jensen, L.B., (1963). Royal Purple of Tyre. **Journal of Near Eastern Studies**, 22 (2): 104-118.
- Johnston, W.T., (2008). The discovery of aniline and the origin of the term “aniline dye”. **Biotechnic & Histochemistry**, 83 (2): 83-87. <http://doi.org/10.1080/10520290802136793>
- Jones, S.M. and E.I. Solomon, (2015). Electron Transfer and Reaction Mechanism of Laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 72 (5): 869-883. <http://doi.org/10.1007/s00018-014-1826-6>
- Kalyani, D., M.K. Tiwari, J. Li, S.C. Kim, V.C. Kalia, *et al.*, (2015). A Highly Efficient Recombinant Laccase from the Yeast *Yarrowia lipolytica* and Its Application in the Hydrolysis of Biomass. **Plos One**, 10 (3): e0120156.
- Kant, R., (2012). Textile dyeing industry an environmental hazard. **Natural Science**, 4 (1): 22-26. <http://dx.doi.org/10.4236/ns.2012.41004>
- Karlström, M., R. Chiaraluce, L. Giangiacomo, I.H. Steen, N.-K. Birkeland, *et al.*, (2010). Thermodynamic and kinetic stability of a large multi-domain enzyme from the hyperthermophile *Aeropyrum pernix*. **Extremophiles**, 14: 213-223. <http://dx.doi.org/10.1007/s00792-009-0300-0>
- Katheresan, V., J. Kansedo and S.Y. Lau, (2018). Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 6: 4676-4697. <http://doi.org/10.1016/j.jece.2018.06.060>
- Khan, R., V. Patel and Z. Khan, (2020) Bioremediation of dyes from textile and dye manufacturing industry effluent. Elsevier.
- Khatab, T.A., M.S. Abdelrahman and M. Rehan, (2020). Textile dyeing industry: environmental impacts and remediation. **Environmental Science and**

- Pollution Research**, 27: 3803-3818. <http://doi.org/10.1007/s11356-019-07137-z>
- Kirkwood, C.D. and E.A. Palombo, (1997). Genetic Characterization of the Rotavirus Nonstructural Protein, NSP4. **Virology**, 236: 258-265.
- Komori, H. and Y. Higuchi, (2010). Structure and molecular evolution of multicopper blue proteins. **BioMol Concepts**, 1: 31-40. <http://dx.doi.org/10.1515/BMC.2010.004>
- Kuddus, M., B. Joseph and P.W. Ramteke, (2013). Production of laccase from newly isolated *Pseudomonas putida* and its application in bioremediation of synthetic dyes and industrial effluents. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2: 333-338. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbab.2013.06.002>
- Kuenemann, M.A., M. Szymczyk, Y. Chen, N. Sultana, D. Hinks, *et al.*, (2017). Weaver's historic accessible collection of synthetic dyes: a cheminformatics analysis. **Chemical Science**, 8: 4334. <http://doi.org/10.1039/c7sc00567a>
- Kunamneni, A., S. Camarero, C. García-Burgos, F.J. Plou, A. Ballesteros, *et al.*, (2008a). Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. **Microbial Cell Factories**, 7: 32. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-7-32>
- Kunamneni, A., F.J. Plou, A. Ballesteros and M. Alcalde, (2008b). Laccases and their applications: a patent review. **Recent Patents on Biotechnology**, 2: 10-24.
- Legerská, B., D. Chmelová and M. Ondrejovic, (2016). Degradation of synthetic dyes by laccases -A mini review. **Nova Biotechnologica et Chimica**, 15 (1): 90-106. <http://doi.org/10.1515/nbec-2016-0010>
- Lellis, B., C.Z. Fávoro-Polonio, J.A. Pamphile and J.C. Polonio, (2019). Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. **Biotechnology Research and Innovation**, 3: 275-290. <http://doi.org/10.1016/j.biori.2019.09.001>
- Leme Ike, P.T., W. Garcia Birolli, D.M. dos Santos, A.L. Meleiro Porto and D.H. Ferreira Souza, (2019). Biodegradation of anthracene and different PAHs by a yellow laccase from *Leucoagaricus gongylophorus*. **Environmental Science and Pollution Research**, 26: 8675-8684. <http://doi.org/10.1007/s11356-019-04197-z>
- Lin Cereghino, J. and J.M. Cregg, (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, 24: 45-66. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>
- Liu, L., J. Zhang, Y. Tan, Y. Jiang, M. Hua, *et al.*, (2014). Rapid decolorization of anthraquinone and triphenylmethane dye using chloroperoxidase: Catalytic mechanism, analysis of products and degradation route. **Chemical Engineering Journal** 244: 9-18.
- Liu, M., Q. Chen, K. Lu, W. Huang, Z. Lü, *et al.*, (2017). High efficient removal of dyes from aqueous solution through nanofiltration using diethanolamine-modified polyamide thin-film composite membrane. **Separation and Purification Technology**, 173: 135-143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2016.09.023>
- Loera Corral, O., M.C. Pérez Pérez, I. Barbosa Rodríguez, J. Ricardo and F. Villaseñor Ortega, (2006) Laccases. In: Guevara-González, R.G. and Torres-Pacheco, I. (Eds.), *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. Research Signpost, Kerala, India, pp. 323-340.

- Looser, V., B. Bruhlmann, F. Bumbak, C. Stenger, M. Costa, *et al.*, (2015). Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. **Biotechnology Advances**, 33 (6): 1177-1193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.008>
- Lu, L., M. Zhao, S.-C. Liang, L.-Y. Zhao, D.-B. Li, *et al.*, (2009). Production and synthetic dyes decolourization capacity of a recombinant laccase from *Pichia pastoris*. **Journal of Applied Microbiology**, 107: 1149-1156. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04291.x>
- Macellaro, G., M.C. Baratto, A. Piscitelli, C. Pezzella, F.F. de Biani, *et al.*, (2014). Effective mutations in a high redox potential laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98 (11): 4949-4961. <http://doi.org/10.1007/s00253-013-5491-8>
- Magliery, T.J., (2015). Protein stability: computation, sequence statistics, and new experimental methods. **Current Opinion in Structural Biology**, 33: 161-168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2015.09.002>
- Majeau, J.-A., S.K. Brar and R.D. Tyagi, (2010). Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**, 101 (7): 2331-2350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.087>
- Mani, P., V.T. Fidal, K. Bowman, M. Breheny, T.S. Chandra, *et al.*, (2019). Degradation of azo dye (acid orange 7) in a microbial fuel cell: Comparison between anodic microbial-mediated reduction and cathodic laccase-mediated oxidation. **Frontiers in Energy Research**, 7: 101. <http://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00101>
- Marean, C.W., M. Bar-Matthews, J. Bernatchez, E. Fisher, P. Goldberg, *et al.*, (2007). Early human use of marine resources and pigment in South Africa during the Middle Pleistocene. **Nature**, 449: 905-909. <http://doi.org/10.1038/nature06204>
- Mate, D., C. García-Burgos, E. García-Ruiz, A.O. Ballesteros, S. Camarero, *et al.*, (2010). Laboratory evolution of high-redox potential laccases. **Chemistry & Biology**, 17: 1030-1041.
- Miele, A., P. Giardina, E. Notomista, A. Piscitelli, G. Sannia, *et al.*, (2010). A Semi-Rational Approach to Engineering Laccase Enzymes. **Molecular Biotechnology**, 46: 149-156. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-010-9289-y>
- Min, K.-L., Y.-H. Kim, Y.W. Kim, H.S. Jung and Y.C. Hah, (2001). Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 392 (2): 279-286.
- Mittal, A., J. Mittal, A. Malviya, D. Kaur and V.K. Gupta, (2010). Decoloration treatment of a hazardous triarylmethane dye, Light Green SF (Yellowish) by waste material adsorbents. **Journal of Colloid and Interface Science**, 342: 518-527. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2009.10.046>
- Mojsov, K.D., D. Andronikov, A. Janevski, A. Kuzelov and S. Gaber, (2016). The application of enzymes for the removal of dyes from textile effluents **Advanced Technologies**, 5 (1): 81-86.
- Monteiro, M.C. and M.E.A. De Carvalho, (1998). Pulp bleaching using laccase from *Trametes versicolor* under high temperature and alkaline conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 70-72: 983-993.

- Morales-Álvarez, E.D., C.M. Rivera-Hoyos, Á.M. Cardozo-Bernal, R.A. Poutou-Piñales, A.M. Pedroza-Rodríguez, *et al.*, (2017a). Plackett-Burman Design for rGILCC1 laccase activity enhancement in *Pichia pastoris*: Concentrated enzyme kinetic characterization. **Enzyme Research**, 2017: Article ID 5947581. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/5947581>
- Morales-Álvarez, E.D., C.M. Rivera-Hoyos, L.E. Chaparro-Núñez, C.E. Daza, R.A. Poutou-Piñales, *et al.*, (2017b). Decolorization and detoxification of Malachite Green by *Ganoderma lucidum*: key operating parameters and adsorption studies. **Journal of Environmental Engineering**, 143 (4): 04016093. [http://dx.doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001180](http://dx.doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001180)
- Morales-Álvarez, E.D., C.M. Rivera-Hoyos, N. González-Ogliastri, R. Rodríguez-Vázquez, R.A. Poutou-Piñales, *et al.*, (2016). Partial removal and detoxification of Malachite Green and Crystal Violet from laboratory artificially contaminated water by *Pleurotus ostreatus*. **Universitas Scientiarum**, 21 (3): 259-285. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.SC21-3.prad>
- Morozova, O.V., G.P. Shumakovich, M.A. Gorbacheva, S.V. Shleev and A.I. Yaropolov, (2007). "Blue" laccases. **Biochemistry (Moscow)**, 72 (10): 1136-1150.
- Morriss-Kay, G.M., (2010). The evolution of human artistic creativity. **journal of Anatomy**, 216: 158-176. <http://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01160.x>
- Munk, L., A. Sitarz, D. Kalyani, J. Dalgaard and A. Meyer, (2015). Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? **Biotechnology Advances** 33: 13-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.008>
- Muruganandham, M. and M. Swaminathan, (2004). Decolourisation of Reactive Orange 4 by Fenton and photo-Fenton oxidation technology. **Dyes and Pigments**, 63: 315-321. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2004.03.004>
- Navada, K.K., G. Sanjeev and A. Kulal, (2018). Enhanced biodegradation and kinetics of anthraquinone dye by laccase from an electron beam irradiated endophytic fungus. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 132: 241-250. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.04.012>
- Nidheesh, P.V., R. Gandhimathi and S.T. Ramesh, (2013). Degradation of dyes from aqueous solution by Fenton processes: a review. **Environmental Science Pollution Research**, 20: 2099-2132. <http://doi.org/10.1007/s11356-012-1385-z>
- Novotný, Č., N. Dias, A. Kapanen, K. Malachová, M. Vándrovcová, *et al.*, (2006). Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. **Chemosphere**, 63: 1436-1442. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.10.002>
- Olbrich, A.C., J.N. Schild and V.B. Urlacher, (2019). Correlation between the T1 copper reduction potential and catalytic activity of a small laccase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 201: 110843. <http://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110843>
- Orna, M.V., (2015) Historic Mineral Pigments: Colorful Benchmarks of Ancient Civilizations. Chemical Technology in Antiquity. ACS Publications, pp. 17-69.
- Osma, J.F., J.L. Toca-Herrera and S. Rodríguez-Couto, (2010). Transformation pathway of Remazol Brilliant Blue R by immobilised laccase. **Bioresource Technology**, 101: 8509-8514. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.074>

- Otto, B. and D. Schlosser, (2014). First laccase in green algae: purification and characterization of an extracellular phenol oxidase from *Tetracystis aeria*. **Planta**, 240: 1225-1236. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-014-2144-9>
- Pabari, R.M., D. Togashi, R. Cama-Moncunill, T. El Arnaout, H. Rifai, *et al.*, (2015). Multipoint near-infrared spectrometry for real-time monitoring of protein conformational stability in powdered infant formula. **International Journal of Food Sciences Nutrition**, 66 (5): 526-532. <http://dx.doi.org/10.3109/09637486.2015.1064867>
- Palanisamy, S., S. Kannan Ramaraj, S.-M. Chen, T.C.K. Yang, P. Yi-Fan, *et al.*, (2017). A novel Laccase Biosensor based on Laccase immobilized Graphene-Cellulose Microfiber Composite modified Screen-Printed Carbon Electrode for Sensitive Determination of Catechol. **Scientific Report**, 7: 41214. <http://doi.org/10.1038/srep41214>
- Palmieri, G., P. Giardina, C. Bianco, A. Scaloni, A. Capasso, *et al.*, (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. **The Journal of Biological Chemistry**, 272 (50): 31301–31307.
- Pardo, I. and S. Camarero, (2015). Laccase engineering by rational and evolutionary design. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 72: 897-910. <http://doi.org/10.1007/s00018-014-1824-8>
- Parrott, J.L., A.J. Bartlett and V.K. Balakrishnan, (2016). Chronic toxicity of azo and anthracenedione dyes to embryo-larval fathead minnow. **Environmental Pollution**, 210: 40-47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.037>
- Patel, H., A. Gupte and S. Gupte, (2009). Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a Basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. **BioResources**, 4 (1): 268-284.
- Patel, H., S. Gupte, M. Gahlout and A. Gupte, (2014). Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1. **3 Biotech**, 4 (1): 77-84. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-013-0129-1>
- Paulino Ribeiro, F.W., M.F. Barroso, S. Morais, S. Viswanathan, P. de Lima-Neto, *et al.*, (2014). Simple laccase-based biosensor for formetanate hydrochloride quantification in fruits. **Bioelectrochemistry**, 95: 7-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2013.09.005>
- Paz, A., J. Carballo, M.J. Pérez and J. Domínguez, (2017). Biological treatment of model dyes and textile wastewaters. **Chemosphere**, 181: 168-177. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.046>
- Pedroza-Camacho, L.D., J.C. Lores-Acosta, J.F. Rojas-Enríquez, J.F. Mateus-Maldonado, C.S. Puentes, *et al.*, (2018). Effect of domestic wastewater as co-substrate on biological stain wastewater treatment using fungal/Bacterial consortia in pilot plant and greenhouse reuse. **Journal of Water Resource and Protection**, 10: 369-393. <http://doi.org/10.4236/jwarp.2018.103020>
- Pereira, L. and M. Alves, (2011) Dyes—Environmental Impact and Remediation. In: Malik, A. and Grohmann, E. (Eds.), *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development. Strategies for Sustainability*. Springer, Dordrecht.
- Piontek, K., M. Antorini and T. Choinowski, (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. **The Journal of Biological Chemistry**, 277 (40): 7663–37669.

- Plegaria, J.S., M. Duca, C. Tard, T.J. Friedlander, A. Deb, *et al.*, (2015). De Novo Design and Characterization of Copper Metallopeptides Inspired by Native Cupredoxins. **Inorganic Chemistry**, 54 (19): 9470-9482. <http://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b01330>
- Pogni, R., M.C. Baratto, A. Sinicropi and R. Basosi, (2015). Spectroscopic and computational characterization of laccases and their substrate radical intermediates. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 72: 885-896. <http://doi.org/10.1007/s00018-014-1825-7>
- Polette-Niewold, L.A., F.S. Manciu, B. Torres, M. Alvarado and R.R. Chianelli, (2007). Organic/inorganic complex pigments: Ancient colors Maya Blue. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 101: 1958-1973. <http://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.07.009>
- Postemsky, P.D., M.A. Bidegain, R. González-Matute, N.D. Figlas and M.A. Cubitto, (2017). Pilot-scale bioconversion of rice and sunflower agro-residues into medicinal mushrooms and laccase enzymes through solid-state fermentation with *Ganoderma lucidum*. **Bioresource Technology**, 231: 85-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.064>
- Poutou, R.A., B.E. Quevedo, H. Córdoba, H. Sáenz and L.A. Barrera, (2005). Influencia de la Fuente de Carbono Sobre la Expresión de Proteínas AOX1-reguladas en *Pichia pastoris*. **NOVA**, 3 (3): 75-87.
- Poutou-Piñales, R.A., H.A. Córdoba-Ruiz, L.A. Barrera-Avellaneda and J.M. Delgado-Boada, (2010). Carbon source feeding strategies for recombinant protein expression in *Pichia pastoris* and *Pichia methanolica*. **African Journal of Biotechnology**, 9 (15): 2173-2184.
- Puchana-Rosero, M.J., E.C. Lima, B. Mella, D. Da Costa, E. Poll, *et al.*, (2018). A coagulation-flocculation process combined with adsorption using activated carbon obtained from sludge for dye removal from tannery wastewater. **Journal of the Chilean Chemical Society**, 63 (1): 3867-3874.
- Pugh, T.W. and L.G. Cecil, (2012). The contact period of central Petén, Guatemala in color. **Res: Anthropology and Aesthetics**, 61: 315-329. <http://doi.org/10.1086/RESvn1ms23647838>
- Pype, R., S. Flahaut and F. Debaste, (2019). On the importance of mechanisms analysis in the degradation of micropollutants by laccases: The case of Remazol Brilliant Blue R. **Environmental Technology & Innovation**, 14: 100324. <http://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100324>
- Qing Yang, X., X. Xia Zhao, C. Yun Liu, Y. Zheng and S. Jun Qian, (2009). Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase. **Process Biochemistry**, 44: 1185-1189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2009.06.015>
- Rajapaksha, G.K.M., M.A.J. Wansapala and A.B.G. Silva, (2015). Detection of synthetic colours in selected foods & beverages available in Colombo district, Sri Lanka. **International Journal of Science and Research**, 6 (5): 801-808.
- Ramírez, P. and J.M. Cocha, (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. **Revista Peruana de Biología**, 10 (1): 67 - 77.

- Rautio, J.J., M. Bailey, T. Kivioja, H. Söderlund, M. Penttilä, *et al.*, (2007). Physiological evaluation of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* in production processes by marker gene expression analysis. **BMC Biotechnology**, 7: 28. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-7-28>
- Record, E., P.J. Punt, M. Chamkha, M. Labat, C.A.M.J.J.v.d. Hondel, *et al.*, (2002). Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. **European Journal of Biochemistry**, 269 (2): 602-609.
- Rivera-Hoyos, C.M., E.D. Morales-Álvarez, J. Abelló-Esparza, D.F. Buitrago-Pérez, N. Martínez-Aldana, *et al.*, (2018). Detoxification of pulping black liquor with *Pleurotus ostreatus* or recombinant *Pichia pastoris* followed by CuO/TiO₂/visible photocatalysis. **Scientific Report**, 8: 3503. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-21597-2>
- Rivera-Hoyos, C.M., E.D. Morales-Álvarez, R.A. Poutou-Piñales, A.M. Pedroza-Rodríguez, R. Rodríguez-Vázquez, *et al.*, (2013). Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, 27 (3-4): 67-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2013.07.001>
- Rivera-Hoyos, C.M., E.D. Morales-Álvarez, S.A. Poveda-Cuevas, E.A. Reyes-Guzmán, R.A. Poutou-Piñales, *et al.*, (2015). Computational analysis and low-scale constitutive expression of laccases synthetic genes *GLCC1* from *Ganoderma lucidum* and *POXA 1B* from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris*. **Plos One**, 10 (1): e0116524. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116524.g002>
- Robert, E., (2017). The role of the cave in the expression of prehistoric societies. **Quaternary International**, 432: 59-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.quaint.2015.11.083>
- Robinson, T., G. McMullan, R. Marchant and P. Nigam, (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresour Technol**, 77: 247-255.
- Rodríguez-Delgado, M.M., G.S. Alemán-Nava, J.M. Rodríguez-Delgado, G. Dieck-Assad, S.O. Martínez-Chapa, *et al.*, (2015). Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, 74: 21-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.008>
- Routoula, E. and S.V. Patwardhan, (2020). Degradation of anthraquinone dyes from effluents: A review focusing on enzymatic dye degradation with industrial potential. **Environmental Science & Technology**, 54 (1): 647-664. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03737>
- Saakshy, K. Singh, A.B. Gupta and A.K. Sharma, (2016). Fly ash as low cost adsorbent for treatment of effluent of handmade paper industry-Kinetic and modelling studies for direct black dye. **Journal of Cleaner Production**, 112: 1227e1240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.09.058>
- Samson, A.V.M., L.J. Wrapson, C.R. Cartwright, D. Sahy, R.J. Stacey, *et al.*, (2017). Artists before Columbus: A multi-method characterization of the materials and practices of Caribbean cave art. **Journal of Archaeological Science**, 88: 24-36. <http://doi.org/10.1016/j.jas.2017.09.012>
- Sarayu, K. and S. Sandhya, (2012). Current Technologies for Biological Treatment of Textile Wastewater—A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 167: 645-661. <http://doi.org/10.1007/s12010-012-9716-6>

- Sarkar, S., A. Banerjee, U. Halder, R. Biswas and R. Bandopadhyay, (2017). Degradation of synthetic azo dyes of textile industry: a sustainable approach using microbial enzymes. **Water Conservation Science Engineering**, 2: 121-131. <http://doi.org/10.1007/s41101-017-0031-5>
- Senthivelan, T., J. Kanagaraj and R.C. Panda, (2016). Recent Trends in Fungal Laccase for Various Industrial Applications: An Eco-friendly Approach - A Review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 21: 19-38. <http://dx.doi.org/10.1007/s12257-015-0278-7>
- Sharma, A., K.K. Jain, A. Jain, M. Kidwai and R.C. Kuhad, (2018). Bifunctional in vivo role of laccase exploited in multiple biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 102: 10327-10343. <http://doi.org/10.1007/s00253-018-9404-8>
- Shraddha, R. Shekher, S. Sehgal, M. Kamthania and A. Kumar, (2011). Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Enzyme Research**, 2011: <http://dx.doi.org/10.4061/2011/217861>
- Si, J., F. Peng and B. Cui, (2013). Purification, biochemical characterization and dye decolorization capacity of an alkali-resistant and metal-tolerant laccase from *Trametes pubescens*. **Bioresource Technology**, 128: 49-57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.085>
- Singh, S., H. Shah, R. Shah and K. Shah, (2017). Identification and estimation of non-permitted food colours (Sudan and Rhodamine-B Dye) In chilli and curry powder by rapid colour test, Thin Layer Chromatography and Spectrophotometry. **international Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 6 (7): 1970-1981. <http://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.607.234>
- Singh, V.K., M.K. Nandi and N.K. Singh, (2016). Accelerated stability study of chitrak haritaki avaleha. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 8 (2): 221-223.
- Sioi, M., A. Bolosis, E. Kostopoulou and I. Poullos, (2006). Photocatalytic treatment of colored wastewater from medical laboratories: Photocatalytic oxidation of hematoxylin. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 184: 18-25.
- Sitarz, A.K., J.D. Mikkelsen and A.S. Meyer, (2016). Structure, functionality and tuning up of laccases for lignocellulose and other industrial applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, 36 (1): 70-86. <http://doi.org/10.3109/07388551.2014.949617>
- Soares, G.a.M.B., M.T. Pessoa de Amorim and M. Costa-Ferreira, (2001). Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. **Journal of Biotechnology**, 89: 123-129. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00302-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00302-9)
- Solís, M., A. Solís, H.I. Pérez, N. Manjarrez and M. Floresa, (2012). Microbial decolouration of azo dyes: A review. **Process Biochemistry**, 47: 1723-1748. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.08.014>
- Solís-Oba, M., V.M. Ugalde-Saldívar, I. González and G. Viniegra-González, (2005). An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the

- mediator 2,20-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. **Journal of electroanalytical Chemistry**, 579: 59–66.
- Soriano, J.J., J. Mathieu-Denoncourt, G. Norman, S.R. de Solla and V.S. Langlois, (2014). Toxicity of the azo dyes Acid Red 97 and Bismarck Brown Y to Western clawed frog (*Silurana tropicalis*). **Environmental Science Pollution Research**, 21: 3582–3591. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-013-2323-4>
- Stanek, J., A. Hoffmann and S. Herres-Pawlis, (2018). Renaissance of the entatic state principle. **Coordination Chemistry Reviews**, 365: 103-121. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.03.009>
- Stasyk, O.G., I.O. Denega, D. Padhorny, K.V. Dmytruk, D. Kozakov, *et al.*, (2018). Glucose regulation in the methylotrophic yeast *Hansenula (Ogataea) polymorpha* is mediated by a putative transceptor Gcr1. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 103: 25-34. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.08.002>
- Stevens, L.J., J.R. Burgess, M.A. Stochelski and T. Kuczek, (2014). Amounts of artificial food colors in commonly consumed beverages and potential behavioral implications for consumption in children. **Clinical Pediatrics**, 53 (2): 133-140. <http://doi.org/10.1177/0009922813502849>
- Stieglitz, R.R., (1994). The Minoan Origin of Tyrian Purple. **The Biblical Archaeologist**, 57 (1): 46-54.
- Strong, P.J. and H. Claus, (2011). Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 41: 373-434. <http://doi.org/10.1080/10643380902945706>
- Šuleková, M., M. Smrčová, A. Hudák, M. Heželová and M. Fedorová, (2017). Organic colouring agents in the pharmaceutical industry. **Folia Veterinaria** 61 (3): 32-46. <http://doi.org/10.1515/fv-2017-0025>
- Suplatov, D., N. Panin, E. Kirilin, T. Shcherbakova, P. Kudryavtsev, *et al.*, (2014). Computational design of a pH stable enzyme: Understanding molecular mechanism of penicillin acylase's adaptation to alkaline conditions. **Plos One**, 9 (6): e100643. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0100643>
- Taha, M., E. Shahsavari, A. Aburto-Medina, M.F. Foda, B. Clarke, *et al.*, (2018). Bioremediation of biosolids with *Phanerochaete chrysosporium* culture filtrates enhances the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Applied Soil Ecology**, 124: 163-170. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.11.002>
- Telke, A.A., A.A. Kadam, S.S. Jagtap, J.P. Jadhav and S.P. Govindwar, (2010). Biochemical characterization and potential for textile dye degradation of blue laccase from *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 15: 696-703. <http://doi.org/10.1007/s12257-009-3126-9>
- Thurston, C.F., (1994). The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, 140: 19-26.
- Tikhomirova, T.I., G.R. Ramazanova and V.V. Apyari, (2018). Effect of nature and structure of synthetic anionic food dyes on their sorption onto different sorbents: Peculiarities and prospects. **Microchemical Journal**, 143: 305-311. <http://doi.org/10.1016/j.microc.2018.08.022>
- Tkaczyk, A., K. Mitrowska and A. Posyniak, (2020). Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems:

- A review. **Science of the Total Environment**, 717: 137222. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137222>
- Tonin, F., R. Melis, A. Cordes, A. Sanchez-Amat, L. Pollegioni, *et al.*, (2016). Comparison of different microbial laccases as tools for industrial uses. **New Biotechnology**, 33 (3): 387-398. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2016.01.007>
- Tripathi, M., S.K. Khanna and M. Das, (2007). Surveillance on use of synthetic colours in eatables vis a vis Prevention of Food Adulteration Act of India. **Food Control**, 18: 211-219. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.09.016>
- Upadhyay, P., R. Shrivastava and P.K. Agrawal, (2016). Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. **3 Biotech**, 6: 15. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-015-0316-3>
- Varjani, S., P. Rakholiya, H.Y. Ng, S. You and J.A. Teixeira, (2020). Microbial degradation of dyes: An overview. **Bioresource Technology**, 314: 123728. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123728>
- Vázquez-Lima, H. and P. Guadarrama, (2012). Analysis of structural factors related to spectroscopic data and redox potentials of CuT1 models through DFT tools. **International Journal of Quantum Chemistry**, 112: 1431-1438. <http://dx.doi.org/10.1002/qua.23130>
- Vetchinkina, E.P., E.A. Loshchinina, I.R. Vodolazov, V.F. Kursky, L.A. Dykman, *et al.*, (2016). Biosynthesis of nanoparticles of metals and metalloids by basidiomycetes. Preparation of gold nanoparticles by using purified fungal phenol oxidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 101 (3): 1047-1062. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7893-x>
- Wang, B., Y. Yan, Y. Tian, W. Zhao, Z. Li, *et al.*, (2016a). Heterologous expression and characterisation of a laccase from *Colletotrichum lagenarium* and decolourisation of different synthetic dyes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 32: 40. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-015-1999-7>
- Wang, X., M.Q. Yao, L. Liu, Y. Cao and J. Bao, (2016b). Degradation of chlorpyrifos in contaminated soil by immobilized laccase. **Journal of the Serbian Chemical Society**, 81 (10): 1215-1224.
- Weisz, A., S.R. Milstein, A.L. Scher† and N.M. Hepp, (2017) Colouring agents in cosmetics: Regulatory aspects and analytical methods. In: Salvador, A. and Chisvert, A. (Eds.), *Analysis of Cosmetic Products* Second ed. Elsevier B.V., pp. 123-157.
- Wlizło, K., J. Polak, A. Jarosz-Wilkolazka, R. Pogni and E. Petricci, (2020). Novel textile dye obtained through transformation of 2-amino-3-methoxybenzoic acid by free and immobilised laccase from a *Pleurotus ostreatus* strain. **Enzyme and Microbial Technology**, 132: 109398. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109398>
- Wong, D.W.S., (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 157: 174-209.
- Wong, K.S., K. Huang, H. Au Ch., J. Wang and S.H. Kwan, (2012). Biodegradation of dyes and polyaromatic hydrocarbons by two allelic forms of *Lentinula edodes* laccase expressed from *Pichia pastoris*. **Bioresource Technology** 104: 157-164.
- Wu, Y., Y. Jiang, J. Jiao, M. Liu, F. Hu, *et al.*, (2014). Adsorption of *Trametes versicolor* laccase to soil iron and aluminum minerals: Enzyme activity, kinetics and

- stability studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 114: 342–348. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.10.016>
- Wyart, J., P. Bariand and J. Filippi, (1981). Lapis lazuli from Sar-i-Sang, Badakhshan, Afghanistan. **Gems and Gemology** 17 (4): 184-190.
- Yang, J., W. Li, T.B. Ng, X. Deng, J. Lin, *et al.*, (2017). Laccases: production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation. **Frontiers in Microbiology**, 8: Article 832. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00832>
- Yang, J., Q. Lin, T.B. Ng, X. Ye and J. Lin, (2014). Purification and Characterization of a Novel Laccase from *Cerrena* sp. HYB07 with Dye Decolorizing Ability. **Plos One**, 9 (10): e110834. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0110834>
- Yang, J., T.B. Ng, J. Lin and X. Ye, (2015a). A novel laccase from basidiomycete *Cerrena* sp.: Cloning, heterologous expression, and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, 77: 344-349.
- Yang, J., X. Yang, Y. Lin, T.B. Ng, J. Lin, *et al.*, (2015b). Laccase-catalyzed decolorization of Malachite Green: performance optimization and degradation mechanism. **Plos One**, 10 (5): e0127714. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0127714>
- Yang, Y., F. Ma, H. Yu, F. Fan, X. Wan, *et al.*, (2011). Characterization of a laccase gene from the white-rot fungi *Trametes* sp. 5930 isolated from Shennongjia Nature Reserve in China and studying on the capability of decolorization of different synthetic dyes. **Biochemical Engineering Journal**, 57: 13-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2011.07.006>
- Yoshida, H., (1883). Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, 43: 472-486.
- Yue, Q., Y. Yang, J. Zhao, L. Zhang, L. Xu, *et al.*, (2017). Identification of bacterial laccase *cueO* mutation from the metagenome of chemical plant sludge. **Bioresour and Bioprocess**, 4: 48. <http://dx.doi.org/10.1186/s40643-017-0178-0>
- Zeng, S., X. Qin and L. Xia, (2017). Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. **Biochemical Engineering Journal**, 119: 92–100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.12.016>
- Zeng, X., Y. Cai, X. Liao, X. Zeng, S. Luo, *et al.*, (2012). Anthraquinone dye assisted the decolorization of azo dyes by a novel *Trametes trogii* laccase. **Process Biochemistry**, 47: 160-163. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.10.019>
- Zhang, A.-L., J.-X. Luo, T.-Y. Zhang, Y.-W. Pan, Y.-H. Tan, *et al.*, (2009). Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. **Molecular Biology Report**, 36 (6): 1611-1619. <http://doi.org/10.1007/s11033-008-9359-4>
- Zhao, D., X. Zhang, D. Cui and M. Zhao, (2012). Characterisation of a novel white laccase from the deuteromycete fungus *Myrothecium verrucaria* NF-05 and Its decolourisation of dyes. **Plos One**, 7 (6): e38817. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0038817>
- Zheng, M., Y. Chi, H. Yi and S. Shao, (2014). Decolorization of Alizarin Red and other synthetic dyes by a recombinant laccase from *Pichia pastoris*. **Biotechnol Letter**, 36: 39-45. <http://doi.org/10.1007/s10529-013-1323-2>

- Zhou, L., K. Xu, X. Cheng, Y. Xu and Q. Jia, (2017). Study on optimizing production scheduling for water-saving in textile dyeing industry. **Journal of Cleaner Production**, 141: 721-727. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.09.047>
- Zhuo, R., F. He, X. Zhang and Y. Yang, (2015). Characterization of a yeast recombinant laccase rLAC-EN3-1 and its application in decolorizing synthetic dye with the coexistence of metal ions and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, 93: 63-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.09.004>
- Zhuo, R., J. Zhang, H. Yu, F. Ma and X. Zhang, (2019). The roles of *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 laccase isoenzymes in decolorization of synthetic dyes and the transformation pathways. **Chemosphere**, 234: 733-745. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.113>
- Zimbaridi, A.L.R.L., P.F. Camargo, S. Carli, S. Aquino Neto, L.P. Meleiro, *et al.*, (2016). A High redox potential laccase from *Pycnoporus sanguineus* RP15: potential application for dye decolorization. **International Journal of Molecular Sciences**, 17 (5): E672. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17050672>
- Zouari-Mechichi, H., T. Mechichi, A. Dhouib, S. Sayadi, A.T. Martínez, *et al.*, (2006). Laccase purification and characterization from *Trametes troglia* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, 39: 141-148. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.027>
- Zucca, P., G. Cocco, F. Sollai and E. Sanjust, (2015). Fungal laccases as tools for biodegradation of industrial dyes. **Biocatalysis** 1: 82-108.
- Zucca, P., A. Rescigno, A. Olianias, S. Maccioni, F.A. Sollai, *et al.*, (2011). Induction, purification, and characterization of a laccase isozyme from *Pleurotus sajor-caju* and the potential in decolorization of textile dyes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 68 (2): 216-222.
- Zuorro, A. and R. Lavecchia, (2014). Evaluation of UV/H₂O₂ advanced oxidation process (AOP) for the degradation of diazo dye Reactive Green 19 in aqueous solution. **Desalination and Water Treatment**, 52 (7-9): 1571-1577. <http://dx.doi.org/10.1080/19443994.2013.787553>

Capítulo 3. Estandarización de las condiciones de ensayo para detección de la actividad enzimática de la lacasa rPOXA 1B

Abreviaturas

AB:	Tampón acetato
AB OFED:	Tampón acetato, One Factor Experimental Design
2,6-DMP:	2,6-dimetoxifenol
ABTS:	2, 2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
B-RB:	Tampón Britton-Robinson
CAT:	Catecol
CASTp:	Cálculo del atlas computarizado de topografía superficial de proteínas
CB:	Tampón citrato de sodio
C-PB OFED:	Tampón citrato-fosfato, One Factor Experimental Design
DOPA:	L-3,4-dihidroxifenilalanina
GUA:	Guayacol
K_M:	Constante de Michaelis-Menten
MCPB.py	Generador de parámetros con centros de metal basado en Python Abr. en inglés (Metal center parameter builder based in Python)
OED	Optimal Experimental Design
POXA 1B:	Lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i>
rPOXA 1B:	Lacasa recombinante de <i>P. ostreatus</i> expresada en <i>P. pastoris</i>
pKa:	Constante de disociación ácida
RMSD:	Desviación cuadrática media. Abreviatura <i>en inglés</i> (Root mean square deviation)
SGZ:	Siringaldazina
TNC:	Centro de cobre trinuclear
V_{max}:	Velocidad máxima de la reacción

3.1 Introducción

Según las características espectroscópicas de las lacasas, generalmente tienen una conformación estructural con tres tipos de cobres, (Jones and Solomon, 2015), distribuidos en un sitio mononuclear que contiene un cobre tipo 1 (CuT1) y un sitio de cobre trinuclear (centro de cobre trinuclear - TNC) que contiene un cobre tipo 2 (CuT2) y dos cobres tipo 3 (CuT3a y CuT3b), (Komori and Higuchi, 2010; Rivera-Hoyos *et al.*, 2013; Hakulinen and Rouvinen, 2015; Tonin *et al.*, 2016), formando una matriz triangular (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013; Pietra, 2016). El CuT1 y el TNC están distanciados 13 Å aproximadamente y se conectan mediante una triada His-Cys-His a los dos cobres T3 (Jones and Solomon, 2015).

El centro activo es el encargado de oxidar los sustratos; reacción que genera H₂O en lugar de H₂O₂ (Giardina *et al.*, 2010). La oxidación del sustrato ocurre en tres pasos e inicia con la enzima en su forma oxidada Cu (II). Primero, el CuT1 se reduce por acción del sustrato, luego un electrón se transfiere a través del motivo conservado His-Cys-His desde el CuT1 hacia el centro de cobre trinuclear (CuT3a y CuT3b) y finalmente en el TNC se reduce el oxígeno molecular (O₂) a agua. La molécula de O₂ se une al TNC para la activación asimétrica y se postula que la bolsa de unión a O₂ restringe el acceso de agentes oxidantes distintos del O₂. No se detecta H₂O₂ fuera de la lacasa durante la catálisis, lo que indica que se está produciendo una reducción de cuatro electrones de O₂ a H₂O (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013).

La espectrofotometría es el método más usado para detectar la actividad de la lacasa, debido a la simplicidad y sensibilidad (Theerachat *et al.*, 2019). Los ensayos enzimáticos se realizan para: *i*) identificar presencia o ausencia de una enzima en una muestra *ii*) determinar la concentración o la actividad de una enzima en la muestra. La actividad de la enzima depende de las condiciones definidas con respecto a la temperatura, el pH, la naturaleza y la fuerza de los iones, así como las concentraciones de los componentes del ensayo. En las reacciones catalizadas por enzimas un sustrato

se convierte en un producto, por lo tanto, también es importante observar la formación del producto dependiente del tiempo (Bisswanger, 2014).

La detección de la actividad lacasa utiliza sustratos como 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), (ABTS), siringaldazina (SGZ), 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) catecol (CAT), L-3, 4-dihidroxifenilalanina (DOPA) y guayacol (GUA), (Wong *et al.*, 2013; Theerachat *et al.*, 2019) y debido a la variedad de sustratos que pueden emplearse, se han diseñado varios protocolos para la medición de la actividad enzimática (Tabla 3.1). El ABTS es un sustrato no fenólico que se emplea con mayor frecuencia para detectar la actividad lacasa, se caracteriza por no formar quinonas, tener estabilidad alta en el rango de pH 3.0 a 6.5 ± 0.2 , por encima del cual es menos estable (entre pH 6.5 a 8.0 ± 0.2) y al alto coeficiente de extinción molar de su producto oxidado ($\xi_{436} = 29300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 436 nm y $\xi_{420} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 420 nm), (Wong *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2017). El ABTS en su forma reducida, tiene un color verde muy tenue, mientras que, en su primer estado de oxidación, se vuelve verde oscuro, por lo que es utilizado habitualmente para detectar la actividad de la enzima. Es importante destacar que en el segundo estado de oxidación del ABTS el compuesto oxidado es de color morado; estado que no se utiliza para medir la actividad enzimática (Dwivedi *et al.*, 2011).

Tabla 3.1 Tampón, sustrato y longitud de onda usados en la detección de la actividad lacasa.

Sustrato (mM)	Tampón	pH ± 0.2	Longitud de onda (nm)	Autor
ABTS (0.5)	0.1 M Acetato de sodio	5.0	420	(Bronikowski <i>et al.</i> , 2017)
ABTS (0.5)	0.6 M Acetato de sodio	4.5	436	(Morales-Álvarez <i>et al.</i> , 2017)
ABTS (2.5)	0.1 M Citrato de sodio	3.0	420	(Pinar <i>et al.</i> , 2017)
ABTS (1)	0.1 M Acetato de sodio	4.0	436	(Bertrand <i>et al.</i> , 2017)
ABTS (1)	0.1 M Succinato de sodio	4.0	436	(Balcázar-López <i>et al.</i> , 2016)
ABTS (0.5)	0.1 M Acetato de sodio	4.6	420	(Huang <i>et al.</i> , 2016)
ABTS (0.5)	0.1 M McIlvaine	3.0	420	Wang <i>et al.</i> , (2016)
ABTS (0.5)	0.1 M Fosfato de sodio	6.0	420	An <i>et al.</i> , (2015)
ABTS (0.5)	0.05 M Tartrato de sodio	3.0	420	Benghazi <i>et al.</i> , (2014)
ABTS (1)	0.05 M Citrato de sodio	4.5	420	Li <i>et al.</i> , (2014)
ABTS (0.5)	0.05 M Ácido cítrico / fosfato	2.5	420	Wang <i>et al.</i> , (2014)
ABTS (0.5)	0.2 M Acetato de sodio	5.0	420	(Zhou <i>et al.</i> , 2014)
ABTS (1)	0.1 M Acido tartárico	4.5	420	(Huifang <i>et al.</i> , 2013)
2,6 DMP (1)	0.05 M Malonato	3.0	420 / 476	(Hildén <i>et al.</i> , 2013)
SGZ	0.1 Acetato de sodio	5.5	525	(Lin <i>et al.</i> , 2013)
ABTS (2)	0.1 M Citrato de sodio	3.0	420	(Piscitelli <i>et al.</i> , 2005)

En las lacasas la especificidad por el sustrato y la afinidad varían con los cambios de pH (Dwivedi *et al.*, 2011). El pH de las reacciones enzimáticas es controlado con la adición de un tampón. Para la selección del tampón se debe considerar su uso a pH cercano al valor del pK_a del tampón, conocer la compatibilidad del tampón con el sistema de reacción, la solubilidad y la fuerza iónica (Ferreira *et al.*, 2015), el pH óptimo de la proteína y los componentes del tampón que pueden actuar como inhibidores de la actividad enzimática (Handing *et al.*, 2018). Además, en enzimas con cofactores metálicos (metaloproteínas) se requiere el uso de un tampón compatible y conocer la formación de complejos metálicos (Handing *et al.*, 2018). Así mismo, los componentes necesarios para la reacción pueden interactuar negativamente con ciertos tampones, generando condiciones no óptimas que afectan la reproducibilidad de la reacción (Acker and Auld, 2014).

La variación del pH modifica las interacciones electrostáticas entre los grupos funcionales cargados de los aminoácidos; generando cambios que pueden alterar la estructura tridimensional de la proteína (Ferreira et al., 2015). Así mismo, el estado de protonación y la conformación de los aminoácidos que coordinan el ion metálico de las lacasas (la histidina y la cisteína) pueden ser afectados por variaciones en el pH (Handing et al., 2018). Además, el pH afecta la velocidad máxima de reacción enzimática, ya que durante las reacciones enzimáticas se pueden consumir o liberar protones (Ferreira et al., 2015). Al actuar sobre sustratos cuya oxidación no involucra el intercambio de protones, la actividad lacasa normalmente disminuye a medida que aumenta el pH, mientras que para los sustratos cuya oxidación involucra el intercambio de protones, el valor óptimo de pH para la actividad lacasa depende del tipo de lacasa y no del tipo de sustrato (Dwivedi et al., 2011).

La actividad oxidativa de las lacasas es influenciada por la interacción entre el sustrato y la enzima (Pardo and Camarero, 2015), ya que los valores de la constante de Michaelis-Menten o afinidad por el sustrato (K_M) varían debido a las diversas interacciones entre la enzima (bolsillo de unión) y el sustrato (Christensen and Kepp, 2013). La capacidad de oxidación de estas oxidasas depende de los residuos que delimitan el bolsillo de unión al sustrato y del comportamientos cinéticos de las lacasas (Pardo and Camarero, 2015).

La afinidad de la enzima por un sustrato puede ser demostrada mediante métodos computacionales, ya que se usan como herramienta para entender los mecanismos catalíticos con fines de aplicación biotecnológica, química o ambiental. Diferentes métodos computacionales se han usado para entender los procesos que ocurren a nivel molecular. Los análisis de acoplamiento molecular (Docking) pretenden predecir la estructura del complejo ligando-receptor, utilizando métodos de cálculo, estrategia útil para complementar los análisis de afinidad de la enzima por el sustrato (Alzate-Morales et al., 2007; Meng et al., 2011). La determinación de la unión y la afinidad entre ligando-receptor es crucial para comprender los mecanismos de interacción (Huang and Zou, 2010). En este sentido, la interacción entre una molécula pequeña y una proteína a nivel

atómico permite caracterizar el comportamiento de las moléculas pequeñas en el sitio de unión de las proteínas diana, logrando dilucidar aspectos relacionados con los procesos bioquímicos fundamentales en las enzimas ([Meng et al., 2011](#)).

El objetivo de este capítulo fue estandarizar las condiciones de ensayo para detección de la actividad enzimática de la lacasa rPOXA 1B; los cuales fueron soportados con análisis computacionales.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Cepa

Se utilizó la cepa de *Pichia pastoris* X33 que contiene el vector de expresión *pGAPZαA-LaccPost-Stop* (Clon 1) con el gen sintético optimizado que codifica para la lacasa POXA 1B de *Pleurotus ostreatus*. La cepa se encontraba previamente conservada en medio YPD (1% (p/v) extracto de levadura, 2% (p/v) peptona, 2% (p/v) glucosa, suplementado con 20 % (p/v) glicerol) a -80°C (Rivera-Hoyos *et al.*, 2015).

3.2.2 Sobrenadante usando en los diseños experimentales

Las mediciones de actividad lacasa de rPOXA 1B fueron realizadas usando un sobrenadante obtenido con el medio mejorado [10 % (v/v) inóculo, 1 mM CuSO₄, 10 g L⁻¹, glucosa, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 20 g L⁻¹ peptona, 15 g L⁻¹ extracto de levadura], (Ardila-Leal *et al.*, 2019), con actividad lacasa de 1,592.7 ± 28.1 UL⁻¹; medición realizada usando la técnica de Tinoco *et al.* (2001); la cual emplea tampón acetato.

3.2.3 Optimal Experimental Designs (OED)

Se realizaron dos diseños de experimentos para evaluar influencia de los factores sobre la medición de la actividad enzimática. Para los tratamientos en tampón acetato (AB) 0.6 M se empleó un OED (2³), en el que se evaluaron dos niveles de cada uno de los tres factores ensayados (Tabla 3.2). Para los tratamientos en tampón citrato de sodio (CB) 0.1 M se empleó un “OED” (irregular) con niveles diferentes para cada uno de los tres factores ensayados (Tabla 3.2). En ambos diseños, como variable de respuesta se empleó la actividad enzimática (UL⁻¹). La prueba de ANOVA fue utilizada para determinar el efecto de los factores evaluados en los “OED”, utilizando el software Design Expert (V 9.0), (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Diseño de experimentos “OED” para medir actividad lacasa de rPOXA 1B en tampón acetato o citrato.

Tratamientos		Factores		
		A	B	C
Tampón Acetato (AB)	Tampón Citrato (CB)	pH \pm 0.2	Longitud de onda (nm)	ABTS (mM)
	CB T1	3.00	420	0.50
	CB T2	3.00	420	2.00
	CB T3	3.00	436	0.50
	CB T4	3.00	436	2.00
AB T1	CB T5	4.00	420	0.50
AB T2	CB T6	4.00	420	2.00
AB T3	CB T7	4.00	436	0.50
AB T4	CB T8	4.00	436	2.00
AB T5	CB T9	4.50	420	0.50
AB T6	CB T10	4.50	420	2.00
AB T7	CB T11	4.50	436	0.50
AB T8	CB T12	4.50	436	2.00

3.2.4 “One Factor Experimental Design (OFED)” para la detección de actividad enzimática a pH más bajo en tampón acetato y citrato-fosfato

A partir de los resultados obtenidos en el OED se decidió evaluar la actividad enzimática a pH más bajo, usando tampón acetato (AB OFED) y tampón citrato-fosfato (C-PB OFED), (mezcla de 0.1 M ácido cítrico y 0.2 M Na₂HPO₄ (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Tratamientos a pH bajos usando tampón acetato acetato (AB OF) o tampón citrato-fosfato (C-PB OF) para medir la actividad de rPOXA 1B.

Tratamientos	Factores		
	A- pH \pm 0.2	B- Longitud de onda (nm)	C- ABTS (mM)
Tampón acetato (AB OFED)	3.6	420	2
Tampón citrato-fosfato (C-PB OFED)	2.6	420	2

3.2.5 Comparación de medias

La comparación de medias entre los tratamientos en tampón acetato de los diseños experimentales OED y OFED fue realizada a través de la prueba de Duncan, empleando el software SPSS (V 24.0) con un intervalo de confianza de 95 % (α 0.05).

3.2.6. Ensayo de actividad lacasa en tampón Britton-Robinson a pH 3.0 y 4.0 \pm 0.2

Para determinar si los resultados anteriores eran consecuencia del pH utilizado en la detección de actividad enzimática o si estaban influenciado por el ion acetato o citrato, se evaluó la actividad lacasa a pH 3.0 y 4.0 \pm 0.2 en tampón Britton-Robinson (B-RB) [Ácido acético, ácido fosfórico y ácido bórico] 0.04 M (Reynolds III *et al.*, 2013) para rPOXA 1B. Para la medición de la actividad lacasa con el tampón B-RB se empleó ABTS (2 mM) como sustrato y se midió a una longitud de onda de 420 nm.

3.2.7 Técnicas analíticas para la detección de la actividad enzimática

La actividad enzimática fue monitoreada por el cambio en la absorbancia debido a la oxidación del ABTS. Sin embargo, dependiendo del tratamiento y de la longitud de onda evaluada se empleó un coeficiente de extinción molar diferente, donde, en la medición a 436 nm de longitud de onda se utilizó un coeficiente de extinción molar de $\xi_{436} = 29300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y para 420 nm se utilizó $\xi_{420} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.2.7.1 Detección de la actividad enzimática (UL^{-1}) usando el tampón acetato

Se preparó tampón acetato de sodio 0.6 M a los diferentes pH propuestos en los tratamientos. Se usaron 800 μ L de extracto crudo a temperatura ambiente, 100 μ L (0.6 M) de tampón acetato de sodio y 100 μ L de ABTS (5 ó 20 mM) como sustrato. La formación de un radical catiónico verde fue evaluada espectrofotométricamente durante 3 minutos (Tinoco *et al.*, 2001). La solución blanco contenía 800 μ L de agua destilada, 100 μ L (0.6 M) de tampón acetato de sodio y 100 μ L de ABTS (5 ó 20 mM). La actividad enzimática se expresó en $U L^{-1}$.

3.2.7.2 Actividad enzimática (UL^{-1}) usando tampón citrato

Se preparó el tampón citrato de sodio 0.1 M a los diferentes pH propuestos en los tratamientos. Se agregaron 100 μ L de ABTS (5 ó 20 mM), de 2 a 20 μ L de sobrenadante centrifugado a temperatura ambiente (este volumen varió dependiendo de la actividad de la enzima en la muestra) y se completó el volumen hasta 1 mL con tampón citrato 0.1 M. La formación de un radical catiónico verde fue evaluada espectrofotométricamente durante 1 minuto. La solución blanco contenía 2 μ L de agua destilada, 900 μ L (0.1 M) de tampón citrato de sodio y 100 μ L de ABTS (5 ó 20 mM). La actividad enzimática se expresó en $U L^{-1}$.

3.2.7.3 Actividad enzimática ($U L^{-1}$) usando los tampones citrato-fosfato y Britton-Robinson

La medición de la actividad enzimática usando el tampón citrato-fosfato y el tampón Britton-Robinson (Reynolds III *et al.*, 2013) fue realizada siguiendo la misma metodología usada con el tampón citrato.

La unidad enzimática (U) está definida como la cantidad de enzima capaz de transformar 1 μ mol de sustrato (ABTS) por minuto, por litro [Ecuación 3.1]:

$$UL^{-1} = \frac{\Delta E \times V_t}{\xi \times d \times V_s} \quad \text{[Ecuación 3.1]}$$

Donde: ΔE corresponde (absorbancia final – absorbancia inicial) durante 1 min de reacción, ξ al coeficiente de extinción molar del ABTS ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), dependiendo de la longitud de onda empleada (para 436 nm, ξ : 29300 $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y para 420 nm, ξ : 36000 $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), d es la longitud de la cubeta en cm, V_t es el volumen total de reacción en mL y V_s es el volumen de muestra en mL (concentrado de la enzima).

3.2.8 Caracterización cinética de rPOXA 1B usando la detección de actividad lacasa seleccionada en la comparación de medias

Las constantes cinéticas de la enzima se investigaron utilizando ABTS como sustrato en el rango entre 0.01-3.00 mM, en tampón citrato de sodio 0.1 M, pH 3.0 ± 0.2 y 10.7 UL^{-1} de enzima. Los ensayos fueron llevados a cabo a una temperatura de 25 °C. Después de ajustar la hipérbola usando la ecuación de Michaelis-Menten, la K_M y la V_{max} aparentes se calcularon, utilizando el Software SIMFIT (V 7.4.6). Todos los ensayos cinéticos se realizaron por triplicado.

3.2.9. Modelado por homología y parametrización del centro activo de POXA 1B

Debido a que no existe una estructura cristalográfica reportada para POXA1B de *Pleurotus ostreatus*, fue necesario hacer un modelo 3D de la enzima. La secuencia fue procesada en el servidor SignalP5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para identificar y eliminar los aminoácidos correspondientes al péptido señal. La estructura 3D de la lacasa fue predicha mediante modelación por homología (Sáenz *et al.*, 2007; Sáenz-Suárez *et al.*, 2011; Zárate-Bonilla *et al.*, 2014; Rivera-Hoyos *et al.*, 2015) usando los servidores HHpred, Phyre2 y Swiss-model. Los modelos obtenidos fueron evaluados mediante QMEAN (Benkert *et al.*, 2008; Benkert *et al.*, 2009), así como por las características del centro activo de la enzima. La calidad de la estructura modelada fue validada usando el servidor Saves V 5.0 (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/>).

El cobre CuT1 y el TNC en el bolsillo de unión fueron parametrizados con el paquete incluido en Amber 18 Metal center parameter builder (Case *et al.*, 2020), basado en Python (MCPB.py), (Li and Merz, 2016), el cual fue soportado por cálculos en Gaussian

16 (Frisch *et al.*, 2016). Todos los cobres (CuT1 y los cobres del TNC) fueron modelados como Cu²⁺ y fueron ajustados todos los residuos conservados que se unen al centro de cobre de la lacasa.

3.2.10 Acoplamiento molecular (Docking) entre ABTS y POXA1B

Para el acoplamiento molecular (Docking) (ABTS-lacasa) se empleó la estructura predicha empleando el modelo de POXA 1B, este acoplamiento se realizó utilizando Autodock Vina (Trott and Olson, 2010). El acoplamiento molecular entre el ABTS y la lacasa POXA 1B se realizó a pH 3.0, de acuerdo con el mejor pH en la medición de la actividad lacasa. El ligando (ABTS) se obtuvo de la estructura cristalográfica 3ZDW (lacasa CotA - *Bacillus subtilis*) obtenido en la base de datos del Protein Data Bank (PDB). Utilizando el software Avogadro se ajustó el ligante a pH 3.0 y se realizó una minimización de energía empleando mecánica molecular. El proceso de preparación del ligando incluido en AutoDock asignó automáticamente el número de torsiones para la estructura, lo que permitió estructuras flexibles en el cálculo del acoplamiento molecular. Se adicionaron hidrógenos polares y luego se agregó la carga por el método de Gasteiger (Martínez-Sotres *et al.*, 2015).

Al igual que el ABTS la estructura de rPOXA 1B fue protonada a pH 3.0 ± 0.2 usando el servidor H++ (<http://biophysics.cs.vt.edu/>). Para la preparación de la proteína se adicionaron hidrógenos polares y se mantuvo el campo de fuerza ff14SB que fue usado para modelar todos los residuos de la lacasa durante la parametrización del centro activo (Maier *et al.*, 2015). Para la construcción de la red se seleccionó de acuerdo a la información recopilada de los residuos ubicados en el bolsillo del sitio activo. Para identificar los residuos que pueden interactuar con el sustrato se realizó el cálculo del atlas computarizado de topografía superficial de proteínas (CASTp) desde el servidor (<http://sts.bioe.uic.edu/castp/calculation.html>), (Tian *et al.*, 2018) y se confrontaron con los residuos característicos reportados en otras investigaciones (Martínez-Sotres *et al.*, 2015; Rivera-Hoyos, 2016), generando una red de 38 x 52 x 34 con un espaciado de 0.375 Å. Se calcularon 10 simulaciones de acoplamientos. Se compararon los

acoplamiento del bolsillo CuT1 y con la mejor posición y conformación del ligando se realizó posteriormente el análisis de RMSD entre el ligando obtenido y el ligando cristalográfico (3ZWD). Finalmente, se determinaron las interacciones moleculares del ligando usando LigPlot ([Wallace et al., 1997](#)).

3.3 Resultados

3.3.1 “Optimal Experimental Design (OED)” de tampón acetato y citrato

Las Tablas 3.4, 3.5 y la Figura 3.1, muestran los resultados de la medición de la actividad enzimática. La Tabla 3.4 muestra los resultados del OED para la medición de la actividad enzimática de rPOXA 1B en el tampón acetato y el tampón citrato. Se observó que el modelo para ambos tampones es significativo ($p < 0.0001$) y que la pérdida de ajuste del valor-F se debía al ruido generado en el experimento. Los factores de análisis en tampón acetato y citrato fueron significativos $p < 0.05$ a excepción de la interacción entre los factores ABC en tampón acetato. Adicionalmente, para el tampón acetato se obtuvo el efecto y porcentaje de contribución de los factores, obteniendo un efecto negativo para los factores pH y longitud de onda, así como un efecto positivo para el factor ABTS, con porcentajes de contribución de 53.62, 19.90 y 20.73 %, respectivamente.

Tabla 3.4. ANOVA de “Optimal Experimental Design” del tampón acetato y tampón citrato y el efecto de los diferentes factores para la actividad lacasa en tampón acetato.

Factor	Tampón Acetato (AB)				Tampón Citrato (CB)	
	Valor F	p- valor Prob > F	Efecto	% Contribución	Valor-F	p- valor Prob > F
Modelo	202.138	< 0.0001			668.49	< 0.0001
A- pH	783.006	< 0.0001	-1524.96	53.62	2169.12	< 0.0001
B-Longitud de onda	290.625	< 0.0001	-929.06	19.90	2022.78	< 0.0001
C-ABTS	302.734	< 0.0001	948.21	20.73	589.58	< 0.0001
AB	35.706	< 0.0001	325.65	2.45	155.58	< 0.0001
AC	26.962	0.0002	282.98	1.85	57.18	< 0.0001
BC	7.273	0.0194	146.97	0.50	16.55	0.0019
ABC	1.954	0.1874	-76.19	0.13	14.18	0.0009
Lack of Fit	0.089	0.9978			4.11	0.1361
R-Squared		0.9916				0.9985
Adj. R-Squared		0.9867				0.9970
Pred. R-Squared		0.9774				0.9921
Adeq. Precision		39.593				76.870
Diferencia R-Squared y Adj. R-Squared		0.0049				0.0015

La [Tabla 3.5](#) muestra la comparación entre los resultados de actividad enzimática observada y las actividades enzimáticas predichas por el modelo, en donde se puede observar que no existen grandes diferencias entre los valores. En tampón acetato el tratamiento con mayor actividad lacasa fue AB T2 (pH 4.0 ± 0.2; λ_{420nm}; 2.0 mM ABTS) con 4,773.7 ± 233.4 UL⁻¹ y el tratamiento con menor actividad lacasa correspondió a AB T7 con 1,518.77 ± 12.07 (pH 4.5 ± 0.2; λ_{436nm}; 0.5 mM ABTS), ([Tabla 3.5](#)). En tampón citrato el tratamiento CB T2 (pH 3.0 ± 0.2; λ_{420nm}; 2.0 mM ABTS) obtuvo las actividades enzimáticas más altas con actividades de 5,291.665 ± 45.83 UL⁻¹ y la actividad enzimática más baja se reportó en el tratamiento con CB T11 912.04 ± 19.64 UL⁻¹ (pH 4.5 ± 0.2; λ_{436nm}; 0.5 mM ABTS), ([Tabla 3.5](#)).

[Tabla 3.5](#) Tratamientos y resultados de la actividad enzimática UL⁻¹ para cada una de las enzimas bajo las diferentes condiciones ensayadas.

Tratamientos		Factores			Actividad enzimática (UL ⁻¹)			
		A	B	C	Tampón Acetato		Tampón Citrato	
Tampón acetato (AB)	Tampón citrato (CB)	pH ± 0.2	Longitud de onda (nm)	ABTS (mM)	Observado	Predicho	Observado	Predicho
	CB T1	3.00	420	0.50			4,962.96 ± 13.09	4,958.89
	CB T2	3.00	420	2.00			5,291.67 ± 45.83	5,291.68
	CB T3	3.00	436	0.50			2,870.37 ± 130.95	2,870.39
	CB T4	3.00	436	2.00			3,180.56 ± 124.40	3,184.61
AB T1	CB T5	4.00	420	0.50	4,378.60 ± 28.13	4,378.60	2,236.11 ± 32.74	2,244.25
AB T2	CB T6	4.00	420	2.00	4,773.66 ± 95.15	4,794.42	3,870.37 ± 13.09	3,866.30
AB T3	CB T7	4.00	436	0.50	2,889.64 ± 238.37	2,910.40	1,300.93 ± 72.02	1,296.86
AB T4	CB T8	4.00	436	2.00	3,804.51 ± 1.34	3,786.64	2,067.90 ± 95.03	2,073.32
AB T5	CB T9	4.50	420	0.50	2,160.49 ± 25.26	2,160.49	1,643.52 ± 32.74	1,639.45
AB T6	CB T10	4.50	420	2.00	3,320.47 ± 59.46	3,320.47	2,254.63 ± 32.74	2,258.68
AB T7	CB T11	4.50	436	0.50	1,518.77 ± 12.07	1,500.89	912.04 ± 19.64	916.09
AB T8	CB T12	4.50	436	2.00	2,773.35 ± 162.24	2,788.35	1,666.67 ± 52.38	1,658.56

Se destacan las actividades más altas observadas (azul) y predichas (negrillas)

3.3.2 Análisis a pH bajo en tampón acetato y en tampón citrato-fosfato

Debido a que se encontró que los pH bajos mejoraban la cuantificación de la actividad lacasa se probó la actividad a pH más bajo para el tampón acetato y el tampón citrato-

fosfato. Se encontró que en tampón acetato a $\text{pH } 3.6 \pm 0.2$ (AB OFED) la actividad lacasa de 1B fue de $4,819.44 \pm 55.55 \text{ UL}^{-1}$ y en el tampón citrato-fosfato a $\text{pH } 2.6 \pm 0.2$ (C-PB OFED) la actividad lacasa fue de $4884.26 \pm 48.78 \text{ UL}^{-1}$.

3.3.3 Comparación de medias

La [Figura 3.1](#) muestra la comparación de medias de los tratamientos incluidos en los dos diseños experimentales OED, AB, CB y los análisis a pH más bajo AB OFED y C-PB OFED. El análisis muestra que el tratamiento CB T2 ubicado en el subconjunto **a** tiene diferencias significativas con los demás tratamientos. En el subconjunto **b** se ubicaron los tratamientos AB OFED, C-PB OFED, CB T1 y AB T2; este último fue considerado el mejor tratamiento usando el tampón acetato. Entre todas las mediciones el tratamiento CB 11 ($\text{pH } 4.5 \pm 0.2$; $\lambda_{436\text{nm}}$; 0.5 mM ABTS) obtuvo la menor actividad enzimática con sólo 912.04 ± 19.64 .

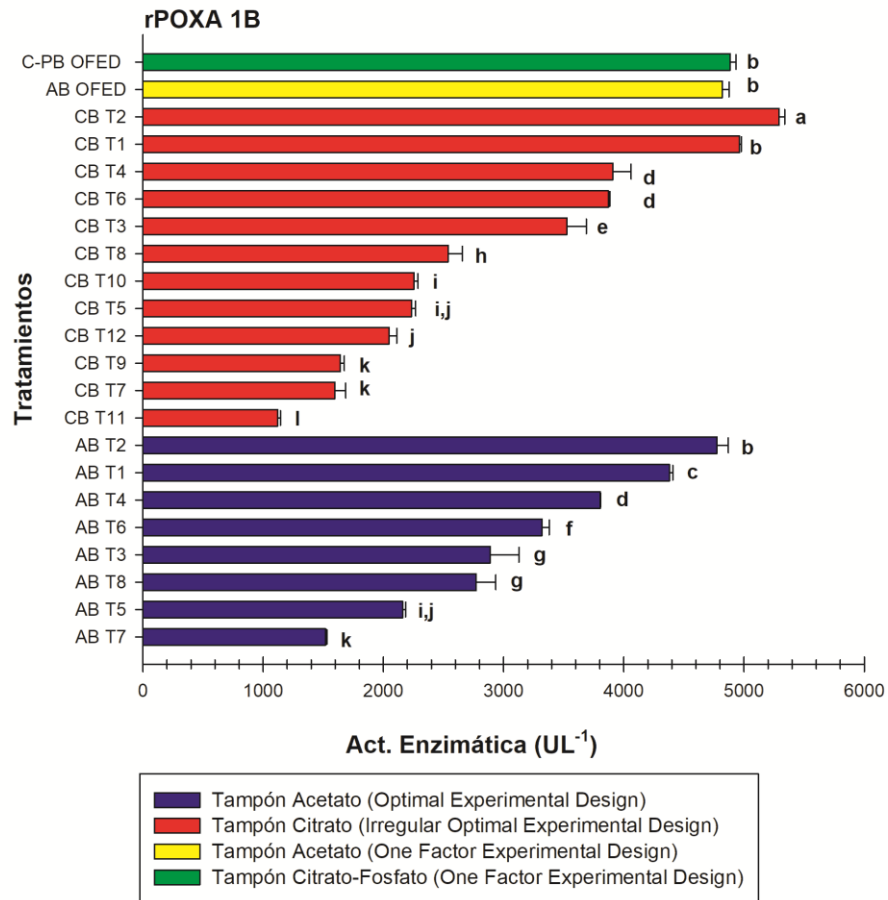


Figura 3.1 Gráfico de comparación de medias utilizando la prueba de Duncan. El gráfico muestra la agrupación de los tratamientos con los valores de actividad enzimática (UL⁻¹) más cercanos.

3.3.4 Análisis de actividad lacasa en tampón Britton-Robinson a pH 3.0 y 4.0 ± 0.2

Debido a que la actividad lacasa mostraba que los pH de 4.0 ± 0.2 en el tampón acetato y 3.0 ± 0.2 en el tampón citrato tenían mayores actividades lacasa, se decidió usar el tampón Britton-Robinson (RB-B) para evaluar la actividad lacasa a esos dos pH. En la Figura 3.2 se observa que RB-B tiene actividades lacasa inferiores a los reportados para los tampones previamente evaluados, con actividades enzimáticas de 1,194.44 ± 55.56 U L⁻¹ usando BR-B pH 3.0 ± 0.2 y 1,583.33 ± 73.49 U L⁻¹ usando BR-B pH 4.0 ± 0.2.

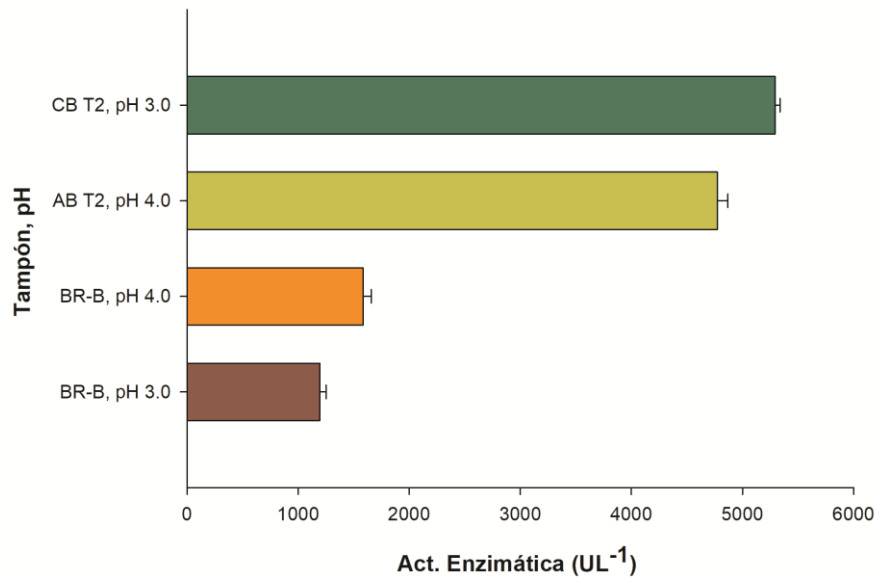


Figure 3.2. Gráfico de la actividad enzimática de rPOXA 1B entre los resultados del tampón Britton-Robinson y las actividades más altas de los tampones AB y CB.

3.3.5 Caracterización cinética de rPOXA 1B en tampón citrato

La [Figura 3.3](#) y la [Tabla 3.6](#) muestran los parámetros cinéticos en tampón citrato del concentrado de la lacasa rPOXA 1B para la oxidación de ABTS usando diferentes concentraciones (0.01, 0.05 0.1, 0.4, 0.5, 0.7, 0.8, 1.5, 2.5, 3.0 mM). Se observa los valores de la velocidad máxima y la afinidad por el sustrato con la constante de Michaelis-Mentes (K_M). Los resultados muestran el efecto positivo del mejor tratamiento (tampón citrato) establecido en el OED y la lacasa recombinante.

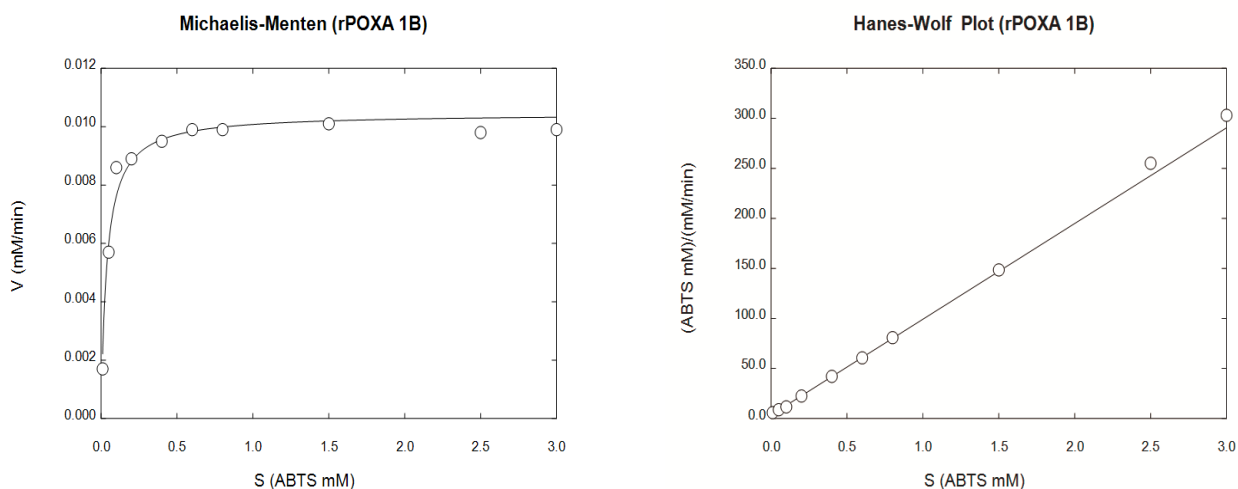


Figura 3.3. Caracterización cinética del sobrenadante con la enzima lacasa rPOXA 1B. Gráfico de Michaelis-Menten. Gráfico de linealización por el método de Hanes-Wolf. Los datos de V_{max} y K_M se encuentran en la [Tabla 3.6](#).

Tabla 3.6 Parámetros cinéticos aparentes de rPOXA 1B en tampón citrato.

Tampón	Parámetros cinéticos aparentes		SEM	Límite de confianza 95%		P
	V_{max} (mM min ⁻¹)	K_m (mM)				
Citrato	V_{max} (mM min ⁻¹)	0.0105	3.24×10^{-4}	0.0097	0.0112	0.000
	K_m (mM)	0.0372	0.00507	0.0256	0.0489	0.000

3.3.6 Modelado por homología y parametrización del centro activo de POXA 1B

A partir de la secuencia de aminoácidos, los servidores evaluados generaron diferentes predicciones de la estructura 3D de POXA 1B. Sin embargo, entre los servidores, las predicciones obtenidas en HHpred y Phyre2 no mostraron un modelo acorde a la distribución de los átomos de cobre del centro activo de la enzima, por lo que se decidió evaluar los diferentes modelos predichos usando el servidor para la modelación comparativa automatizada de estructuras de proteínas 3D SWISS-MODEL (Peitsch 1996; Guez et al., 1997). El SWISS-MODEL template library fue explorado con BLAST (Camacho et al., 2009) y HHblits (Remmert et al., 2011).

Se evaluaron las plantillas para la modelación de POXA 1B y se evaluaron los modelos obtenidos a partir de las plantillas 5Z1X (*Cerreña* sp. RSD1), 5E9N (*Steccherinum murashkinskyi*) y 1GYC (*Trametes versicolor*), encontrando que cada una de las plantillas tuvieron una identidad de 64.12, 62.96 y 62.50 %, respectivamente. Se evaluaron las características del centro activo y se encontró que la plantilla de 1GYC presentaba mejor configuración en el centro activo en el modelo generado (Figura 3.4 A). El modelo obtenido con la plantilla seleccionada obtuvo un QMEAM de 0.80 y un GMQE de 0.87 (Figura 3.4 B y C). La validación de la estructura fue soportada con los puntajes de la estructura del modelo de Saves 5.0, en el cual se observó según el diagrama de Ramachandran que el 88.9 % de los residuos se encontraban en la región más favorable y el 10.6 % en la región permitida (Figura 3.4 D), el score Verify 3D fue de 94.08 %, el score ERRAT fue de 88.7734 y el score de PROVES de 4.1 %.

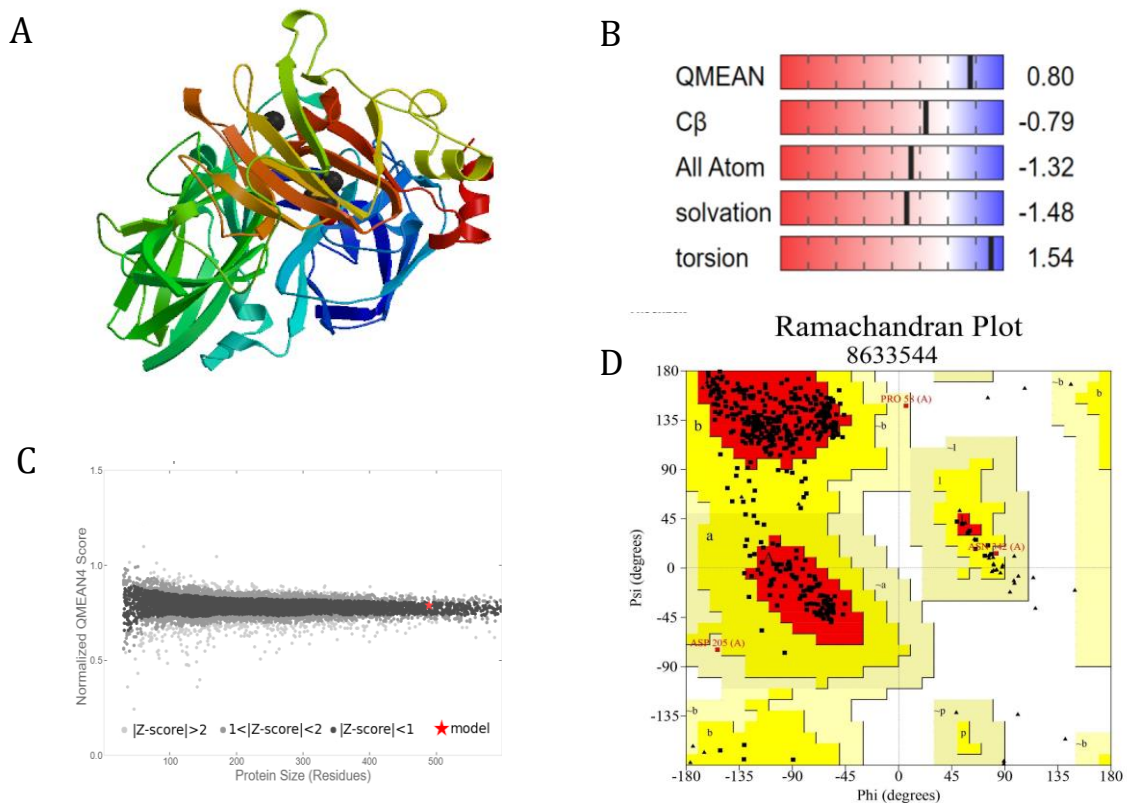


Figura 3.4 Scores QMEAN A) Modelo obtenido por homología de la lacasa POXA 1B de *P. ostreatus* B) Estimación global de la calidad del modelo. C) Comparación con un grupo de estructuras PDB no redundantes y D) Diagrama de Ramachandran del modelo 3D.

En la parametrización del centro activo, el cobre CuT1 se encontró coordinado con las His³⁹⁴, His⁴⁹⁶ y la CYS⁴⁵¹. La distancia entre el CuT1 y el TNC fue de aproximadamente 12 Å. CuT2 se coordinó con las His⁶⁴, His³⁹⁷ y un grupo hidróxido (OH). Los cobres CuT3 se coordinaron con 6 Histidinas (His⁶⁶, His¹⁰⁹, His¹¹¹, His³⁹⁹, His⁴⁵⁰, His⁴⁵²) y un grupo hidróxido (OH) entre el CuT3 α y CuT3 β (Figura 3.5).

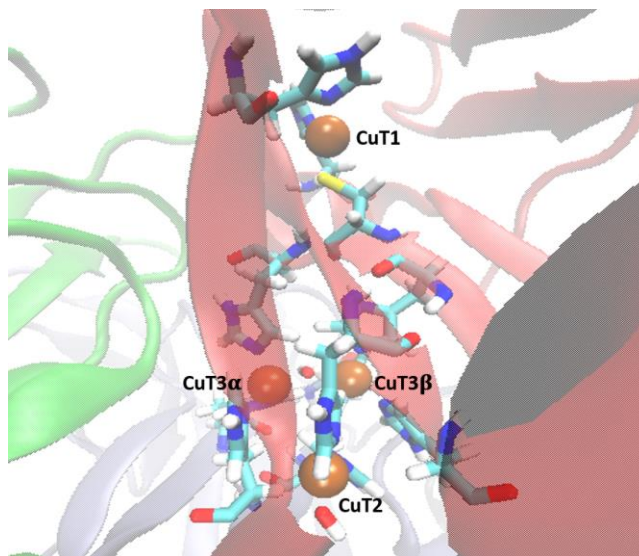


Figura 3.5 Coordinación de los átomos de cobre que conforman el centro activo de POXA1B

3.3.7 Acoplamiento molecular (Docking) entre ABTS y POXA1B

Las 10 simulaciones realizadas presentaron conformaciones ABTS en el bolsillo del CuT1 con un promedio de afinidad de $-6.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabla 3.7). Sin embargo, se seleccionó la conformación 8 de la simulación 1 (Tabla 3.7). La conformación presentó una afinidad de $-6.4 \text{ kcal mol}^{-1}$, se encontraba mejor posicionada en el centro activo y la conformación mostró un cálculo del RMSD de 1.069 con relación al ABTS cristalográfico del 3ZDW (Figura 3.6 A).

La interacción entre el ABTS en el bolsillo de CuT1 del modelo se generó con los residuos VAL¹⁶², SER²⁶⁴, PHE²³⁸, ASN²⁶³, PHE³³⁸, GLY³⁹², PRO³⁹³, HIS³⁹⁴, ILE⁴⁵³ e HIS⁴⁵⁶ (Figura 3.6 B y C). En el análisis con LigPlot se observaron las interacciones hidrofóbicas, que corresponden a los residuos con arcos rojos y radios, además, los residuos GLY³⁹², PRO³⁹³ generaron enlaces de hidrógeno con el N¹⁹ y O⁴⁶ del sustrato ABTS, respectivamente (Figura 3.6).

Tabla 3.7 Valor de la energía de cada configuración obtenida en las simulaciones.

Conformaciones	Simulaciones									
	Afinidad (kcal mol ⁻¹)									
1	-6.8	-6.9	-7.1	-7.0	-7.1	-7.5	-7.3	-7.3	-6.8	-7.0
2	-6.7	-6.9	-7.1	-6.9	-6.8	-6.9	-7.0	-7.3	-6.6	-6.9
3	-6.7	-6.7	-7.0	-6.9	-6.6	-6.8	-6.8	-6.9	-6.5	-6.9
4	-6.6	-6.7	-6.9	-6.8	-6.5	-6.8	-6.8	-6.8	-6.5	-6.9
5	-6.5	-6.7	-6.9	-6.7	-6.5	-6.7	-6.8	-6.7	-6.4	-6.8
6	-6.4	-6.6	-6.8	-6.7	-6.4	-6.7	-6.7	-6.7	-6.4	-6.8
7	-6.4	-6.6	-6.8	-6.6	-6.4	-6.6	-6.6	-6.7	-6.2	-6.8
8	-6.4	-6.6	-6.8	-6.5	-6.3	-6.6	-6.6	-6.6	-6.2	-6.8
9	-6.3	-6.5	-6.7	-6.5	-6.3	-6.5	-6.6	-6.5	-6.2	-6.8

En color azul resalta la conformación 8 de la simulación 1

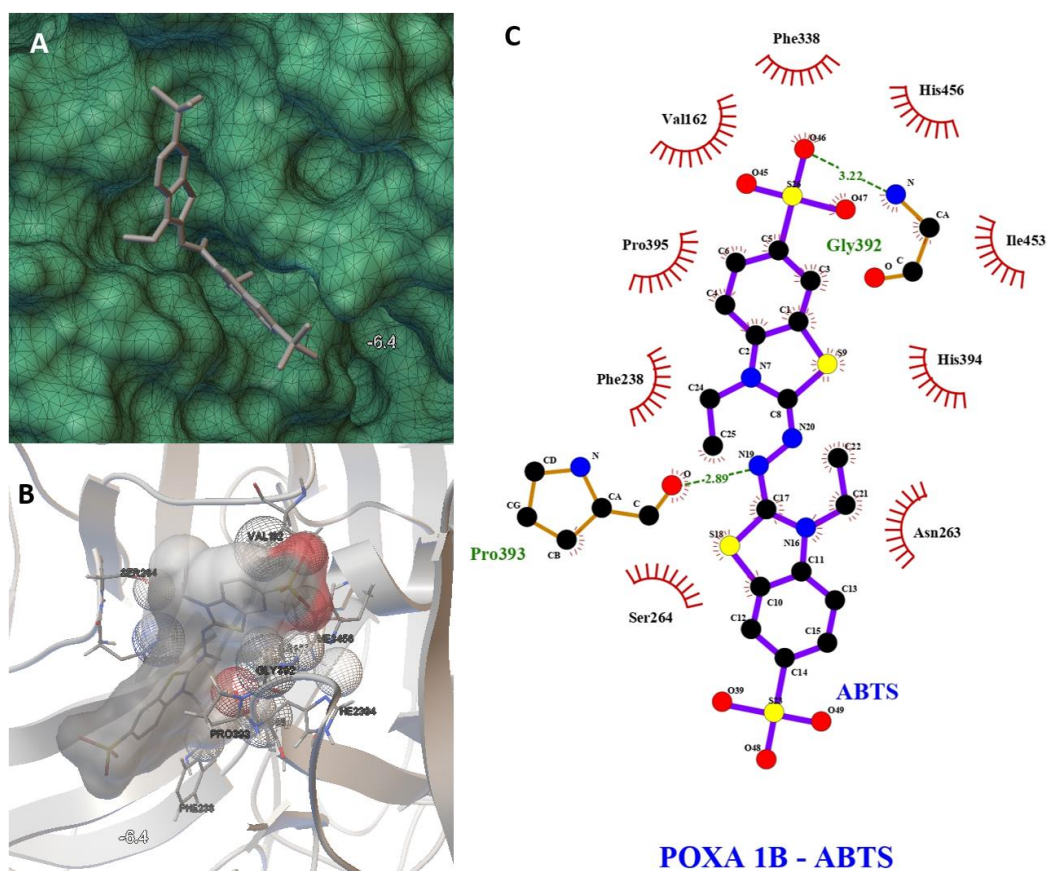


Figura 3.6 Conformaciones e interacciones del ABTS en el bolsillo de CuT1 de la lacasa POXA 1B. A) Diagrama de superficie del acoplamiento ABTS – POXA 1B, B y C) Diagrama 3D y 2D de interacción entre ABTS y POXA 1B.

3.4 Discusión

Se evaluaron diferentes pH de dos tampones muy empleados para medir la actividad lacasa, ya que los tampones que se utilizan en las mediciones de actividad enzimática pueden tener efectos considerables sobre la reacción bioquímica, debido a su interacción con la enzima (Acker and Auld, 2014). Los tampones no sólo controlan el pH, también influyen en la estabilidad proteica a través de mecanismos de estabilización, que influyen sobre la conformación, impactando el comportamiento en las interfaces (Zbacnik *et al.*, 2017).

3.4.1 “Optimal Experimental Design” para tampón acetato y citrato

Los F-valor de 202.14 y 668.49 para tampón acetato y citrato, respectivamente, indican que los modelos fueron significativos y que ambos tienen 0.01 % de probabilidad de que el F-valor ocurra debido a ruido del diseño de experimentos. Para los tampones acetato y citrato el Lack of Fit *p-valor* de 0.09 y 4.11 indican que no fueron significativos en relación con el error puro y que existe 99.78 y 13.61 % de probabilidad de que el valor F del Lack of Fit sea debido al ruido generado en los experimentos, respectivamente. Un Lack of Fit no significativo es positivo para el modelo (Tabla 3.3).

Por otro lado, los resultados en tampón acetato y citrato del R^2 predicho de 0.9774 y 0.9879 son coherentes con el R^2 ajustado de 0.9867 y 0.9954, respectivamente, debido a que la diferencia es inferior 0.2. La precisión Adeq. (mide la relación señal generada por ruido) y un valor superior a 4 es deseable y los resultados de 39.593 y 76.87 en tampón acetato y citrato, respectivamente, indican que la señal es adecuada y que cada modelo puede utilizarse para navegar por el espacio del diseño (Tabla 3.3).

Los factores A-pH, B-Longitud de onda, C-ABTS y las interacciones AB, AC y BC fueron significativos en tampón acetato y citrato, pero la interacción ABC sólo fue significativa en tampón citrato (Tabla 3.3). La alta significancia de los factores, demostró que afecta la medición de la actividad lacasa. Así mismo, el efecto y el porcentaje de contribución

obtenidos para el OED (2^3) – AB, indicó cual era la tendencia (aumento o disminución) del factor para aumentar la detección de la actividad lacasa.

El porcentaje de contribución del pH (53 %) tuvo un efecto negativo (Tabla 3.4), indicando que se debían realizar mediciones de actividad a pH inferiores. En ambos diseños experimentales se observó que el pH ácido favoreció la determinación de la actividad enzimática (Tabla 3.4; Figura 3.1). El pH modifica las interacciones electrostáticas entre los grupos funcionales cargados de los aminoácidos, en consecuencia, generan cambios en la estructura tridimensional de la proteína. Dado que la función de una proteína depende de su estructura, el cambio del pH puede provocar cambios que afectan la función (Ferreira et al., 2015). Eichlerová et al., (2012) encontraron que cuando se detectaba la actividad enzimática de lacasa de *Trametes versicolor* y *Pyricularia* sp., usando como sustrato ABTS la detección máxima de la actividad se obtenía cuando el pH era ácido, específicamente entre 3.0 y 4.0 ± 0.2 , argumentando que la enzima era inhibida por los iones hidroxilo cuando la determinación se hacía a pH básico (Eichlerová et al., 2012).

En las mediciones de actividad lacasa en tampón acetato la mayor actividad enzimática se obtuvo a pH 4.0 ± 0.2 (tratamiento AB T2), (Tabla 3.5; Figura 3.1). Los resultados concuerdan con un estudio previo sobre rPOXA 1B, donde muestran que la enzima es más estable a pH de 4.0 ± 0.2 , (Ardila-Leal et al., 2019). No obstante, la medición de actividad enzimática con tampón acetato usualmente se realiza a pH de 4.5 ± 0.2 , debido a que el tampón tiene una constante de disociación ácida (pKa) de 4.75 ± 0.2 ; pese a esto, el pKa del tampón tiene un efecto estabilizante en un rango de pH entre 3.8 y 5.8 ± 0.2 , lo que permitiría usar el tampón a otros pH. Aun así, algunos autores coinciden en la medición de la actividad enzimática de la lacasa usando el tampón acetato a pH 4.5 ± 0.2 (Gu et al., 2014; Bertrand et al., 2016; Itoh et al., 2016; Morales-Álvarez et al., 2017).

En tampón citrato la determinación de la actividad lacasa fue mayor a pH bajo (3.0 ± 0.2), donde con el tratamiento CB T2 se obtuvo la mayor actividad (Tabla 3.5; Figura

3.1); resultado que concuerda con las condiciones utilizadas en otras investigaciones (Piscitelli et al., 2005; Pezzella et al., 2017; Pinar et al., 2017). Al igual que en tampón acetato, el aumento del pH disminuía la actividad enzimática (4.0 y 4.5 ± 0.2), no obstante, la influencia negativa por el aumento del pH fue mayor con este tampón. La disminución de la actividad enzimática cuando se usó el tampón citrato a pH superior a 3.0 ± 0.2 pudo deberse a que el pH se aleja de las constantes de disociación (pKa) del tampón. Valores de pH superiores al pKa del tampón puede generar la pérdida de protones, ocasionando la disminución de la actividad y modificando la interacción enzima/sustrato (Punekar, 2018); afectando la interacción del ion citrato con el sitio activo (Ferreira et al., 2015).

Diferentes investigaciones han identificado que los iones de los tampones, además, de fijar el pH, también interactúan específicamente con los aminoácidos de la tríada catalítica, interfiriendo así con la catálisis enzimática (Salis and Monduzzi, 2016). El tampón citrato no es la excepción ya que se sabe que el citrato forma complejos con diferentes cationes como el cobre presente en el centro activo de la enzima (Ferreira et al., 2015). El aumento en la concentración de citrato provoca una disminución en la tasa de reacción, debido a la presencia de iones citratos divalentes y trivalentes que aumentan con el pH (Ahmad et al., 2011), haciendo que se obtengan complejos más estables con enlaces más fuertes. La formación de los complejos se inicia a pH 2.5 (H_3CiCu) y la mayor estabilidad del complejo se obtiene a pH 6.0 ($CiCu^{-2}$); justo a este pH todo el ion cúprico se encuentra unido al complejo (Warner and Weber, 1953; Sahbaz and Somer, 1993). En conclusión, la detección de actividad enzimática usando tampón citrato con pH mayores a 3.0, aumenta la concentración y la fuerza de iones citrato quelantes que pueden llegar a cambiar completamente la coordinación del cobre con los residuos conservados de histidina del centro activo de la enzima.

A pesar del efecto negativo del ion citrato, se han reportado mediciones de actividad a pH superiores a 3.0 ± 0.2 . Garg et al. (2012) midieron la actividad enzimática usando tampón citrato a pH 4.0 ± 0.2 (Garg et al., 2012) y Li et al. (2014) en tampón citrato a

pH 4.5 ± 0.2 , con la aclaración de que utilizaron el pH que le confería mayor estabilidad a la enzima recombinante de *Trametes versicolor*, (Li *et al.*, 2014).

La evaluación de la longitud de onda en el diseño experimental con ambos tampones mostró que es un factor muy significativo. Además, el efecto negativo y porcentaje de contribución de 19.90 % en AB, indicó que se debían realizar mediciones a una longitud de onda diferente. No obstante, la longitud de onda para el ABTS debe estar asociado al pico de absorción máximo del radical ABTS⁺. Wolfenden and Willson, (1982) y Childs & Bardsley, (1975) encontraron que la oxidación del ABTS genera un pico máximo de absorción a 420 nm (Childs and Bardsley, 1975; Wolfenden and Willson, 1982). La medición de la actividad enzimática utilizada a una longitud de onda de 436 nm usada por algunos autores (Tinoco *et al.*, 2001; Bertrand *et al.*, 2017; Morales-Álvarez *et al.*, 2017) no se soporta en investigaciones donde demuestren que la oxidación del radical ABTS⁺ tiene el pico de absorción máxima a 436 nm, por lo que se podría estar subestimando la actividad enzimática. Itoh *et al.* (2016) evaluó la actividad enzimática en las longitudes de onda 420 y 436 nm de la lacasa recombinante Lcc2 de *Hericium coralloides* NBRC 7716 en *S. cerevisiae* y destacó que la longitud de onda de 420 nm detecta mejor la oxidación del ABTS, resultados que se asocian directamente a la actividad enzimática (Itoh *et al.*, 2016); lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

La concentración de ABTS fue significativa en ambos tampones, además, tuvo un efecto positivo con 20.73 % de contribución en AB. Los resultados sugirieron que se debían evaluar concentraciones de sustrato superiores a 2 mM de ABTS. Sin embargo, estudios previos confirman que este sustrato ya se encuentra en exceso (Ardila-Leal *et al.*, 2019). En general, a medida que la concentración de sustrato supera la K_M , aumenta la probabilidad de ocupar el sitio activo al competir con un inhibidor. El exceso de sustrato se correlaciona directamente con la intensidad de la señal del ensayo (Childs and Bardsley, 1975; Wolfenden and Willson, 1982; Acker and Auld, 2014) y favorece el sentido de la reacción hacia la formación de producto cuando se trata de una reacción irreversible, al saturar el centro activo de la enzima (Acker and Auld, 2014). Johannes

& Majcherczyk, (2000) demostraron que a bajas concentraciones de ABTS aumenta la absorción del radical ABTS⁺, por lo que sugirieron que, para mantener la absorción constante del radical ABTS⁺ y la actividad enzimática proporcional a la enzima activa, presente en la mezcla de reacción, se deben utilizar concentraciones de ABTS entre 1 y 5 mM (Johannes and Majcherczyk, 2000). En este estudio se utilizó 2 mM de ABTS como concentración máxima, lo que concuerda con Johannes & Majcherczyk, (2000); aunque, generalmente las concentraciones de ABTS usadas en la detección de la actividad lacasa varían entre 0.5 mM y 2.5 mM como se observó en la [Tabla 3.1](#).

3.4.2 Actividad enzimática a pH bajo en tampón acetato y en tampón citrato-fosfato

Los porcentajes de contribución sugirieron la evaluación de otras condiciones de las variables; no obstante, el único factor que realmente podía ser modificado para la detección de la actividad enzimática era el pH, ensayando valores más bajos. Por esta razón se evaluó la actividad enzimática con tampón acetato a pH 3.6 ± 0.2 y tampón citrato-fosfato a pH 2.6 ± 0.2 . La actividad de rPOXA 1B en el tratamiento CB OFED alcanzó $4884.26 \pm 48.78 \text{ UL}^{-1}$, con diferencias significativas a los resultados obtenidos en el en el tratamiento CB T2 ($5291.67 \pm 45.83 \text{ UL}^{-1}$), ([Figura 3.1](#)). La disminución del pH cuando se usó el tampón citrato-fosfato no demostró una diferencia significativa, por lo que se podría atribuir el resultado entre el buffer CB y CB OFED a la composición de la base (citrato de sodio en CB y fosfato en CB OFED) que causan la formación de diferentes iones. En el buffer CB OFED se pueden generar iones fosfato que tienen la capacidad de formar complejos con iones esenciales para la enzima, lo que podría afectar la determinación de la actividad enzimática ([Bisswanger, 2014](#)).

3.4.3 Actividad enzimática a pH 3.0 y 4.0 en el tampón Britton-Robinson

La actividad lacasa usando el tampón Britton-Robinson demostró que a pH 4.0 la actividad enzimática es mayor. El tampón Britton-Robinson no es usualmente utilizado para la detección de actividad lacasa, sino para la evaluación de la estabilidad de la enzima ([Morales-Álvarez et al., 2016](#); [Ardila-Leal et al., 2019](#)). En general los tampones

universales son considerados inadecuados para medir las actividades enzimáticas debido a que tienen compuestos que interactúan desfavorablemente con proteínas, o quelan iones metálicos que son necesarios para la estructura y función de las enzimas (Ellis, 1961; Brooke *et al.*, 2015). En general, un amplio número de tampones generan diferentes interacciones con las proteínas que puede afectar la actividad enzimática. La formación de complejos pueden generar estructuras estabilizantes o desestabilizantes entre el tampón y los sitios de unión a metales y cada respuesta es controlada por la concentración de los tampones, el tipo de tampón y los pH a los que son evaluados (Sokołowska *et al.*, 2010).

3.4.4 Caracterización cinética de rPOXA 1B en tampón citrato

La caracterización cinética de la lacasa rPOXA 1B medida en la condición de mayor actividad enzimática (Figura 3.3) se comparó con la actividad utilizada en el laboratorio de acuerdo con la técnica de Tinoco *et al.*, (2001) y se comprobó el cambio de la afinidad de la enzima por el sustrato, pasando en la V_{max} de 0.0316 a 0.0105 mM min⁻¹ y en la K_M de 1.716 a 0.0372 mM con tampón acetato y citrato, respectivamente, (Ardila-Leal *et al.*, 2019). La constante de Michaelis-Menten de la lacasa POXA 1B fue evaluada por Giardina *et al.*, (1999), encontrando un valor K_M de 0.37 mM, no obstante, para esa medición los investigadores usaron el tampón citrato/fosfato de McIlvaine (Giardina *et al.*, 1999).

3.4.5 Modelado de POXA 1B por homología y parametrización del centro activo

La similitud de secuencia no es el único factor que determina la precisión de las estructuras 3D generadas por homología. El límite mínimo de similitud de secuencia en el modelado de homología debe ser 25 % (Muhammed and Aki-Yalcin, 2019), pero como regla general dos secuencias son homólogas si son idénticas en más del 30 % en toda su longitud. No obstante, las secuencias homólogas que comparten más del 40 % de identidad se consideran similares funcionalmente (Pearson, 2013). En las tres plantillas evaluadas el valor de la identidad fue mayor al 60 %. Los scores de QMEAN y

GMQE fueron cercanos a 1, lo que significa que el modelo propuesto es de alta calidad y que presenta una homología funcional alta.

La estructura 3D generada de POXA 1B tuvo una calidad estereoquímica alta, basada en el porcentaje de residuos en las regiones centrales en el diagrama de Ramachandran (Figura 3.4 D), el valor score de Verify indicó que el 94.08 % de los átomos del modelo 3D son compatibles con la secuencia, el score ERRAT fue adecuado, los modelos de proteínas pronosticados con factor de calidad > 50 % indican que los modelos de homología son estables y confiables (Kameshwar *et al.*, 2018) y el score PROVES fue aceptado al no superar el 5 %.

Nuestro grupo de investigación en una publicación anterior había desarrollado un modelo de POXA 1B utilizando el templete 1GYC (Rivera-Hoyos *et al.*, 2015). Sin embargo, se decidió afinar y mejorar el modelo, utilizando la herramienta semiautomática MCPB.py de Amber18, para la parametrización de moléculas con iones metálicos, ya que los complejos metálicos pueden tener varios modos de coordinación (Merza and Cho, 2005), que son importantes para los análisis de dinámica molecular.

3.4.6 Acoplamiento molecular (Docking) entre ABTS y POXA1B

AutoDock Vina es un método rápido y preciso de herramientas de acoplamiento de proteínas ligando, es usada para determinar afinidades de unión de moléculas pequeñas y para predecir poses de unión de grandes sustratos a objetivos de proteínas debido a sus sólidas capacidades informáticas (Nguyen *et al.*, 2020), en donde el número de los residuos implicados con la unión del sustrato depende del tamaño del sustrato y de la conformación del sustrato/enzima (Christensen and Kepp, 2013). La Figura 3.6 A muestra la forma que adquiere el ABTS en el bolsillo del CuT1. La conformación obtuvo un RMSD de 1.069 que al ser inferior a 2 Å indica que tiene una conformación estable. La configuración adoptada por el ABTS también concuerda con el obtenido por Enguita *et al.* (2004), quien obtuvo el ABTS con forma de U, en donde la sección más profunda se encuentra muy cerca de la HIS⁴⁹⁷ del cobre T1 (Enguita *et al.*,

2004). En la [Figura 3.6 D](#) se observa que el sitio de torción que permite la conformación en U en el ABTS se encuentra cerca de la HIS³⁹⁴ ([Figura 3.6 B](#)).

La energía libre de unión en todos los resultados fue negativa. La energía libre de unión negativa refleja que la degradación sustrato es espontánea y a menor energía de unión entre la enzima y el sustrato, se favorece la interacción de la enzima con el mismo, resultando en su degradación u oxidación ([Hongyan *et al.*, 2019](#)). Un análisis de acoplamiento molecular realizado por [Rivera-Hoyos *et al.* \(2014\)](#) entre ABTS y POXA 1B obtuvo una energía libre de unión de $-4.15 \text{ kcal mol}^{-1}$, resultado inferior al obtenido en esta investigación, el cual fue de $-6.4 \text{ kcal mol}^{-1}$. Aunque el método para calcular el acoplamiento molecular en cada investigación fue diferentes, se podría considerar que la parametrización del centro activo de la enzima y a los análisis del acoplamiento a pH 3.0 como parte de la estrategia que permitió mejorar la afinidad entre el ABTS y POXA 1B.

Los enlaces de hidrógeno y los contactos hidrófobos son necesarios para las interacciones entre la enzima y el sustrato, debido a que confieren estabilidad y permiten la oxidación del sustrato (ABTS) ([Liu *et al.*, 2018](#); [Hongyan *et al.*, 2019](#)). El grupo de residuos que se encuentra próximos a CuT1 se caracterizan por ser principalmente hidrófobos, evitando la interacción del agua con el Cu y facilitando la interacción del sustrato hidrófobo con el centro activo de la enzima ([Cambria *et al.*, 2010](#)), demostrando la importancia de las interacciones hidrofóbicas observadas en el análisis con LigPlot ([Figura 3.4 C](#)). No obstante, los aminoácidos polares también interactúan en los sitios activos de lacasas ([Kadam *et al.*, 2018](#)). En el acoplamiento se encuentra ASN²⁶³ y las HIS³⁹⁴ y HIS⁴⁵⁶ que se unen a CuT1. Los aminoácidos polares tienen un gran papel en la interacción con el agua y las moléculas acuosas y los aminoácidos polares básicos como HIS tienen una cadena lateral básica que acepta protones, los cuales son fundamentales para la oxidación del sustrato ([Kadam *et al.*, 2018](#)).

En los acoplamientos entre lacasas y ABTS la carga en Cu T1 cambia ligeramente la energía de interacción electrostática entre el ABTS cargado negativamente y el CuT1 cargado positivamente. Un sitio CuT1 oxidado representa el estado de la proteína activa que puede extraer un electrón de ABTS. Además, se ha sugerido que algunos residuos del bolsillo CuT1 son importantes debido a que ayudan a reconocer y arrastrar sustratos aromáticos con grupos hidroxilo y amino al bolsillo CuT1 (Christensen and Kepp, 2013). Uno de los aminoácidos importantes que contribuye a la formación de enlaces de hidrogeno con el sulfonato de oxígeno del ABTS ha sido la GLY, en esta investigación se observó la formación del enlace de hidrogeno entre GLY³⁹² - O⁴⁶. Enguita et al. (2004) encontró que dicho enlace de hidrogeno era formado con la GLY³²³ (Enguita et al., 2004) y Hildén et al., (2013) encontró que la GLY³⁹² estaba ubicada en la región de unión con el sustrato, pero que no determinaba la participación real del residuo (Hildén et al., 2013). No obstante, la interacción de este residuo depende de las características del sustrato (Mehra et al., 2018).

Christensen y Kepp, (2014) identificó la ASP²⁰⁶ como el residuo más importante para el reconocimiento de sustratos aromáticos con grupos hidroxilo y/o amino en el bolsillo CuT1, pero es afectado por el pH y cuando se encuentra protonado (pH 3), el residuo no acepta enlaces de hidrógeno (Christensen and Kepp, 2013), lo que explica porque este residuo no fue señalado como importante en los residuos que interaccionan con el ABTS en el acoplamiento. Mehra et al (2018) observaron que la variación de los residuos que participan en la interacción enzima sustrato depende en gran medida del sustrato y de la enzima acoplada, por lo que los análisis con múltiples sustratos podrían ayudar a entender el rol de los diferentes residuos (Mehra et al., 2018).

Por otra parte la dinámica molecular (MD) del acoplamiento POXA 1B/ABTS permitiría conocer cuáles son los residuos que mantienen estables las interacciones entre la enzima y el sustrato para que ocurra la oxidación de este último a pH 3.0. No obstante, para identificar como es la interacción enzima/sustrato y acercarnos al comportamiento real del complejo en presencia de tampón citrato, se debería estudiar

este acoplamiento cuando los iones de cobre de la enzima están bajo la influencia del ión presente en el tampón usado en la determinación de la actividad enzimática.

3.5 Conclusiones

Se demostró que las condiciones para la medición de la actividad lacasa están influenciada por el tampón (iones), el pH, la concentración de ABTS y la longitud de onda. La condición estandarizada para la detección de actividad lacasa rPOXA 1B correspondió a tampón Citrato a pH 3.0 ± 0.2 , longitud de onda 420 nm y concentración de ABTS de 2mM. La cinética de la lacasa rPOXA 1B en el tampón citrato estandarizado mostró disminución en el valor K_M ; lo que implica que las condiciones estandarizadas con tampón citrato, aumentaron la afinidad por el ABTS, en comparación con los parámetros cinéticos obtenidos en con tampón Acetato. En la parametrización del centro activo de POXA 1B, los cuatro cobres coordinaron con los residuos HIS³⁹⁴, HIS⁴⁹⁶, CYS⁴⁵¹, HIS⁶⁴, HIS³⁹⁷, HIS⁶⁶, HIS¹⁰⁹, HIS¹¹¹, HIS³⁹⁹, HIS⁴⁵⁰, HIS⁴⁵², similar a los residuos que se han reportado coordinando con cobre para otras lacasas. El acoplamiento del ABTS con la enzima POXA 1B demostró que las interacciones entre están sujetas a la conformación del bolsillo de unión al sustrato, en donde algunas conformaciones pueden tener mejor energía libre de unión, pero la conformación no es comparable con la encontrada en una estructura real. Los aminoácidos en el bolsillo de unión al CuT1 estaba conformado por algunos residuos previamente identificados como esenciales para la interacción enzima/sustrato, además, se comprobaron los residuos que participan en las interacciones hidrofóbicas y que ejercen acción de protección al CuT1. Se identificó la GLY³⁹³ que forma puente de hidrógeno con el ABTS; lo que ha sido reportado como relevante en el bolsillo de unión al sustrato.

3.6 Referencias

- Acker, M.G. and D.S. Auld, (2014). Considerations for the design and reporting of enzyme assays in high-throughput screening applications. **Perspectives in Science**, 1: 56-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pisc.2013.12.001>
- Ahmad, I., M.A. Sheraz, S. Ahmed, S.H. Kazi, T. Mirza, *et al.*, (2011). Stabilizing effect of citrate buffer on the photolysis of riboflavin in aqueous solution. **Results in Pharma Sciences**, 1: 11-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rinphs.2011.06.002>
- Alzate-Morales, J.H., R. Contreras, A. Soriano, I. Tuñón and E. Silla, (2007). A Computational Study of the Protein-Ligand Interactions in CDK2 Inhibitors: Using Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Interaction Energy as a Predictor of the Biological Activity. **Biophysical Journal**, 92: 430-439. <http://doi.org/10.1529/biophysj.106.091512>
- Ardila-Leal, L.D., D.A. Albarracín-Pardo, C.M. Rivera-Hoyos, E.D. Morales, R.A. Poutou-Piñales, *et al.*, (2019). Media improvement for 10 L bioreactor production of rPOXA 1B laccase by *P. pastoris*. **3Biotech**, 9 (12): Article 447. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-019-1979-y>
- Balcázar-López, E., L.H. Méndez-Lorenzo, R.A. Batista-García, U. Esquivel-Naranjo, M. Ayala, *et al.*, (2016). Xenobiotic Compounds Degradation by Heterologous Expression of a *Trametes sanguineus* Laccase in *Trichoderma atroviride*. **Plos One**, 11 (2): e0147997. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0147997>
- Benkert, P., T. Schwede and S.C. Tosatto, (2009). QMEANclust: estimation of protein model quality by combining a composite scoring function with structural density information. **BMC Structural Biology**, 9: 35. 10.1186/1472-6807-9-35
- Benkert, P., S.C.E. Tosatto and D. Schomburg, (2008). QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. **Proteins**, 71 (1): 261-277.
- Bertrand, B., F. Martínez-Morales and M.I.R. Trejo-Hernandez, (2017). Upgrading laccase production and biochemical properties: Strategies and challenges. **Biotechnology Progress**, 33 (4): 1015-1034. <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.2482>
- Bertrand, B., K. Mayolo-Deloisa, M. González-González, R. Tinoco-Valencia, L. Serrano-Carreón, *et al.*, (2016). *Pleurotus ostreatus* laccase recovery from residual compost using aqueous twophase systems. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, IN PRESS:
- Bisswanger, H., (2014). Enzyme assays. **Perspectives in Science**, 1: 41-55. <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>
- Bronikowski, A., P.L. Hagedoorn, K. Koschorreck and V.B. Urlacher, (2017). Expression of a new laccase from *Moniliophthora roreri* at high levels in *Pichia pastoris* and its potential application in micropollutant degradation. **AMB Express**, 7: 73.
- Brooke, D., N. Movahed and B. Bothner, (2015). Universal buffers for use in biochemistry and biophysical experiments. **AIMS Biophysics**, 2 (3): 336-342. <http://doi.org/10.3934/biophy.2015.3.336>
- Camacho, C., G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, *et al.*, (2009). BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, 10: 421. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>

- Cambria, M., D. Marino, M. Falconi, S. Garavaglia and A. Cambria, (2010). Docking simulation and competitive experiments validate the interaction between the 2,5-Xylidine inhibitor and *Rigidoporus lignosus* laccase. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 27 (4): 501-509.
- Case, D.A., K. Belfon, I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, *et al.*, (2020) AMBER 2020. University of California, San Francisco.
- Childs, R.E. and W.G. Bardsley, (1975). The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazoline- 6-sulphonic acid) as chromogen. **Biochemical Journal**, 145: 93-103.
- Christensen, N.J. and K.P. Kepp, (2013). Stability Mechanisms of a Thermophilic Laccase Probed by Molecular Dynamics. **Plos One**, 8 (4): e61985. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061985>
- Dwivedi, U.N., P. Singh, V.P. Pandey and A. Kumar, (2011). Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 68: 117–128. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.002>
- Eichlerová, I., J. Šnajdr and P. Baldrian, (2012). Laccase activity in soils: Considerations for the measurement of enzyme activity. **Chemosphere**, 88: 1154-1160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.03.019>
- Ellis, D.A., (1961). A new universal buffer system. **Nature**, 191: 1099-1100.
- Enguita, F.J., D. Marcal, L. Martins, R. Grenha, A. Henriques, *et al.*, (2004). Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from *Bacillus subtilis*. **Journal of Biological Chemistry**, 279 (22): 23472–23476.
- Ferreira, C.M.H., I.S.S. Pinto, E.V. Soares and H.M.V.M. Soares, (2015). (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions – a review. **RSC Advances**, 5: 30989-31003. <http://doi.org/10.1039/c4ra15453c>
- Frisch, M.J., G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, *et al.*, (2016) Gaussian, Inc. Wallingford CT, .
- Garg, N., N. Bieler, T. Kenzom, M. Chhabra, M. Ansorge-Schumacher, *et al.*, (2012). Cloning, sequence analysis, expression of *Cyathus bulleri* laccase in *Pichia pastoris* and characterization of recombinant laccase. **BMC Biotechnology**, 12: 75.
- Giardina, P., V. Faraco, C. Pezzella, A. Piscitelli, S. Vanhulle, *et al.*, (2010). Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 67: 369-385. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-009-0169-1>
- Giardina, P., G. Palmieri, A. Scaloni, B. Fontanella, V. Faraco, *et al.*, (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical Journal**, 341: 655-663.
- Gu, C., F. Zheng, L. Long, J. Wang and S. Ding, (2014). Engineering the Expression and Characterization of Two Novel Laccase Isoenzymes from *Coprinus comatus* in *Pichia pastoris* by Fusing an Additional Ten Amino Acids Tag at N-Terminus. **Plos One**, 9 (4): e93912. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093912>
- Hakulinen, N. and J. Rouvinen, (2015). Three-dimensional structures of laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 72: 857-868. <http://doi.org/10.1007/s00018-014-1827-5>

- Handing, K.B., E. Niedzialkowska, I.G. Shabalina, M.L. Kuhn, H. Zheng, *et al.*, (2018). Characterizing metal-binding sites in proteins with X-ray crystallography. **Nature Protocols**, 13 (5): 1062-1090. <http://doi.org/10.1038/nprot.2018.018>
- Hildén, K., M.R. Mäkelä, T. Lundell, J. Kuuskeri, A. Chernykh, *et al.*, (2013). Heterologous expression and structural characterization of two low pH laccases from a biopulping white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 97: 1589-1599. <http://doi.org/10.1007/s00253-012-4011-6>
- Hongyan, L., Z. Zexiong, X. Shiwei, X. He, Z. Yinian, *et al.*, (2019). Study on transformation and degradation of bisphenol A by *Trametes versicolor* laccase and simulation of molecular docking. **Chemosphere**, 224: 743-750. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.143>
- Huang, L., Y. Liu, X. Liu, L. Ban, Y. Wang, *et al.*, (2016). Functional expression of *Trametes versicolor* thermotolerant laccase variant in *Pichia pastoris*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 30 (2): 261-269. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2015.1134278>
- Huang, S.-Y. and X. Zou, (2010). Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. **International Journal of Molecular Sciences**, 11: 3016-3034. <http://doi.org/10.3390/ijms11083016>
- Huifang, X., Q. Li, M. Wang and L. Zhao, (2013). Production of a recombinant laccase from *Pichia pastoris* and biodegradation of chlorpyrifos in a laccase/vanillin system. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 23 (6): 864-871.
- Itoh, N., S. Takagi, A. Miki and J. Kurokawa, (2016). Characterization and cloning of laccase gene from *Hericium coralloides* NBRC 7716 suitable for production of epigallocatechin gallate 3-O-gallate. **Enzyme and Microbial Technology**, 82: 125-132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.09.004>
- Johannes, C. and A. Majcherczyk, (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. **Applied and Environmental Microbiology**, 66 (2): 524-528.
- Jones, S.M. and E.I. Solomon, (2015). Electron Transfer and Reaction Mechanism of Laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 72 (5): 869-883. <http://doi.org/10.1007/s00018-014-1826-6>
- Kadam, S.K., A.S. Tambolia, S.B. Sambhare, B.-H. Jeon and S.P. Govindwar, (2018). Enzymatic analysis, structural study and molecular docking of laccase and catalase from *B. subtilis* SK1 after textile dye exposure. **Ecological Informatics**, 48: 269-280. <http://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2018.10.003>
- Kameshwar, A.K.S., R. Barber and W. Qin, (2018). Comparative modeling and molecular docking analysis of white, brown and soft rot fungal laccases using lignin model compounds for understanding the structural and functional properties of laccases. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 79: 15-26. <http://doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.10.019>
- Komori, H. and Y. Higuchi, (2010). Structure and molecular evolution of multicopper blue proteins. **BioMol Concepts**, 1: 31-40. <http://dx.doi.org/10.1515/BMC.2010.004>
- Li, P. and K.M. Merz, (2016). MCPB.py: A Python Based Metal Center Parameter Builder. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 56 (4): 599-604. <http://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00674>

- Li, Q., L. Ge, J. Cai, J. Pei, J. Xie, *et al.*, (2014). Comparison of Two Laccases from *Trametes versicolor* for Application in the Decolorization of Dyes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24 (4): 545-555. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1310.10079>
- Lin, Y., Z. Zhang, Y. Tian, W. Zhao, B. Zhu, *et al.*, (2013). Purification and characterization of a novel laccase from *Coprinus cinereus* and decolorization of different chemically dyes. **Molecular Biology Reports**, 40 (2): 1487-1494. DOI 10.1007/s11033-012-2191-x
- Liu, D., B. Xie, C. Dong, G. Liu, D. Hu, *et al.*, (2018). Effect of fertilizer prepared from human feces and straw on germination, growth and development of wheat. **Acta Astronautica**, 145: 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2018.01.014>
- Maier, J.A., C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K. Hauser, *et al.*, (2015). ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 11 (8): 3696-3713. <http://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>
- Martínez-Sotres, C., J.G. Rutiaga-Quiñones, R. Herrera-Bucio, M. Gallo and P. López-Albarrán, (2015). Molecular docking insights into the inhibition of laccase activity by medicarpin. **Wood Science Technology**, 49: 857-868.
- Mehra, R., J. Muschiol, A.S. Meyer and K.P. Kepp, (2018). A structural-chemical explanation of fungal laccase activity. **Scientific Report**, 8: 17285. <http://doi.org/10.1038/s41598-018-35633-8>
- Meng, X.-Y., H.-X. Zhang, M. Mezei and M. Cui, (2011). Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Current Computer-Aided Drug Design**, 7 (2): 146-157. <http://doi.org/10.2174/157340911795677602>
- Merza, J.F. and M.K. Cho, (2005). What are gene patents and why are people worried about them? **Community Genetics**, 8 (4): 203-208. <http://dx.doi.org/10.1159/000087956>
- Morales-Álvarez, E.D., C.M. Rivera-Hoyos, Á.M. Cardozo-Bernal, R.A. Poutou-Piñales, A.M. Pedroza-Rodríguez, *et al.*, (2017). Plackett-Burman Design for rGILCC1 laccase activity enhancement in *Pichia pastoris*: Concentrated enzyme kinetic characterization. **Enzyme Research**, 2017: Article ID 5947581. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/5947581>
- Morales-Álvarez, E.D., C.M. Rivera-Hoyos, N. González-Ogliastri, R. Rodríguez-Vázquez, R.A. Poutou-Piñales, *et al.*, (2016). Partial removal and detoxification of Malachite Green and Crystal Violet from laboratory artificially contaminated water by *Pleurotus ostreatus*. **Universitas Scientiarum**, 21 (3): 259-285. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.SC21-3.prad>
- Muhammed, M.T. and E. Aki-Yalcin, (2019). Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. **Chemical Biology and Drug Design**, 93: 12-20. <http://doi.org/10.1111/cbdd.13388>
- Nguyen, N.T., T.H. Nguyen, T.N.H. Pham, N.T. Huy, M.V. Bay, *et al.*, (2020). Autodock Vina Adopts More Accurate Binding Pose but Autodock4 Forms Better Binding Affinity. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 60 (1): 204-211. <http://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00778>

- Pardo, I. and S. Camarero, (2015). Laccase engineering by rational and evolutionary design. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 72: 897-910. <http://doi.org/10.1007/s00018-014-1824-8>
- Pearson, W.R., (2013). An Introduction to sequence similarity (“Homology”) searching. **Current Protocols in Bioinformatics**, Chapter 3:Unit3.1: <http://dx.doi.org/110.1002/0471250953.bi0301s42>.
- Pezzella, C., V.G. Giacobelli, V. Lettera, G. Olivieri, P. Cicatiello, *et al.*, (2017). A step forward in laccase exploitation: recombinant production and evaluation of techno-economic feasibility of the process. **Journal of Biotechnology**, 259: 175-181. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jbiotec.2017.07.022>
- Pietra, F., (2016). On Dioxygen Permeation of MaL Laccase from the Thermophilic Fungus *Melanocarpus albomyces*: An all-Atom Molecular Dynamics Investigation. **Chemistry and Biodiversity**, 13 (11): 493-1501. <http://doi.org/10.1002/cbdv.201600062>
- Pinar, O., C. Tamerler and A.Y. Karataş, (2017). Heterologous expression and characterization of a high redox potential laccase from *Corioloropsis polyzona* MUCL 38443. **Turkish Journal of Biology**, 41: 278-291. <http://doi.org/10.3906/biy-1605-51>
- Piscitelli, A., P. Giardina, C. Mazzoni and G. Sannia, (2005). Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 69: 428-439.
- Punekar, N.S., (2018) Enzymes: catalysis, kinetics and mechanisms. Springer Nature, Singapore.
- Remmert, M., A. Biegert, A. Hauser and J. Söding, (2011). HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMMhmm-alignment. **Nature Methods**, 9 (2): 173-175. <http://doi.org/10.1038/nmeth.1818>.
- Reynolds III, J.E., M. Josowicz, R.B. Vegh and K.M. Solntsev, (2013). Spectral and redox properties of the GFP synthetic chromophores as a function of pH in buffered media. **Chemical Communications**, 49 (71): 7788-7790. <http://dx.doi.org/10.1039/C3CC44113J>
- Rivera-Hoyos, C.M., (2016). Expresión y producción de una lacasa recombinante de *Pleurotus ostreatus* como alternativa para el tratamiento de los subproductos líquidos que se obtienen en el proceso de blanqueamiento de pulpa de celulosa. Poutou-Piñales, R.A. and Pedroza-Rodríguez, A.M., Tesis de Doctorado. Pontificia Universidad Javeriana.
- Rivera-Hoyos, C.M., E.D. Morales-Álvarez, R.A. Poutou-Piñales, A.M. Pedroza-Rodríguez, R. Rodríguez-Vázquez, *et al.*, (2013). Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, 27 (3-4): 67-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2013.07.001>
- Rivera-Hoyos, C.M., E.D. Morales-Álvarez, S.A. Poveda-Cuevas, E.A. Reyes-Guzmán, R.A. Poutou-Piñales, *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): e0116524. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116524.g002>
- Sáenz, H., L. Lareo, R.A. Poutou, C. Sosa and L.A. Barrera, (2007). Predicción computacional de la estructura terciaria de la iduronato 2-sulfato sulfatasa humana. **Biomédica**, 27 (1): 7-20.

- Sáenz-Suárez, H., A. Chávez-Zobbel, L.R. Lareo, C. Oribio-Quinto and J. Martínez-Mendoza, (2011). Predicción computacional de estructura terciaria de las proteínas humanas Hsp27, α B-cristalina y HspB8. **Universitas Scientiarum**, 16 (1): 15-28.
- Sahbaz, F. and G. Somer, (1993). The effect of citrate anions on the kinetics of cupric ion-catalysed oxidation of ascorbic acid. **Food Chemistry**, 47: 345-349.
- Salis, A. and M. Monduzzi, (2016). Not only pH. Specific buffer effects in biological systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 23: 1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2016.04.004>
- Sokołowska, M., K. Pawlas and W. Bal, (2010). Effect of Common Buffers and Heterocyclic Ligands on the Binding of Cu(II) at the Multimetal Binding Site in Human Serum Albumin. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, 2010: Article ID 725153. <http://doi.org/10.1155/2010/725153>
- Theerachat, M., D. Guieysse, S. Morel, M. Remaud-Siméon and W. Chulalaksananukul, (2019). Laccases from Marine Organisms and Their Applications in the Biodegradation of Toxic and Environmental Pollutants: a Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 187 (2): 583-611. <http://doi.org/10.1007/s12010-018-2829-9>
- Tian, W., C. Chen, X. Lei, J. Zhao and J. Liang, (2018). CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. **Nucleic Acids Research**, 46: W363-W367. <http://doi.org/10.1093/nar/gky473>
- Tinoco, R., M.A. Pickard and R. Vazquez-Duhalt, (2001). Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. **Letters in Applied Microbiology**, 32 (5): 331-335. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00913.x>
- Tonin, F., R. Melis, A. Cordes, A. Sanchez-Amat, L. Pollegioni, *et al.*, (2016). Comparison of different microbial laccases as tools for industrial uses. **New Biotechnology**, 33 (3): 387-398. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2016.01.007>
- Trott, O. and A.J. Olson, (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, 31 (2): 455-461. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Wallace, A.C., N. Borkakoti and J.M. Thornton, (1997). TESS: A geometric hashing algorithm for deriving 3D coordinate templates for searching structural databases. Application to enzyme active sites. **Protein Science**, 6: 2308-2323.
- Warner, R.C. and I. Weber, (1953). The cupric and ferric citrate complexes. **Journal of American Chemistry Society**, 75 (20): 5086-5094. <http://doi.org/10.1021/ja01116a055>
- Wolfenden, B.S. and R.L. Willson, (1982). Radical-cations as Reference Chromogens in Kinetic Studies of Oneelectron Transfer Reactions : Pulse Radiolysis Studies of 2,2'-Azinobisethyl benzthiazoline-6-sulphonate). **Journal of The Chemical Society-perkin Transactions** 2, (7): 805-812. <http://doi.org/10.1039/P29820000805>
- Wong, K.-S., M.-K. Cheung, C.-H. Au and H.-S. Kwan, (2013). A Novel *Lentinula edodes* Laccase and Its Comparative Enzymology Suggest Guaiacol-Based Laccase Engineering for Bioremediation. **Plos One**, 8 (6): e66426. doi:10.1371/journal.pone.0066426

- Zárate-Bonilla, L.J., P. del Portillo, H. Sáenz-Suárez, G.-S. Janneth, G.E. Barreto-Sampaio, *et al.*, (2014). Computational modeling and preliminary *iroN*, *fepA*, *cirA* gene expression in *Salmonella* Enteritidis under iron deficiency induced conditions. **Poultry Science**, 93 (1): 221-230. <http://doi.org/10.3382/ps.2012-02993>
- Zbacnik, T.J., R.E. Holcomb, D.S. Katayama, B.M. Murphy, R.W. Payne, *et al.*, (2017). Role of Buffers in Protein Formulations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 106 (3): 713-733. <http://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.11.014>
- Zheng, F., Q. An, G. Meng, X.-J. Wu, Y.-C. Dai, *et al.*, (2017). A novel laccase from white rot fungus *Trametes orientalis*: Purification, characterization, and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, 102: 758-770. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.089>
- Zhou, Y.P., Q.H. Chen, Y.N. Xiao, D.S. Ke and C.E. Tian, (2014). Gene Cloning and Characterization of a Novel Laccase from the Tropical White-Rot Fungus *Ganoderma weberianum* TZC11. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 50 (5): 500-507.

Capítulo 4. Producción de rPOXA 1B en biorreactor de 10 L usando medio previamente mejorado

Abreviaturas

ABTS:	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
GAPDH:	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa conocida como
GFP:	Proteína verde fluorescente. <i>Abreviatura en inglés</i> (Green fluorescent protein)
OFED:	“One Factor Experimental Design”
pAOX:	Promotor de la enzima alcohol oxidasa
pGAP:	Promotor de la enzima gliceraldehído 3-Fosfato deshidrogenasa
POXA 1B:	Lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i>
SD:	Desviación estándar. <i>Abreviatura en inglés</i> (Standard deviation)
Snf4:	Proteína quinasa subunidad gamma
Snf1:	Proteína supresora de catabolitos de carbono quinasa
t_d:	Tiempo de duplicación
μ_(x):	velocidad específica de crecimiento
VET:	Volumen efectivo de trabajo
V_{max}:	Velocidad máxima
vvm:	Volumen de aire por volumen del medio
YPG:	Medio de cultivo de extracto de levadura, peptona y glucosa. <i>Abreviatura en inglés</i> (Yeast extract, peptone y glucosa)
YPG-Z:	Medio de cultivo de extracto de levadura, peptona y glucosa + Zeocina. <i>Abreviatura en inglés</i> (Yeast extract, peptone y glucosa + Zeocin)

4.1 Introducción

Los organismos naturales productores de lacasas por lo general no son convenientes para la producción a escalas altas, debido a que presentan rendimientos bajos y costos altos de producción, preparación y purificación (Ferrer-Miralles *et al.*, 2009).

La expresión heteróloga de enzimas favorece los rendimientos altos y bajos costos de producción; lo que es útil para posteriores aplicaciones industriales o ambientales (Ferrer-Miralles *et al.*, 2009); también se ha encontrado La expresión de LAC5930-1 de *Trametes sp.* en *Pichia pastoris* o LAC2 de *Coprinus congregatus* en *Saccharomyces cerevisiae* aumentó la tolerancia de la levadura al estrés oxidativo (Antosová and Sychrová, 2016).

Además, con la tecnología del ADN recombinante aumenta la versatilidad del escalado y el potencial de producción abriendo nuevas posibilidades comerciales para las producciones industriales.

Las lacasas han sido expresadas en levaduras, usando diferentes promotores (Bohlin *et al.*, 2006). La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* ha sido utilizada con frecuencia para la producción de enzimas recombinantes bajo el control del promotor inducible AOX (*pAOX*), (Hang *et al.*, 2009). No obstante, el uso de *pAOX1* puede ser considerado no compatible con el medio ambiente, debido a que requiere el uso de metanol como fuente de carbono inductora de la expresión (Rivera-Hoyos *et al.*, 2015); lo que implica que los residuos de metanol deben ser eliminados al finalizar la producción para evitar que el metanol sea vertido al efluente a tratar y aumente la contaminación del agua residual. Adicionalmente, la concentración de metanol en el medio de cultivo podría resultar en un problema pues se requiere el control del límite de inflamabilidad en el medio de cultivo, procurando que límite inferior de inflamabilidad (LFL) del metanol sea menor a 6,7 %. (Brooks and Crowl, 2007), lo que es costoso debido a las estrictas condiciones de la manipulación (Cos *et al.*, 2006) y producción por etapas para mantener el límite tóxico del metanol (Çelik and Çalık, 2012). Se ha reportado que

cuando la concentración de metanol excede 0.5 % (v/v) comienza a ser tóxico para *P. pastoris*, aumentando la actividad proteolítica y disminuyendo la expresión y estabilidad de la proteína clonada (Hong *et al.*, 2002).

Actualmente pocos estudios han sido dedicados a la expresión de lacasas recombinantes en *P. pastoris* usando el promotor gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (*pGAP*). Bohlin *et al.*, (2016) demostraron que para *pGAP* la glucosa era una fuente de carbono adecuada para la producción constitutiva de la lacasa, pues obtuvieron sólo el 53 y 46 % de la actividad enzimática usando glicerol o maltosa, respectivamente (Bohlin *et al.*, 2006), debido a que la intensidad de la expresión bajo el control de *pGAP* varía con la fuente de carbono (Ata *et al.*, 2017). Las ventajas de usar el *pGAP* para la expresión de lacasas son:

1. El uso del *pGAP* permite la expresión constitutiva y el uso de glucosa y otras fuentes de carbono (glicerol, fructosa), fáciles de manejar como fuente energética. Del mismo modo, la liberación de metabolitos de fuentes de carbono en los efluentes no impacta negativamente el medio ambiente.
2. La funcionalidad de la enzima recombinante ha sido demostrada en tratamientos de colorantes (Morales-Álvarez *et al.*, 2018).

El objetivo del presente capítulo fue evaluar la producción en biorreactor de 10 L (6 L volumen efectivo de trabajo, VET) usando el medio previamente mejorado en el grupo de investigación (Ardila-Leal *et al.*, 2019). La cinética de producción de rPOXA 1B se comparó usando la técnica de medición utilizada anteriormente por el grupo (Tinoco *et al.*, 2001) y la técnica estandarizada en el Capítulo 3 de este trabajo.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Cepa

Se utilizó la cepa de *P. pastoris* X33 que contiene el vector de expresión pGAPZ α A-*LaccPost-Stop* (Clon 1) con el gen sintético optimizado que codifica para la lacasa POXA 1B de *Pleurotus ostreatus*. La cepa usada fue previamente conservada en medio YPD (1% (p/v) extracto de levadura, 2% (p/v) peptona, 2% (p/v) glucosa, suplementado con 20 % (p/v) glicerol) a -80°C (Rivera-Hoyos et al., 2015).

4.2.2 Preparación del inóculo

Se tomaron viales del Banco de Células Primario (BCP), (Poutou et al., 1994) del Clon 1 de la cepa *Pichia pastoris* X33/pGAPZ α A-*LaccPost-Stop*; una vez descongelados fueron inoculados en tubos de vidrio con tapa de rosca con 5 mL de medio estéril YPD suplementado con 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de zeocina (Z), (YPD-Z) y se incubaron a 30 °C, durante toda la noche a 180 rpm. Posteriormente se inocularon dos Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL (VET, volumen efectivo de trabajo) de medio YPD-Z fresco y se cultivó a las mismas condiciones durante 12 horas. El número de Erlenmeyers utilizados para la producción en biorreactor de 10 L dependió del volumen de inóculo necesario para el estudio. El cultivo resultante sirvió de inóculo para los diseños factoriales, el cual fue verificado por tinción de Gram para descartar la presencia de morfologías contaminantes.

4.2.3 Producción en biorreactor a escala 10 L

Se empleó el medio mejorado resultante del Diseño experimental One Factor (OFED) [10 % (v/v) inóculo, 1 mM CuSO₄, 10 g L⁻¹, glucosa, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 20 g L⁻¹ peptona, 15 g L⁻¹ extracto de levadura], (Ardila-Leal et al., 2019). La producción se realizó en Biorreactor de volumen total 10 L (TECFERM) con volumen efectivo de trabajo (VET) del 60 %. Las condiciones de producción fueron 30 °C, 1 vvm, 180 rpm, durante 192 h. Las muestras para el estudio cinético se tomaron cada 2 horas durante las primeras 12 h y luego cada 12 h hasta las 192 h. Se produjeron 3 lotes, los cuales fueron caracterizados cinéticamente en función de la biomasa seca (g L⁻¹), la concentración de

proteína extracelular (mg mL^{-1}), la concentración de glucosa residual (g L^{-1}), la actividad enzimática (U L^{-1}), la actividad específica (U mg^{-1}) y pH. Se calcularon también los parámetros cinéticos, velocidad específica de crecimiento $\mu_{(x)}$ (h^{-1}), tiempo de duplicación t_d (h), rendimiento biomasa-sustrato $Y_{(x/s)}$ (g g^{-1}), productividad de la biomasa $P_{(x)}$ ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$), rendimiento enzima-sustrato “ $Y_{(p/s)}$ ”, ($\text{U L}^{-1} \text{g}^{-1}$) y productividad de la enzima “ $P_{(p)}$ ” ($\text{U L}^{-1} \text{h}^{-1}$),” (se utilizaron comillas para expresar que el parámetro cinético está calculado en base a la “actividad enzimática”). Sigma Plot (V11.0), (Systat Software, Inc. San Jose, CA USA) fue usado para graficar las cinéticas.

4.2.4 Comparación de actividad lacasa usando tampón citrato o tampón acetato

En los tres procesos de producción realizados la medición de la actividad enzimática se realizó utilizando el método de [Tinoco *et al.* \(2001\)](#) y el método con tampón citrato de sodio ([Capítulo 3](#)); lo que permitió comparar además, de la actividad enzimática, la actividad específica y la productividad ([Ardila-Leal *et al.*, 2019](#)).

4.2.5 Técnicas analíticas

4.2.5.2 Ensayo de actividad lacasa usando el método de [Tinoco *et al.* \(2001\)](#)

La actividad enzimática fue monitoreada por el cambio en la absorbancia a 436 nm ($\xi_{436} = 29300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) debido a la oxidación del ABTS en un tampón acetato de sodio 600 mM (pH 4.5 ± 0.2). Se usaron 800 μL de extracto crudo a temperatura ambiente, 100 μL (600 mM) de tampón acetato de sodio y 100 μL (5 mM) de ABTS como sustrato. La formación de un radical catiónico verde fue evaluada espectrofotométricamente durante 3 minutos. Una unidad de actividad está definida como la cantidad de enzima requerida para permitir la oxidación de 1 μmol de ABTS por minuto [[Ecuación 4.1](#)]. La solución blanco contenía 800 μL de agua destilada, 100 μL (600 mM) de tampón acetato de sodio y 100 μL (5 mM) de ABTS. La actividad enzimática se expresó en U L^{-1} .

$$UL^{-1} = \frac{(\Delta E \times V_t)}{(\epsilon \times d \times V_s)} \quad [\text{Ecuación 4.1}]$$

Donde: ΔE corresponde a la absorbancia final menos la absorbancia inicial durante 1 min de reacción, V_t hace referencia al volumen total utilizado en la reacción, ϵ al coeficiente de extinción molar del ABTS ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 420 nm, d es la longitud de la cubeta en cm y V_s es el volumen de muestra (enzima) que se agregó en la reacción.

4.2.5.3 Ensayo de actividad lacasa usando tampón citrato

La medición de la actividad lacasa se realizó utilizando el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) como sustrato, el cual fue monitoreado por el cambio en la absorbancia a 420 nm ($\xi_{420} = 36,000 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) debido a la oxidación del ABTS en tampón citrato de sodio 0.1 M (pH 3.0 ± 0.2). Se agregaron 100 μL de ABTS (20 mM), de 2 a 20 μL de sobrenadante centrifugado a temperatura ambiente (este volumen varió dependiendo de la cantidad de enzima presente en la muestra) y se completó el volumen hasta 1 mL con tampón citrato 0.1 M (pH 3.0 ± 0.2). La formación de un radical catiónico verde fue evaluada espectrofotométricamente durante 1 minuto (Pezzella *et al.*, 2017), (Capítulo 3). La unidad enzimática (U) está definida como la cantidad de enzima capaz de transformar 1 μmol de sustrato (ABTS) por minuto, por litro [Ecuación 4.1]. La solución blanco contenía 20 μL de agua destilada, 880 μL (0.1 M) de tampón citrato de sodio y 100 μL de ABTS (20 mM). La actividad enzimática se expresó en UL^{-1} [Ecuación 4.1].

4.2.5.4. Determinación de la concentración de proteínas totales extracelulares

La determinación de proteínas totales se realizó mediante absorción UV (280 nm) usando un NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), (Desjardins *et al.*, 2009). La actividad específica se calculó utilizando la [Ecuación 4.2].

$$\text{Act. Esp.} = \frac{\text{Act. Enzimática}}{\text{Conc. Proteínas}} \quad [\text{Ecuación 4.2}]$$

Donde: Act. Enzimática, es la actividad expresada como UL^{-1} , Conc. Proteínas, es la concentración extracelular de proteínas, expresada como mg mL^{-1} .

4.2.5.5 Determinación de la concentración azúcares reductores totales

Se determinó la concentración de azúcares reductores totales residuales en cada una de las muestras (por triplicado). Para esto se utilizó la técnica de ácido 3,5 dinitrosalicílico (Miller, 1959). Para esta determinación se preparó una curva de patrón que osciló entre 0.1 y 2 g L⁻¹ de D-glucosa y que respondió a la Ecuación 4.3.

$$y = 0.5735x - 0.018; R^2 = 0.09972 \quad \text{[Ecuación 4.3]}$$

4.2.5.6 Determinación de biomasa seca

La concentración de la biomasa seca (g L⁻¹) fue calculada usando una curva de calibración [Ecuación 4.4], (Landázuri *et al.*, 2009).

$$X = 1.1724 \times Abs_{\lambda 600 \text{ nm}} R^2 = 0.9870 \quad \text{[Ecuación 4.4]}$$

Donde: X (g L⁻¹ de biomasa seca), se transformó como Ln (X/X₀) y graficado vs. tiempo (h); la tendencia de la curva (fase exponencial) se usó para calcular la velocidad específica de crecimiento $\mu_{(x)}$ (h⁻¹), [Ecuaciones 4.5 – 4.7] y tiempo de duplicación t_d (h), [Ecuación 4.8], (Córdoba-Ruiz *et al.*, 2009; Landázuri *et al.*, 2009; Poutou-Piñales *et al.*, 2010; Doran, 2013).

$$\mu_{(x)} = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad \text{[Ecuación 4.5]}$$

$$\text{Ln } x = \text{Ln } x_0 + \mu_{(x)} t \quad \text{[Ecuación 4.6]}$$

$$\text{Ln} \left(\frac{x}{x_0} \right) = \mu_{(x)} t \quad \text{[Ecuación 4.7]}$$

Donde: $t = t_{\text{fase log}} - t_{\text{fase lag}}$

$$t_d = \frac{\text{Ln} 2}{\mu_{(x)}} \quad \text{[Ecuación 4.8]}$$

4.3 Resultados

4.3.1 Producción en biorreactor a escala de 10 L y comparación de actividad lacasa rPOXA 1B usando tampón citrato y tampón acetato

El medio resultante del OFED [10 % (v/v) inóculo, 1 mM CuSO₄, 10 g L⁻¹, glucosa, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 20 g L⁻¹ peptona, 15 g L⁻¹ extracto de levadura] se utilizó para realizar por triplicado la cinética de producción de la rPOXA 1B en Biorreactor de 10 L. La [Figura 4.1](#), muestra la cinética de promedio de los tres lotes de producción, en donde las diferentes graficas dependen de la técnica usada en la detección de la actividad lacasa.

El consumo máximo de glucosa fue detectado a las 12 h ([Figura 4.1](#)), en contraste el crecimiento de la biomasa (g L⁻¹) expresada como $\ln(X/X_0)$ mostró dos fases de crecimiento exponencial, alcanzando 2.20 ± 0.35 g L⁻¹ a las 192 h. La velocidad específica de crecimiento ($\mu_x = 0.10$ h⁻¹) y el tiempo de duplicación t_d de 6.9 h fue obtenido en la primera fase (0 - 12 h). La segunda fase exponencial inicio una vez se agotó la glucosa residual (12 - 196 h) con una velocidad específica de crecimiento de $\mu_x = 0.006$ h⁻¹ y $t_d = 110$ h. A las 192 h de cultivo a actividad lacasa fue de $8,506.95 \pm 1,993.65$ U L⁻¹ y $3,159.93 \pm 498.9$ U L⁻¹ usando tampón citrato y tampón acetato, respectivamente. La actividad específica a las 192 h fue de 213.65 ± 55.83 y 79.28 ± 14.69 usando tampón citrato y tampón acetato, respectivamente.

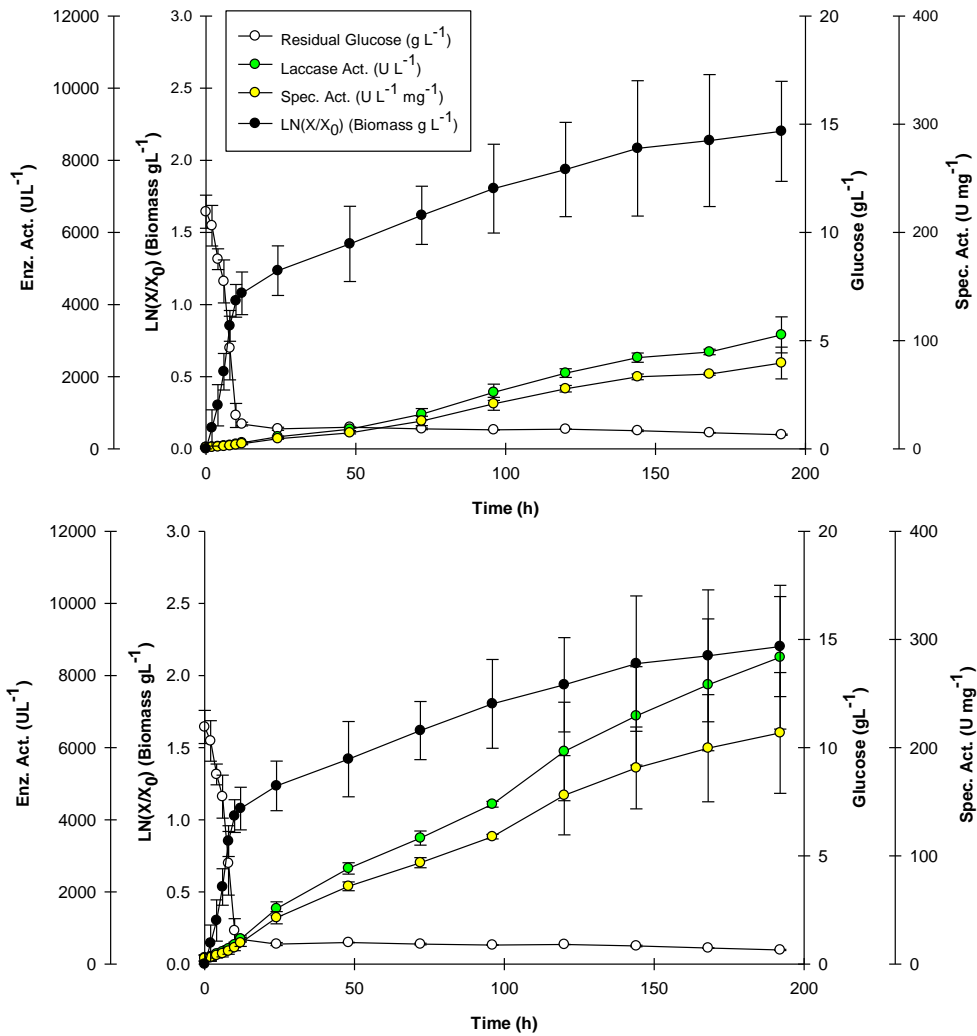


Figura 4.1 Cinética de de rPOXA 1B producción en biorreactor de 10 L. Variación del pH, la glucosa residual, el LN de la biomasa, la actividad lacasa y la actividad específica de la enzima. **Superior:** Actividad Lacasa en tampón Acetato. **Inferior:** Actividad Lacasa en tampón Citrato.

4.4 Discusión

En la [Figura 4.1](#), a las 12 h de cultivo se había consumido la mayor parte de la glucosa, resultados que coincide con los obtenidos previamente en producción en Erlenmeyer con este medio de cultivo ([Ardila-Leal et al., 2019](#)). El crecimiento celular muestra dos fases exponenciales de crecimiento, la primera de 0 a 12 h de cultivo caracterizada por una velocidad volumétrica de crecimiento (k_0) de 0.18 h^{-1} , un tiempo de duplicación volumétrico $t_d = 5.6 \text{ h}$, una velocidad específica de crecimiento de $\mu_x = 0.10 \text{ h}^{-1}$ con un tiempo de duplicación de $t_d = 6.9 \text{ h}$. La segunda fase exponencial se produjo una vez agotada la glucosa residual (12 a 192 h); esta fase mostró una $k_0 = 0.04 \text{ h}^{-1}$ y $t_d = 25 \text{ h}$, así como $\mu_x = 0.006 \text{ h}^{-1}$ con $t_d = 110 \text{ h}$. Sin embargo, la actividad lacasa aumentó de manera exponencial hasta la hora 192, con valores de $3,159.93 \pm 498.9 \text{ U L}^{-1}$ y $8,506.95 \pm 1,993.65 \text{ U L}^{-1}$ para tampón acetato y citrato, respectivamente, así mismo, la actividad específica con $79.28 \pm 14.69 \text{ U mg}^{-1}$ y $213.64 \pm 55.83 \text{ U mg}^{-1}$ para tampón acetato y citrato, respectivamente.

A escala de 10 L se obtuvo la mayor producción de rPOXA 1B y de biomasa una vez agotada la glucosa. Estos resultados muestran que la enzima continúa produciéndose aún finalizada la primera fase exponencial de crecimiento ([Figura 4.1](#)). Los resultados concuerdan con los resultados obtenidos en Erlenmeyer ([Ardila-Leal et al., 2019](#)) y con otras investigaciones; [Kern et al., \(2007\)](#) estudiaron la expresión de una oxidasa fusionada a GFP bajo *pGAP*. Entre los resultados discutidos, mencionaron que la fluorescencia de GFP aumentó notablemente después de que se agotó la glucosa de los medios ([Kern et al., 2007](#)).

La regulación metabólica que se observa en las levaduras posterior al agotamiento de la glucosa es la inducción de la gluconeogénesis ([Xu et al., 2012](#)), la cual produce catabolitos para el crecimiento y la regulación de la integridad celular ([Irokawa et al., 2016](#)). Sin embargo, a baja concentración de glucosa, la formación de biomasa depende de la composición del medio, pues la presencia de una fuente de nitrógeno como peptona o extracto de levadura generan mayor formación de biomasa, diferente a lo

que sucede con sales de amonio (da Cruz *et al.*, 2002). Cuando hay limitación de glucosa Snf4 activa la quinasa Snf1, proteína que fosforila proteínas diana y reguladores transcripcionales de los genes implicados en el uso de fuentes de carbono alternativas, la gluconeogénesis, la respiración, el transporte, la meiosis y la respuesta a estrés (Lin *et al.*, 2001; Hedbacker and Carlson, 2009).

La enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa GAPDH (EC 1.2.1.12) cataliza reversiblemente la fosforilación del gliceraldehído-3-fosfato en 1,3-bifosfoglicerato, que es esencial para el metabolismo energético, controlando de esta manera la expresión del *pGAP*. Giardina y Chiang (2013) evaluaron diferentes enzimas que se expresaban bajo limitación de glucosa en *S. cerevisiae* usando técnicas inmunológicas con el uso de anticuerpos secundarios conjugados con partículas de oro. Específicamente la proteína expresada por el gen *GAP* que participa en la vía glucolítica como en la vía gluconeogénica mostró la cuantificación de 117.9 ± 33.9 partículas de oro en el espacio intracelular, demostrando la importancia del gen frente a la limitación de glucosa (Giardina and Chiang, 2013).

Cambiando la geometría de producción a biorreactor de 10 L con VET de 60 % y utilizando el medio obtenido en el OFED, se logró incrementar la actividad lacasa de $1,343.520 \pm 40.300$ U L⁻¹ en 168 h (Ardila-Leal *et al.*, 2019) a $3,159.93 \pm 498.9$ U L⁻¹ en 192 h, lo que significó un aumento en la actividad de 2.4 veces (Tabla 4.1). Sin embargo, debido a que en las investigaciones previas del grupo se empleaba tampón acetato a pH 4.5 ± 0.2 , el cálculo en el aumento de actividad, no se determinó con tampón citrato.

La Tabla 4.1 muestra las actividades de lacasa de hongos de diferentes orígenes expresados en *Pichia pastoris* (1997 a 2019), así como, la actividad enzimática (diferenciada en tampón acetato, tampón citrato y otro tampón) y el volumen en el que se realizó la producción. Como se puede observar, las actividades más altas se obtuvieron con *pAOX*. Se destaca la expresión de lacasa de *Fomes lignosus* usando *pGAP*, con actividades elevadas (no se describió el volumen de producción). Además, la

actividad de la lacasa de *Botrytis aclada* también se elevó usando pGAP y un volumen de 2,5 L.

Aunque existen diferentes investigaciones en donde se evidencian actividades enzimáticas altas, los resultados de la actividad lacasa podrían no ser comparable, debido a que se demostró que la actividad de un mismo sobrenadante puede variar al usar dos tampones diferentes ([Capítulo 3](#)) como se observa en la [Tabla 4.1](#). Entre los diferentes tampones usados para la medición de la actividad enzimática se observa que el tampón acetato es uno de los más usados. No obstante, como se demostró en el [Capítulo 3](#), la actividad de la lacasa está influenciada por el pH del tampón de reacción, así como por los diferentes factores implicados en la medición de la actividad lacasa. En este sentido, nuestros resultados son prometedores, ya que están dentro del rango obtenido en otras investigaciones ([Tabla 4.1](#)).

Table 4.1 Actividades de algunas lacasas de diferentes orígenes expresados en *P. pastoris* (1997 a 2019).

Origen	Lacasa	<i>P. pastoris</i>	Actividad enzimática (U L ⁻¹)			Volumen del cultivo (L)	Tiempo (días)	Promotor	Referencias
			Tampón Acetato	Tampón Citrato	Otro Tampón				
<i>Pleurotus ostreatus</i>	POXA1B	X33	3,159.93	8,506.95		6.0	8	GAP	Este estudio
<i>Pleurotus ostreatus</i>	POXA1B	X33	1,373.72			0.3	7	GAP	(Ardila-Leal et al., 2019)
<i>Ganoderma lucidum</i>	GILCC1	X33	4.69			0.15	7	GAP	(Morales-Álvarez et al., 2017)
<i>Corioloopsis gallica</i>	LcCg	X33			250.00	0.5	12	AOX	(Avelar et al., 2017)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	POXA1B	X33	451.08			0.1	6.5	GAP	(Rivera-Hoyos et al., 2015)
<i>Ganoderma lucidum</i>	GILCC1	X33	0.13			0.1	6.5	GAP	(Rivera-Hoyos et al., 2015)
<i>Trametes trogii</i> BAFC 463	lcc3	GS115			5,740.00	Shake flask	--	AOX	(Campos et al., 2016)
<i>Trametes versicolor</i>	lccA	X33		11,972.00		5.0	16	AOX	(Li et al., 2014)
<i>Coprinus comatus</i>	lac3/lac4	KM71H	689.00 /1,465.00			0.05	15	AOX	(Gu et al., 2014)
<i>Trametes versicolor</i>	LAC5	X33	14.0			0.04	5	AOX	(Nishibori et al., 2013)
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	LAC2	X33	100.0			0.04	5	AOX	(Nishibori et al., 2013)
<i>Botrytis aclada</i>	BaLac	X33		53,300.00		2.5	3	GAP	(Kittl et al., 2012)
<i>Botrytis aclada</i>	BaLac	X33		51,000.00		0.4	4	AOX	(Kittl et al., 2012)
<i>Trametes sp.</i>	LacB	GS115			32,000.00	--	13	AOX	(Li et al., 2007)
<i>Trametes sp. 420</i>	lacD	GS115			83,000.00	0.03	--	AOX	(Hong et al., 2007)
<i>Trametes versicolor</i>	Lcc1/Lcc2	SMD1168			1.30	--	7	GAP	(Bohlin et al., 2006)
<i>Trametes trogii</i>	LccI	GS115			2,520.00	2.0	8	AOX	(Colao et al., 2006)
<i>Trametes sp.</i>	rLacA	GS115			5,470.00	0.03	13	AOX	(Hong et al., 2006)
<i>Fomes lignosus</i>	lcc	GS115	9,030.00			--	2	GAP	(Liu et al., 2003)
<i>Trametes versicolor</i>	LccIV	GS115	1,500.00			5.0	4	AOX	(Brown et al., 2002)
<i>Trametes versicolor</i>	lcc1	SMD1168	140,000.00			2.5	9	AOX	(Hong et al., 2002)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	lac4	GS115 y KM71	10,200.00			0.015	5	AOX	(Soden et al., 2002)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	lac1	X33			20.00	0.05	10	AOX	(Otterbein et al., 2000)

4.5 Conclusiones

Con el medio [10 % (v/v) inóculo, 1 mM CuSO₄, 10 g L⁻¹, glucosa, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 20 g L⁻¹ peptona, 15 g L⁻¹ extracto de levadura] y las condiciones de producción [30 °C, 1 vvm, 180 rpm, durante 192 h] se logró aumentar la actividad enzimática 2.4 veces en Biorreactor de 10 L, con una actividad lacasa de 3,159.93 ± 498.9 U L⁻¹ en tampón acetato. Sin embargo, con el tampón citrato estandarizado en el [Capítulo 3](#), se logró un aumento de la actividad enzimática a 8506.95 ± 1993.65 U L⁻¹. La expresión de la lacasa rPOXA 1B en *P. pastoris* en el medio de cultivo mejorado bajo las condiciones experimentales es promisorias; sin embargo, amerita nuevos procesos de optimización estadística del medio de cultivo para disminuir costos e incrementar aún más la actividad enzimática.

4.6 Referencias

- Antosová, Z. and H. Sychrová, (2016). Yeast Hosts for the production of recombinant laccases: A review. **Molecular Biotechnology**, 58: 93–116. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-015-9910-1>
- Ardila-Leal, L.D., D.A. Albarracín-Pardo, C.M. Rivera-Hoyos, E.D. Morales, R.A. Poutou-Piñales, *et al.*, (2019). Media improvement for 10 L bioreactor production of rPOXA 1B laccase by *P. pastoris*. **3Biotech**, 9 (12): Article 447. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-019-1979-y>
- Ata, Ö., R. Prielhofer, B. Gasser, D. Mattanovich and P. Çalık, (2017). Transcriptional engineering of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for improved heterologous protein production in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, 114 (10): 2319-2327. <http://doi.org/10.1002/bit.26363>
- Avelar, M., C. Olvera, D. Aceves-Zamudio, J. Luis Folch and M. Ayala, (2017). Recombinant expression of a laccase from *Coriolopsis gallica* in *Pichia pastoris* using a modified a-factor preproleader. **Protein Expression and Purification**, 136: 14-19.
- Bohlin, C., L.J. Jonsson, R. Roth and W.H. Van Zyl, (2006). Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 129-132: 195-214.
- Brooks, M.R. and D.A. Crowl, (2007). Flammability envelopes for methanol, ethanol, acetonitrile and toluene. **Journal of Loss Prevention in the Process Industries**, 20: 144-150.
- Brown, M.A., Z. Zhao and A.G. Mauk, (2002). Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. **Inorganica Chimica Acta**, 331: 232–238. [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-1693\(01\)00814-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-1693(01)00814-3)
- Campos, P.A., L.N. Levin and S.A. Wirth, (2016). Heterologous production, characterization and dye decolorization ability of a novel thermostable laccase isoenzyme from *Trametes trogii* BAFC 463. **Process Biochemistry**, 51: 895–903.
- Çelik, E. and P. Çalık, (2012). Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnology Advances**, 30: 1108-1118.
- Colao, M.C., S. Lupino, A.M. Garzillo, V. Buonocore and M. Ruzzi, (2006). Heterologous expression of lcc1 gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. **Microbial Cell Factories**, 5: 1-11. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-5-31>
- Córdoba-Ruiz, H.A., R.A. Poutou-Piñales, O.Y. Echeverri-Peña, N.A. Algecira-Enciso, P. Landázuri, *et al.*, (2009). Laboratory scale production of the human recombinant iduronate 2-sulfate sulfatase-Like from *Pichia pastoris*. **African Journal of Biotechnology**, 8 (9): 1786-1792.
- Cos, C., R. Ramón, J.L. Montesinos and F. Valero, (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. **Microbial Cell Factories**, 5: 17p. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-5-17>

- da Cruz, S.H., E.M. Cilli and J.R. Ernandes, (2002). Structural complexity of the nitrogen source and influence on yeast growth and fermentation. **Journal of the Institute Brewing**, 108 (1): 54-61.
- Desjardins, P., J.B. Hansen and M. Allen, (2009). Microvolume protein concentration determination using the NanoDrop 2000c spectrophotometer. **Journal of Visualized Experiments**, 33: 3p. <http://doi.org/10.3791/1610>
- Doran, P.M., (2013) Bioprocess Engineering Principles. Elsevier Ltd.
- Ferrer-Miralles, N., J. Domingo-Espín, J.L. Corchero, E. Vázquez and A. Villaverde, (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microbial Cell Factories**, 8: 17. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-8-17>
- Giardina, B.J. and H.-L. Chiang, (2013). Fructose-1,6-bisphosphatase, Malate Dehydrogenase, Isocitrate Lyase, Phosphoenolpyruvate Carboxykinase, Glyceraldehyde-3 phosphate Dehydrogenase, and Cyclophilin A are secreted in *Saccharomyces cerevisiae* grown in low glucose. **Communicative & Integrative Biology**, 6 (6): e27216.
- Gu, C., F. Zheng, L. Long, J. Wang and S. Ding, (2014). Engineering the Expression and Characterization of Two Novel Laccase Isoenzymes from *Coprinus comatus* in *Pichia pastoris* by Fusing an Additional Ten Amino Acids Tag at N-Terminus. **Plos One**, 9 (4): e93912. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093912>
- Hang, H., X. Ye, M. Guo, J. Chu, Y. Zhuang, *et al.*, (2009). A simple fermentation strategy for high-level production of recombinant phytase by *Pichia pastoris* using glucose as the growth substrate. **Enzyme and Microbial Technology** 44: 185-188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.12.002>
- Hedbacker, K. and M. Carlson, (2009). SNF1/AMPK pathways in yeast. **Frontiers Bioscience**, 13: 2408-2420.
- Hong, F., N.Q. Meinander and L.J. Jönsson, (2002). Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, 79 (4): 438-449.
- Hong, Y., Y. Xiao, H. Zhou, W. Fang, M. Zhang, *et al.*, (2006). Expression of a laccase cDNA from *Trametes* sp. AH28-2 in *Pichia pastoris* and mutagenesis of transformants by nitrogen ion implantation. **FEMS Microbiology Letter**, 258: 96-101.
- Hong, Y.-z., H.-m. Zhou, X.-m. Tu, J.-f. Li and Y.-z. Xiao, (2007). Cloning of a laccase gene from a novel Basidiomycete *Trametes* sp. 420 and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. **Current Microbiology**, 54: 260–265.
- Irokawa, H., T. Tachibana, T. Watanabe, Y. Matsuyama, H. Motohashi, *et al.*, (2016). Redox-dependent Regulation of Gluconeogenesis by a Novel Mechanism Mediated by a Peroxidatic Cysteine of Peroxiredoxin. **Scientific Reports**, 6: 33536. <http://dx.doi.org/10.1038/srep33536>
- Kern, A., F.S. Hartner, M. Freigassner, J. Spielhofer, C. Rumpf, *et al.*, (2007). *Pichia pastoris* "just in time" alternative respiration. **Microbiology**, 153 (4): 1250-1260. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2006/001404-0>
- Kittl, R., K. Mueangtoom, C. Gonaus, S.T. Khazaneh, C. Sygmund, *et al.*, (2012). A chloride tolerant laccase from the plant pathogen ascomycete *Botrytis aclada* expressed at high levels in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, 157: 304-314.

- Landázuri, P., R.A. Poutou-Piñales, J. Acero-Godoy, H.A. Córdoba-Ruiz, O.Y. Echeverri-Peña, *et al.*, (2009). Cloning and shake flask expression of hrIDS-Like in *Pichia pastoris*. **African Journal of Biotechnology**, 8 (12): 2871-2877.
- Li, J.F., Y.Z. Hong, Y.Z. Xiao, Y.H. Xu and W. Fang, (2007). High production of laccase B from *Trametes* sp. in *Pichia pastoris*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 23: 741-745. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-006-9286-2>
- Li, Q., J. Pei, L. Zhao, J. Xie, F. Cao, *et al.*, (2014). Overexpression and characterization of laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 50 (2): 140-147. <http://dx.doi.org/10.1134/S0003683814020124>
- Lin, S.S., J.K. Manchester and J.I. Gordon, (2001). Enhanced Gluconeogenesis and Increased Energy Storage as Hallmarks of Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, 276 (38): 36000-36007.
- Liu, W., Y. Chao, S. Liu, H. Bao and S. Qian, (2003). Molecular cloning and characterization of a laccase gene from the basidiomycete *Fame lignosus* and expression in *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biochemistry**, 63 (2): 174-181.
- Miller, G., (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31 (3): 426-428. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Morales-Álvarez, E.D., C.M. Rivera-Hoyos, Á.M. Cardozo-Bernal, R.A. Poutou-Piñales, A.M. Pedroza-Rodríguez, *et al.*, (2017). Plackett-Burman Design for rGILCC1 laccase activity enhancement in *Pichia pastoris*: Concentrated enzyme kinetic characterization. **Enzyme Research**, 2017: Article ID 5947581. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/5947581>
- Morales-Álvarez, E.D., C.M. Rivera-Hoyos, S.A. Poveda-Cuevas, E.A. Reyes-Guzmán, A.M. Pedroza-Rodríguez, *et al.*, (2018). Malachite Green and Crystal Violet decolorization by *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus ostreatus* supernatant and by rGILCC1 and rPOXA 1B concentrates: Molecular docking analysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 184 (3): 794-805. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-017-2560-y>
- Nishibori, N., K. Masaki, H. Tsuchioka, T. Fujii and H. Iefuji, (2013). Comparison of laccase production levels in *Pichia pastoris* and *Cryptococcus* sp. S-2. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 115 (4): 394-399.
- Otterbein, L., E. Record, S. Longhi, M. Asther and S. Moukha, (2000). Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. **European Journal of Biochemistry**, 267: 1619-1625.
- Pezzella, C., V.G. Giacobelli, V. Lettera, G. Olivieri, P. Cicatiello, *et al.*, (2017). A step forward in laccase exploitation: recombinant production and evaluation of techno-economic feasibility of the process. **Journal of Biotechnology**, 259: 175-181. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jbiotec.2017.07.022>
- Poutou, R.A., E. Amador and M. Candelario, (1994). Banco de células primario (BCP): Caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes. **Biotecnología Aplicada**, 11 (1): 55-59.

- Poutou-Piñales, R.A., A. Vanegas Niño, P. Landázuri, H. Sáenz, L. Lareo, *et al.*, (2010). Human sulfatase transiently and functionally active expressed in *E. coli* K12. **Electronic Journal of Biotechnology**, 13 (3): article 8. 10.2225/vol13-issue3-fulltext-8
- Rivera-Hoyos, C.M., E.D. Morales-Álvarez, S.A. Poveda-Cuevas, E.A. Reyes-Guzmán, R.A. Poutou-Piñales, *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): e0116524. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116524.g002>
- Soden, D.M., J. O'Callaghan and A.D.W. Dobson, (2002). Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. **Microbiology**, 148: 4003–4014.
- Tinoco, R., M.A. Pickard and R. Vazquez-Duhalt, (2001). Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. **Letters in Applied Microbiology**, 32 (5): 331-335. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00913.x>
- Xu, Y.-F., X. Zhao, D.S. Glass, F. Absalan, D.H. Perlman, *et al.*, (2012). Regulation of Yeast Pyruvate Kinase by Ultrasensitive Allosteric Independent of Phosphorylation. **Molecular Cell**, 48: 52-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.013>



Media improvement for 10 L bioreactor production of rPOXA 1B laccase by *P. pastoris*

Leidy D. Ardila-Leal¹ · Diego A. Albarracín-Pardo¹ · Claudia M. Rivera-Hoyos¹ · Edwin D. Morales-Álvarez² · Raúl A. Poutou-Piñales¹ · Angela M. Cardozo-Bernal³ · Balkys E. Quevedo-Hidalgo⁴ · Aura M. Pedroza-Rodríguez⁵ · Dennis J. Díaz-Rincón⁶ · Alexander Rodríguez-López⁶ · Carlos J. Alméciga-Díaz⁶ · Claudia L. Cuervo-Patiño⁷

Received: 13 May 2019 / Accepted: 29 October 2019
© King Abdulaziz City for Science and Technology 2019

Abstract

In this work, we statistically improved culture media for rPOXA 1B laccase production, expressed in *Pichia pastoris* containing pGAPZ α A-LaccPost-Stop construct and assayed at 10 L bioreactor production scale (6 L effective work volume). The concentrated enzyme was evaluated for temperature and pH stability and kinetic parameter, characterized by monitoring oxidation of different ABTS [2, 20-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] substrate concentrations. Plackett–Burman experimental design (PBED) implementation improved previous work results by 3.05-fold, obtaining a laccase activity of 1373.72 ± 0.37 U L⁻¹ at 168 h of culture in a 500 mL shake flask. In contrast, one factor experimental design (OFED) applied after PBED improved by threefold the previous study, additionally increasing the C/N ratio. Employing OFED media at 10 L bioreactor scale was capable of producing 3159.93 ± 498.90 U L⁻¹ at 192 h, representing a 2.4-fold increase. rPOXA 1B concentrate remained stable between 10 and 50 °C and retained over 70% residual enzymatic activity at 60 °C and 50% at 70 °C. Concerning pH stability, the enzyme was stable at pH 4.0 ± 0.2 with a residual activity greater than 90%. The lowest residual activity (60%) was obtained at pH 10.0 ± 0.2 . Furthermore, the apparent kinetic parameters were V_{\max} of 3.163×10^{-2} mM min⁻¹ and K_m of 1.716 mM. Collectively, regarding enzyme stability our data provide possibilities for applications involving a wide range of pH and temperatures.

Keywords Plackett–Burman experimental design · One-factor experimental design · *Pichia pastoris* · Recombinant laccase · Enzyme stability · Enzyme kinetics

Abbreviations

MCOs	Multicopper oxidases
ABTS	2, 20-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
PBL	Pulping black liquor
LDPE	Low density polyethylene
pAOX1	Alcohol oxidase promoter
pGAP	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter
POXA 1B	Laccase from <i>P. ostreatus</i>
rPOXA 1B	Recombinant laccase from <i>P. ostreatus</i>
V_{\max}	Maximum reaction rate

K_M	Michaelis constant
YPG	Yeast extract, peptone and glucose culture media
MCB	Master cell bank
YPG-Z	Yeast extract, peptone, glucose-zeocin culture media
EWV	Effective work volume
PBED	Plackett–Burman experimental design
OFED	One-factor experimental design
v.v.m.	Air volume per media volume
μ_x	Specific growth rate
T_d	Duplication time
r.p.m.	Revolutions per minute
$Y_{(x/s)}$	Biomass/substrate yield
$Y_{(p/s)}$	Enzyme/substrate yield
$P_{(x)}$	Biomass productivity
$P_{(p)}$	Enzyme productivity
SD	Standard deviation
GFP	Green fluorescent protein

Leidy D. Ardila-Leal[✉], Diego A. Albarracín-Pardo and Claudia M. Rivera-Hoyos contributed equally to this work.

✉ Raúl A. Poutou-Piñales
rpoutou@javeriana.edu.co

Extended author information available on the last page of the article

Snf4	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma
Snf1	Carbon catabolite-derepressing protein kinase
GAPDH	Enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Introduction

Laccases (EC 1.10.3.2) also known as *p*-diphenol oxidases are blue multicopper oxidases (MCOs) with the ability to catalyze the oxidation of organic aromatic compounds, with concomitant reduction of molecular oxygen to water. Laccases have an extraordinary range of natural substrate degradation activity, such as phenols, polyphenols, anilines, arylamines, methoxyphenols, hydroxyindoles, benzenethiols, organic and inorganic compounds (Gelo-Pujic et al. 1999; Brown et al. 2002) in the presence of a mediator substance, such as ABTS [2, 20-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], (O'Callaghan et al. 2002; Taha et al. 2013).

Laccases have been proposed for a great number of potential industrial and biotechnological applications, such as textile, food processing, paper and pulp, pharmaceutical, nanobiotechnology, and cosmetic industry. In addition, laccases have also been used in bioremediation. Due to its activity, laccases can decolorize synthetic dyes, such as anthraquinone, azo compounds (Hou et al. 2004; Zeng et al. 2012), triarylmethane, indigo carmine (Abadulla et al. 2000; Colao et al. 2006), triphenylmethane (Qing Yang et al. 2009; Morales-Álvarez et al. 2016; Morales-Álvarez et al. 2017b), neolane (Zouari-Mechichi et al. 2006), and other dyes such as remazol bright blue in the presence of organic mediators (Soares et al. 2001) from textile effluents. Laccase effectiveness has been demonstrated in pulping black liquor (PBL) from the paper industry (Rivera-Hoyos et al. 2018). Additionally, laccase can aid in low density polyethylene (LDPE) sequential physical-chemical-biologic biotransformation (Gómez-Méndez et al. 2018) and in bioconversion of lignocellulosic and oxodegradable polyethylene residues (Moreno-Bayona et al. 2019). Majeau et al. (2010) found that some phenolic or xenobiotic compounds could be eliminated from industrial wastewaters using laccases (Majeau et al. 2010). García et al. (2011) employed laccases to remove pharmaceuticals and personal care products from conventional wastewater (García et al. 2011). Another important laccase industrial application is pulp bleaching for paper production (Camarero et al. 2004).

At present, laccases have great potential as biological catalysts and are of considerable importance for the biotechnological industry; however, laccase secreted from natural sources are generally not adequate for high-scale production,

usually due to low production yield and high preparation and purification costs. Nonetheless, heterologous expression allows obtaining high yields and producing laccase in greater quantities for industrial applications.

Laccases have been expressed in methylotrophic yeast such as *P. pastoris*, using different promoters with interesting results. From our perspective as described in previous work by our group (Rivera-Hoyos et al. 2015), pAOX1 is not compatible with the environment. Enzyme production by using pAOX1 requires the addition of methanol to culture media. Hence, the enzyme must be isolated from the media to avoid methanol disposal into the effluent to be treated. Additionally, methanol concentration in culture media could result in a problem when scaling up the process, mainly because methanol is highly flammable (Brooks and Crowl 2007), fire hazardous, toxic (Çelik and Çalık 2012), and with elevated costs associated with storage and handling (Cos et al. 2006). However, currently few studies have been devoted to laccase recombinant heterologous expression in *P. pastoris* using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter (pGAP). Nevertheless, it has been demonstrated that glucose is an adequate carbon source for constitutive laccase production, contrary to glycerol or maltose (Bohlin et al. 2006a).

The objective of this work was to increase *P. ostreatus* recombinant POXA 1B (rPOXA 1B) laccase activity at low-scale production by improving culture media, taking into account nitrogen concentration and source type (organic and inorganic), carbon source concentration (glucose), copper concentration, media volume (attempting to impact oxygen transfer), and inoculum percentage to assay improved media at 10 L bioreactor scale with 6 L effective work volume (EWW). In addition, we characterized concentrated enzyme kinetics in terms of maximum reaction rate V_{max} (mM min⁻¹) and Michaelis constant K_M (mM), by using ABTS as a substrate.

Materials and methods

Strain

Pichia pastoris X33 containing the expression vector pGAPZαA-LaccPost-Stop (Clone 1) with previously optimized POXA 1B synthetic gene codifying for *Pleurotus ostreatus* laccase was used. This strain was previously conserved in YPG media [1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose] supplemented with 20% (w/v) glycerol and stored at -80 °C (Rivera-Hoyos et al. 2015).

Inoculum preparation

Vials from Master Cell Bank (MCB) (Poutou et al. 1994) clone 1 of the *P. pastoris* X33/pGAPZ α A-LaccPost-Stop strain were used. Once thawed, 5 mL sterile YPG media supplemented with 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Zeocin (Z) were inoculated and incubated at 30 °C overnight at 180 r.p.m. 500 mL Erlenmeyer flasks with 100 mL fresh YPG-Z (EWV) were inoculated and cultured under the same conditions for 12 h. The number of Erlenmeyer flasks depended on the assay as defined by factorial design at shake flask or 10 L bioreactor scale (6 L EWV). To dismiss the presence of any contaminant morphology by Gram stain, the remaining culture was evaluated and used as inoculum.

Plackett–Burman experimental design

Seven factors with two levels were evaluated to implement this design as follows: media volume (150 and 300 mL), CuSO_4 concentration (0.1 and 1.0 mM), inoculum percentage [2 and 10% (v/v)], glucose concentration (10 and 30 g L^{-1}), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration (5 and 20 mM), peptone concentration (10 and 20 g L^{-1}), and yeast extract concentration (5 and 10 g L^{-1}). In addition, the design included a center point that was evaluated in triplicate, assayed values were 225 mL media volume, 0.55 mM CuSO_4 concentration, 6% (v/v) inoculum, 20 g L^{-1} glucose concentration, 12.50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration, 15 g L^{-1} peptone concentration, and 7.5 g L^{-1} yeast extract concentration (Morales-Álvarez et al. 2017a).

One factor design

Results obtained from the Plackett–Burman experimental design were taken into account for this design as a function of the significant factor and its contribution percentage on culture enzyme activity (Sarria-Alfonso et al. 2013).

The following variables were evaluated in time: enzyme activity (U L^{-1}), protein concentration (mg mL^{-1}), glucose concentration (g L^{-1}), specific enzyme activity (U mg^{-1}), and productivity ($\text{U L}^{-1} \text{h}^{-1}$) based on “enzyme activity” (Rivera-Hoyos et al. 2015; Morales-Álvarez et al. 2017a). Enzyme activity (U L^{-1}) was used for statistical analysis as the response variable. All assays for statistical improvement were performed in 500 mL Erlenmeyer flasks at 30 °C and 180 r.p.m., always using the same shaker for 168 h of culture with a pH variable, starting at 7.0 ± 0.2 . Design Expert (V9.0) software (Stat-Ease, Inc. Minneapolis, MN USA) was used to design the experiments as well as to perform data analysis.

10 L bioreactor scale production containing 6 L of effective work volume

The media resulting from OFED evaluation was employed. Production was performed in 10 L bioreactor (TECFERM) with 60% (6 L) effective work volume (EWV). Production conditions were 30 °C, 1 v.v.m., (air volume/media volume), and 180 r.p.m., for 192 h. Samples for kinetic study were collected every 2 h during the first 12 h and every 24 h up to 192 h. Three lots were produced and were kinetically characterized as a function of dried biomass (g L^{-1}), extracellular protein concentration (mg mL^{-1}), residual glucose concentration (g L^{-1}), enzyme activity (U L^{-1}), specific enzyme activity (U mg^{-1}), and pH. The following kinetic parameters were calculated: specific growth rate μ_x (h^{-1}), duplication time T_d (h), biomass/substrate yield $Y_{(x/s)}$ (g g^{-1}), biomass productivity $P_{(x)}$ ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$), enzyme/substrate yield “ $Y_{(p/s)}$ ”, ($\text{U L}^{-1} \text{g}^{-1}$), and enzyme productivity “ $P_{(p)}$ ” ($\text{U L}^{-1} \text{h}^{-1}$) (quotation marks “” used for values based on enzyme activity).

Sigma Plot (V11.0), (Systat Software, Inc. San Jose, CA USA) was used for all culture kinetic graphs.

Dry biomass determination

Dry biomass concentration (g L^{-1}) was calculated by using a calibration curve (Landázuri et al. 2009) (Eq. 1).

$$X = 1.1726 * \text{Abs}_{\lambda 600\text{nm}} R^2 = 0.9870, \quad (1)$$

where X is the g L^{-1} dry biomass and $\text{Abs}_{\lambda 600\text{nm}}$ is the absorbance at 600 nm. Later, X (g L^{-1}) was transformed to $\text{Ln}(X/X_0)$.

Supernatant concentration

The supernatant obtained from 10 L bioreactor was centrifuged at $8000 \times g$ and filtered through Whatman No. 3 paper, followed by filtration through Sartopore[®]2 (pore size: 0.45/0.2 μm heterogeneous PES double layer, Sartorius). The filtrate was ultrafiltered using Vivaflow-200, 100,000, and 10,000 MWCO PES cross flow cassettes (Sartorius), and the concentrate rPOXA 1B was stored at 4 °C until use.

Before and after each step, the following were measured: volume (mL), pH, enzyme activity (U L^{-1}), and protein concentration (mg mL^{-1}). Specific activity (U mg^{-1}) was also calculated. A fraction of the enzyme concentrate was used for pH and temperature stability, and to determine K_M and V_{max} enzyme kinetic parameters, as well as zymogram functional activity.

Functional identification of the enzyme

The zymogram was carried out in 12% (w/v) native-PAGE under non-denaturing conditions. Enzyme activity or functionality was visualized in the gel by 0.5 M ABTS stain. A control laccase Lac[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) was used for functional enzyme detection (Morales-Álvarez et al. 2017a).

Temperature stability

Concentrated enzyme stability was evaluated by incubating for 1 h at the following temperatures: 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 °C, followed by residual laccase activity evaluation. All measurements were carried out at least three times (Morales-Álvarez et al. 2017a).

pH stability

To determine pH stability, the concentrated enzyme was previously incubated for 1 h at 25 °C in the absence of substrate, using Britton–Robinson buffer (Reynolds et al. 2013), with pH values in the ranges of 2.0 to 10.0 ± 0.2, then residual laccase activity was determined under standard assay conditions (Morales-Álvarez et al. 2017a). All determinations were carried out at least in triplicate.

Enzyme kinetic constants

Concentrated enzyme kinetic constants were evaluated using ABTS as a substrate in a concentration ranging from 0.1 to 3 mM, in 600 mM sodium acetate buffer, pH 4.5 ± 0.2. For all assays, 800 µL concentrated enzyme with an activity of 10.6 U L⁻¹ was used. Assays were performed at 25 °C (Morales-Álvarez et al. 2017a). After adjusting the hyperbola using Michaelis–Menten equation, apparent K_M and V_{max} were calculated following Lineweaver–Burk linearization method (Nelson and Cox 2005), by employing the SIMFIT (V7.4.6) software (Burquillo et al. 2003). All kinetic assays were performed in triplicate.

Determination of total residual reducing sugar concentration

Total residual reducing sugar concentrations were determined for each sample in triplicate. To this end, 3,5-dinitrosalicylic acid was used (Miller 1959). A standard curve was prepared with values ranging from 0.1 to 5 g L⁻¹ D-glucose and values were calculated according to Eq. 2.

$$y = 0.6181x - 0.048; R^2 = 0.9984. \quad (2)$$

Total extracellular protein concentration

For each sample residual protein was determined by measuring direct absorbance (Abs) at 280 nm, using UV–Vis NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific).

Enzyme activity assay

Laccase enzyme activity was monitored by a change in absorbance at 436 nm ($\epsilon_{436} = 29,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) due to ABTS oxidation in a 60 mM sodium acetate buffer (pH 4.5 ± 0.2). 800 µL sample was added to 100 µL 600 mM sodium acetate buffer and 100 µL 0.5 mM ABTS at room temperature (25 °C). Green radical formation was evaluated spectrophotometrically for 3 min. A unit of activity is defined as the quantity of enzyme required for oxidizing 1 µmol of ABTS in 1 min. Blank solution contained 800 µL distilled water, 100 µL 600 mM sodium acetate buffer solution, and 100 µL 5 mM ABTS. Enzyme activity was expressed as U L⁻¹ (Tinoco et al. 2001).

Specific activity was calculated by dividing enzymatic activity for each hour of culture by total extracellular protein concentration (Eq. 3).

$$\text{Spec. Act.} = \frac{\text{Enz. Act.}}{\text{Prot. Conc.}}, \quad (3)$$

where Act. Enz. = U L⁻¹, Prot. Conc. = mg mL⁻¹

Productivity, enzyme activity production per hour (UL⁻¹ h⁻¹), was calculated by using Eq. 4:

$$P_{\text{Enz.}} = \frac{\text{Enz. Act.}}{\text{Time}}. \quad (4)$$

Results

Plackett–Burman experimental design

Plackett–Burman experimental design was implemented to evaluate the primary effect of the seven factors assayed on extracellular enzyme activity. Treatments (T₄ and T₁₁) were distinctive with enzyme activity greater than 1200 U L⁻¹ (Fig. 1).

From 72 h of culture and onward, laccase enzyme activity for treatments T₄ and T₁₁ exceeded 451.08 ± 6.46 U L⁻¹: results obtained in a previous work (Rivera-Hoyos et al. 2015), (Fig. 1). The tendency was similar for specific activity. Statistical results for T₁₁ at 168 h (best treatment) of culture are shown in Table 1; parameters include central point information (curvature) and regression model (unadjusted).

Table 1 depicts the influence of different factors on enzyme activity after applying a hierarchical model. This

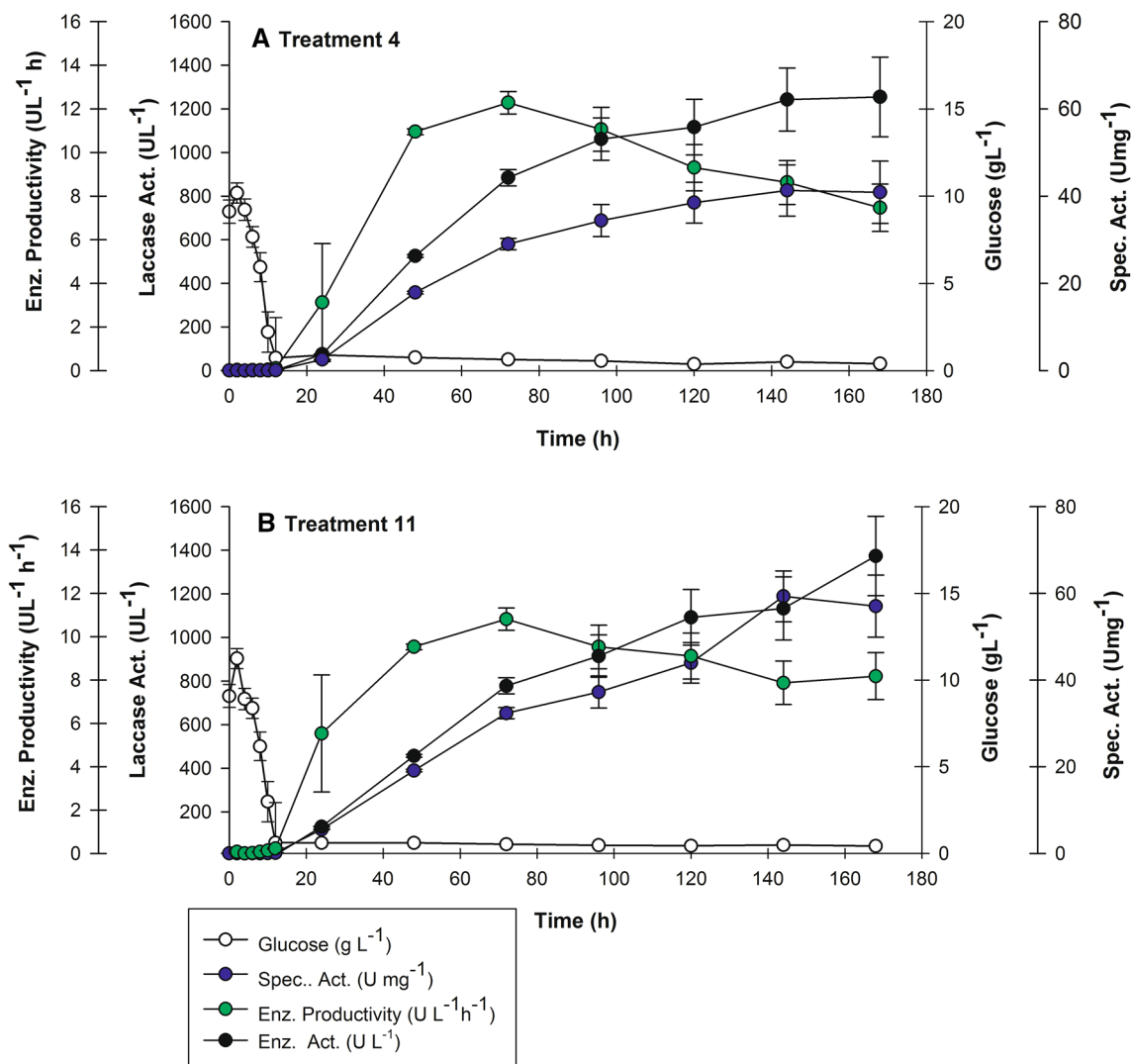


Fig. 1 Plackett-Burman Experimental Design (PBED). a T₄ kinetic performance. b T₄ kinetic performance (Table 2)

resulted in the removal of factors A, B, D, E, and F from the model. The polynomial equation representing laccase activity was (Eq. 5):

$$\text{Enz. Act.}_{168\text{h}} = 975.36 + 152.02 \times C + 148.75 \times G. \quad (5)$$

A comparison among observed enzyme activity results and model predicted enzyme activities are detailed in Table 2.

One-factor experimental design

Results employing PBED allowed to formulate OFED (Table 1). After 168 h of culture, laccase enzyme activity from assays performed at level (− 1) had an activity of $961.43 \pm 72.40 \text{ U L}^{-1}$ with 10 g L^{-1} yeast extract. The highest enzyme activity observed ($1343.52 \pm 40.30 \text{ U L}^{-1}$) was for level (0) with 15 g L^{-1} yeast extract. Last, level

(+ 1) had an enzyme activity of $1251.37 \pm 30.65 \text{ U L}^{-1}$ with 20 g L^{-1} yeast extract. Figure 2 presents the kinetics at level (0) with 15 g L^{-1} yeast extract. It is noteworthy that the initial glucose concentration (10 g L^{-1}) was depleted for the three experiments during the first 12 h of culture, as was observed in PBED.

One-factor experimental design results are shown in Table 3, and as observed the quadratic model was significant.

Enzyme activity of 1365.67 U L^{-1} with desirability of 0.9860 could be obtained maintaining all factors and increasing yeast extract to 16.53 g L^{-1} (an additional 1.53 g), as predicted by the OFED. In comparison to the experimental activity observed, this would imply an increase in only 22.15 U L^{-1} . Statistical results for both PBED and OFED are illustrated in Table 4.

Table 1 Laccase activity for T₁₁ treatment at 168 h of culture

Statistical and kinetic parameters			Unadj.
Model analysis of ANOVA			
Time of culture (h)			168
Model <i>p</i> value			0.0158*
Model <i>F</i> value			5.8000
Lack of fit <i>p</i> value			0.4022
Lack of fit <i>F</i> value			1.5300
<i>R</i> ²			0.4718
Adj. <i>R</i> ²			0.3905
Pred. <i>R</i> ²			0.2325
Adeq. precision			6.4240
<i>R</i> ² -adj. <i>R</i> ²			0.0813
Factor	Effect	<i>p</i> value	Contribution percent
A—culture media volume	116.33	0.4697**	3.540
B—CuSO ₄	− 14.79	0.9255	0.057
C—inoculum	304.04	0.0300*	24.170
D—glucose	− 11.95	0.9398	0.037
E—(NH ₄) ₂ SO ₄	19.62	0.9013	0.100
F—peptone	18.20	0.9084	0.087
G—yeast extract	297.50	0.0331*	23.140

In the PBED, an ANOVA was performed to determine the effect of every variable on laccase activity. In addition, effect and contribution percent were also estimated

*Significant at 97%; **significant at 53%; other factors had less than 10% of significance

Production at 10 L bioreactor scale containing 6 L of effective work volume

The media obtained from OFED (Table 4) was used to perform rPOXA 1B kinetics at 10 L bioreactor scale (triplicate). Figure 3 illustrates the average kinetics of three production lots.

As observed for the PBED results, the highest glucose consumption was detected at 12 h (Fig. 5). In contrast, biomass cellular growth (g L⁻¹) expressed as Ln (*X*/*X*₀) displayed two exponential growth phases. A specific growth rate ($\mu_x = 0.10 \text{ h}^{-1}$) and a duplication time *T*_d of 7 h characterized the first phase (0–12 h of culture). The second exponential phase started once residual glucose was depleted (12–192 h) with a specific growth rate of $\mu_x = 0.006 \text{ h}^{-1}$ and *T*_d = 110 h. However, laccase activity and specific activity increased exponentially from 0 to 192 h, with values of $3159.93 \pm 498.90 \text{ UL}^{-1}$ and $79.28 \pm 14.70 \text{ U mg}^{-1}$, respectively. At this scale of production, once glucose was depleted, the highest enzyme activity and biomass were produced.

Supernatant concentration

Figure 4 demonstrates the average concentration of three rPOXA 1B produced lots in 10 L bioreactor, using OFED improved media.

Functional enzyme identification

P. pastoris rPOXA 1B laccase functional identification was performed by zymogram (native PAGE) using ABTS as a developing agent (Fig. 5a).

Temperature and pH stability

Concentrated rPOX 1B laccase was exposed for 1 h to different temperatures and pH values to evaluate residual enzyme stability (Fig. 5b).

Kinetic constants

Last, enzyme kinetics were characterized using ABTS as a substrate as shown in Fig. 5c, Table 5, Eq. 6. Moreover, assay conditions were used to calculate maximum velocity values (*V*_{max}) and substrate affinity or Michaelis constant (*K*_M) for enzyme concentrates obtained from the supernatant:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} = \frac{3.163 \times 10^{-2}[S]}{1.716 + [S]}, \quad (6)$$

where *V*₀ is the initial velocity, *V*_{max} is the maximum reaction rate, *K*_M is the Michaelis constant, and [*S*] is the substrate concentration.

Table 2 PBED matrix comparison between T₄ and T₁₁ for the observed and predicted results

Treatment	Factor type	Volume of culture media (mL)	CuSO ₄ (mM)	Inoculum (% v/v)	Glucose (% L ⁻¹)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (mM)	Peptone (g L ⁻¹)	Yeast extract (g L ⁻¹)	Observed Enz Act. (U L ⁻¹) 168 h	Predicted Enz Act. (U L ⁻¹) 168 h
T ₄	Factorial	150	1	10	10	20	20	10	1254.270	1276.130
T ₁₁	Factorial	300	1	10	10	5	10	10	1373.720	1276.130
Center point		225	0.55	6	20	12.5	15	7.5	1151.880	975.363
Center point		225	0.55	6	20	12.5	15	7.5	1275.600	975.363
Center point		225	0.55	6	20	12.5	15	7.5	1339.590	975.363

Defined center points as consequence of factors influencing laccase activities. Factors at two levels in addition to a center point, as described in “Materials and methods”

Discussion

Plackett–Burman experimental design (PBED)

In comparison with previous work, all treatments exceeded 451.08 ± 6.46 U L⁻¹ enzyme activity (Rivera-Hoyos et al. 2015). The highest laccase activities were $1,254.27 \pm 0.37$ U L⁻¹ and $1,373.72 \pm 0.37$ U L⁻¹ for the most promising treatments T₄ and T₁₁, respectively (Fig. 1, Table 3), representing a 3.1-fold increase in comparison with our previous report (Rivera-Hoyos et al. 2015). However, productivity (based on enzyme activity) for the selected treatments T₄ and T₁₁ reached their highest values at 72 h of culture with 12.28 (U L⁻¹ h⁻¹) and 10.81 (U L⁻¹ h⁻¹), respectively (Fig. 1).

ANOVA for PBED statistical design can be presented in two ways, as an adjusted or unadjusted model. For an adjusted model, the central point information (curvature) is separated from the regression model. For the unadjusted model, the central points (curvature) are included within the regression model. We selected an unadjusted model to calculate standard deviation from the curvature (central points) and to decrease the number of replicas in treatments, assuming for all treatments the SDs of the curvature (central points).

For an unadjusted model, if the curvature is significant, the prediction of factorial points would be partially higher or lower depending on additional information given by the central points. If so, because the quadratic coefficients required to model the curvature are indistinguishable among themselves, the curvature could not be modeled, and the sum of squares (SS) of the curvature would be included in the SS lack of fit. Last, if the curvature is significant, this model would not be appropriate to perform a prediction.

In our case, the hierarchical model was significant for all analyzed hours for the unadjusted model curvature (Table 1). However, at 72 h, despite productivity “based on enzyme activity” being the highest (Fig. 1), the lack of fit *p* value was significant, thus indicating discontinuing the analysis. A comparison of the remaining hours of production suggested that the most significant *p* value observed was at 168 h, where lack of fit was not significant. At 168 h difference between *R*² and Adj. *R*² was the lowest comparing the difference among different hours of culture. Therefore, 168 h was selected as an adequate time point to analyze the main effect all factors would have on enzyme activity (Table 1).

For unadjusted model, an *F* value of 5.8 suggested that the model was significant (Table 1) and there would only be a 1.58% possibility for a greater *F* value due to noise in the experiment. A lack of fit *F* value of 1.53 implied it was not significant in relation to pure error. In addition, there would be a 40.22% probability that such large *F* value lack of fit

Fig. 2 One Factor experimental design (OFED). Level (0) kinetic results (only determined at 0, 96, 120, 144, and 168 h of culture) [OFED-15 g L⁻¹ de yeast extract: 500 mL Erlenmeyer flask (300 mL EWV of culture media, 10 % (v/v) inoculum, 1 mM CuSO₄, 10 g L⁻¹ glucose, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 20 g L⁻¹ peptone, 15 g L⁻¹ yeast extract), Enzyme activity 1,343.52 ± 40.30 U L⁻¹ at 168 h of culture]

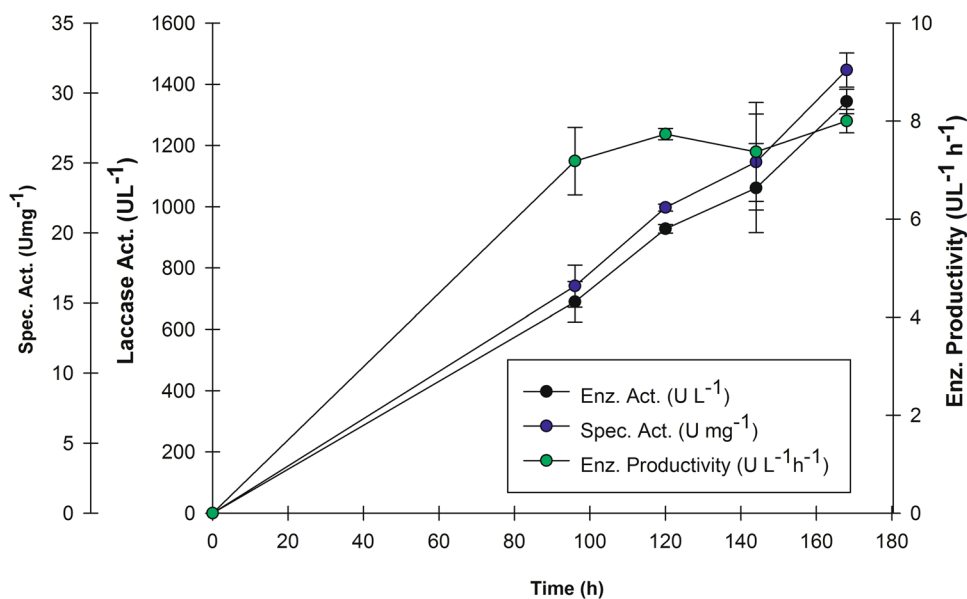


Table 3 Effect of yeast extract concentration on laccase activity as determined by OFED (ANOVA)

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	p value Prob > F
Model	1.59E+08	2	79512.89	30.56	0.0101
A—yeast extract	90185.85	1	90185.85	34.66	0.0098
A ²	74965.36	1	74965.36	28.81	0.0127
Pure error	7805.45	3	2601.82		
Cor total	1.67E+08	5			
R ²	0.9532				
Adj. R ²	0.9220				
Pred. R ²	0.8129				
Adeq. precision	10.5930				

Significant terms are presented in bold

could occur due to noise; therefore, a non-significant lack of fit is good for the model.

On the other hand, a predicted R² of 0.2325 was in agreement with the Adj. R² of 0.3905, since the difference between them was less than 0.2 (Table 1). Moreover, Adeq. Precision indicates the ratio signal/noise greater than 4 is desirable. For our case, estimated Adeq. Precision was 6.424; thus, this model could be used to navigate the design space.

To further continue improving the culture media and taking into account the obtained results (Table 1), the following factors were maintained: A at 300 mL, B at 0.1 mM, D at 10 g L⁻¹, E at 20 mM, and F at 20 g L⁻¹. Factors C had a positive contribution effect of 24.17% and G of 23.14%, suggesting that in a future statistical design they should

be assayed at higher concentrations. However, for factor C, 10% (v/v) inoculum has already been tested, representing 30 mL for the next experimental design. Implementing such an increase in volume would not be practical; thus, we decided to continue with factor C at 10% (v/v), despite its significance.

Prediction for T₁₁ did not exceed the obtained result. In contrast, T₄ prediction slightly exceeded observed enzyme activity, but was only 7% less than the observed value for T₁₁ (Table 2). The only remaining significant factor was G (yeast extract), with a percentage contribution of 23.14%. It was decided to perform a three-level one-factor statistical design with (-1, 0, +1) at 10, 15, and 20 g L⁻¹ with a duplicate to improve enzyme activity.

Culture media volume (factor A) in PBED was significant at 53% with a 3.54% positive effect on enzyme activity (U L⁻¹), (Table 1). In light of Table 4 results, and taking into account PBED is a screening method and does not value interactions among factors, it is necessary to expand the model's navigation area by increasing Factor A (culture media volume), since it might have an association with the surface for oxygen transfer, as well as interactions with other assayed factors.

It is noteworthy to highlight PBED improved the media in comparison with previous experiments (Rivera-Hoyos et al. 2015), as CuSO₄ (important for enzyme activity) was increased, as well as (NH₄)₂SO₄ (a valuable inorganic nitrogen source). In contrast, peptone and yeast extract were decreased (organic nitrogen sources). Additionally, volume within the shake flask was also increased, which could be associated with decreased surface for oxygen transfer.

Table 4 PBED and OFED result summary

Factor	Previous result	Experimental design	
		PBED	OFED
EWV (mL)	100	300	300
Ratio media vol/flask vol.	1/5	3/5	3/5
Inoculum % (v/v)	2.0	10.0	10.0
CuSO ₄ (mM)	0.0	1.0	1.0
Glucose (g L ⁻¹)	20.0	10.0	10.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (mM)	0.0	5.0	20.0
Peptone (g L ⁻¹)	20.0	10.0	20.0
Yeast extract (g L ⁻¹)	10.0	10.0	15.0
Time of culture (h)	144	168	168
Enzyme activity (U L ⁻¹)	451.08 ± 6.46	1373.72 ± 0.37	1343.52 ± 40.30
Reference	(Rivera-Hoyos et al. 2015)	Present study	

Factors evaluated for both experimental designs are presented and compared with a previous study (Rivera-Hoyos et al. 2015)

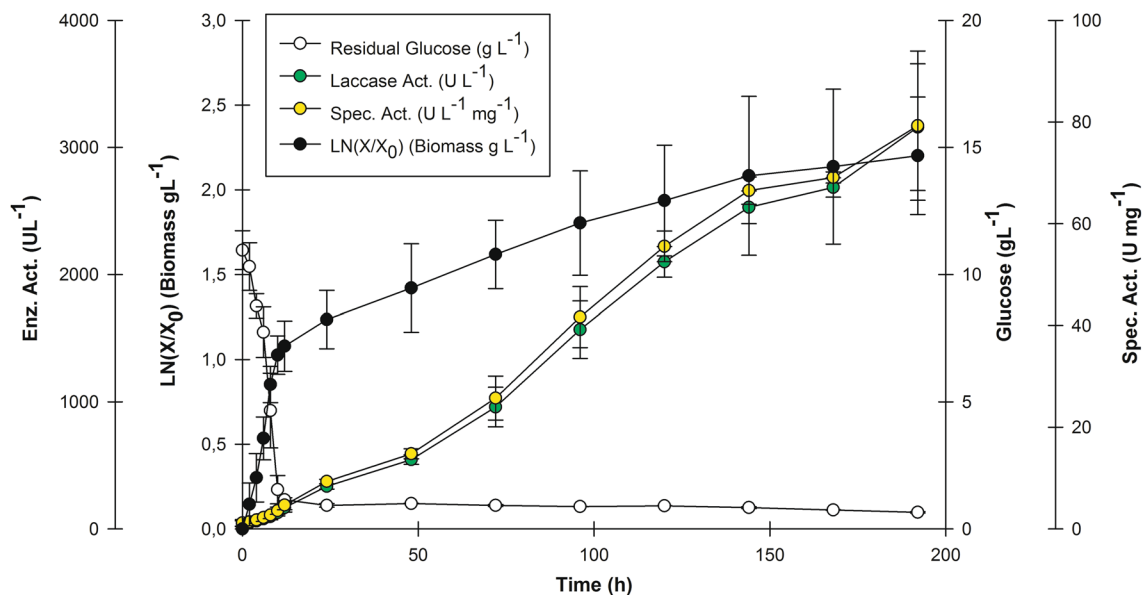


Fig. 3 rPOXA 1B kinetics at 10 L bioreactor scale (6 L EWV). Residual glucose, biomass' Ln (g L⁻¹), laccase activity (U L⁻¹), and enzyme specific activity (U mg⁻¹)

One-factor experimental design

ANOVA for one-factor design (Table 3) demonstrated with an F value of 30.56 the model was significant and there would only be a 1.01% possibility of a greater F value due to noise. On the other hand, Pred. R^2 of 0.8129 was in agreement with an Adj. R^2 of 0.9220, since the difference between them was less than 0.2. Estimated Adeq. Precision was 10.5930, which is an adequate statistical signal (Table 3).

One-factor experimental design quadratic model statistical adjustment, reliability, and significance were

dependable for its prediction. However, when results were analyzed we decided not to assay the proposed prediction modification and to utilize 16.53 g L⁻¹ of yeast extract instead of 15.00 g L⁻¹, since the model's predicted enzyme activity was (1365.67 U L⁻¹), within the SD range from the experimentally observed enzyme activity (1343.52 ± 40.30 U L⁻¹).

When comparing enzyme activity results with the three OFED yeast extract levels, it was clear that 15 g L⁻¹ concentration was the most favorable (Fig. 2). Despite that, enzyme activity results obtained with 15 and 20 g L⁻¹ were similar to the results obtained for PBED treatments T₄ and

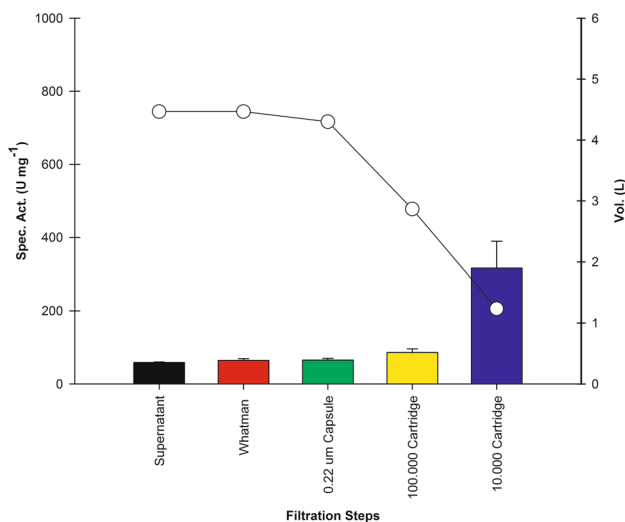


Fig. 4 Average specific activity obtained from concentrate of three lots at 10 L bioreactor scale. Color bars depict average values of specific activity, at the end of culture in a 10 L bioreactor (supernatant, black bar), followed by different concentration steps. For each step, changes in volume are illustrated (line with open circles). Since the enzyme has an approximate weight of 54.18090 kDa, the filtrate was collected (0.22) for the Whatman, capsule, and 100,000 Dalton steps, whereas for the 10,000 Dalton cassette, the concentrate was collected

T_{11} , as well as the prediction for the same model. In this study, no considerable differences were observed between the PBED and OFED for enzyme activity (Table 4), since both values were found within the same standard deviation range. Nevertheless, taking into account OFED positive effect, 53% significance, as well as PBED volume of culture contribution (Table 1), and final decrease in C/N ratio (Table 4), we decided to use the media composition obtained with OFED for 10 L bioreactor production.

Production at 10 L bioreactor scale containing 6 L of effective work volume

Changing production geometry from 500 mL Erlenmeyer flask to a 10 L bioreactor with 60% EWV and using OFED obtained media (Table 4, Fig. 3), it was feasible to increase laccase activity from 1343.52 ± 40.30 (Fig. 2) to 2684.85 ± 78.44 U L⁻¹ at 168 h, and even further increase to 3159.93 ± 498.90 U L⁻¹ after 192 h of culture (Fig. 3), representing a 2.0- and 2.4-fold increase, respectively. Moreover, specific activity was also increased with geometry change from 31.64 ± 1.22 U mg⁻¹ in agitated flask to 69.08 ± 1.10 U mg⁻¹ at 168 h culture and 79.28 ± 14.690 U mg⁻¹ at 192 h in 10 L bioreactor culture with 60% EWV (Fig. 3).

At both, shake flask and bioreactor scale, two exponential phases were observed (more evident in Fig. 3), the first one depending on glucose consumption and the second

one after residual glucose depletion. Thus, various aspects are noteworthy as follows:

- (i) Under our assay conditions, improved media required less carbon concentration source, which is peculiar since more carbon would generate more biomass, clearly related to C/N ratio.
- (ii) Under our assay conditions, improved media required an increase in media volume, interpreted as a reduction in surface required for oxygen transfer (observed at shake flask scale).
- (iii) All of the above contrast with the fact that a constitutive *pGAP* governs the optimized synthetic laccase *POXA 1B* gene expression (Rivera-Hoyos et al. 2015), suggesting enzyme should be produced during cell growth phase, ending in the exponential phase (Figs. 1 and 3). Hence, our results agree with those reported in the literature. It has been proposed that genes under *pGAP* expression are not entirely constitutive and could be regulated under certain conditions. Kern et al. (2007) studied the expression of an oxidase fused to green fluorescent protein (GFP) under *pGAP*. Among the results discussed, they mentioned GFP fluorescence markedly increased after media glucose was depleted (Kern et al. 2007). Moreover, transiently small quantities of ethanol were produced, a phenomenon suggested by other authors (Baumann et al. 2008; Vogl and Glieder 2013). In the past, some authors have discussed that alternate oxidase activity does not exert a direct influence on hexose transporters. They suggest a more reasonable plausibility is that an alternate cell energy state can induce them to an increase in glucose uptake, responsible for cell growth (Kern et al. 2007). For our particular case, it is likely that a reduced surface for oxygen transfer, associated with an increase in culture media volume is responsible for an alternate energy state in the cell, increasing in this manner glucose uptake.

However, it is important to note that yeast's observed metabolic regulation after glucose depletion was due to gluconeogenesis induction, which produces catabolites for growth and cell integrity. On the other hand, under low glucose concentration, biomass generation depends on media composition. Because there was the presence of a nitrogen source, such as peptone or yeast extract, biomass formation was favored in the present work with increased peptone and yeast extract (Table 4). Moreover, ammonium salts were also increased in the present work, an additional nitrogen source. Furthermore, when glucose is limited it has been described that Snf4 activates Snf1 kinase, a protein that phosphorylates proteins and transcriptional regulators in genes implicated

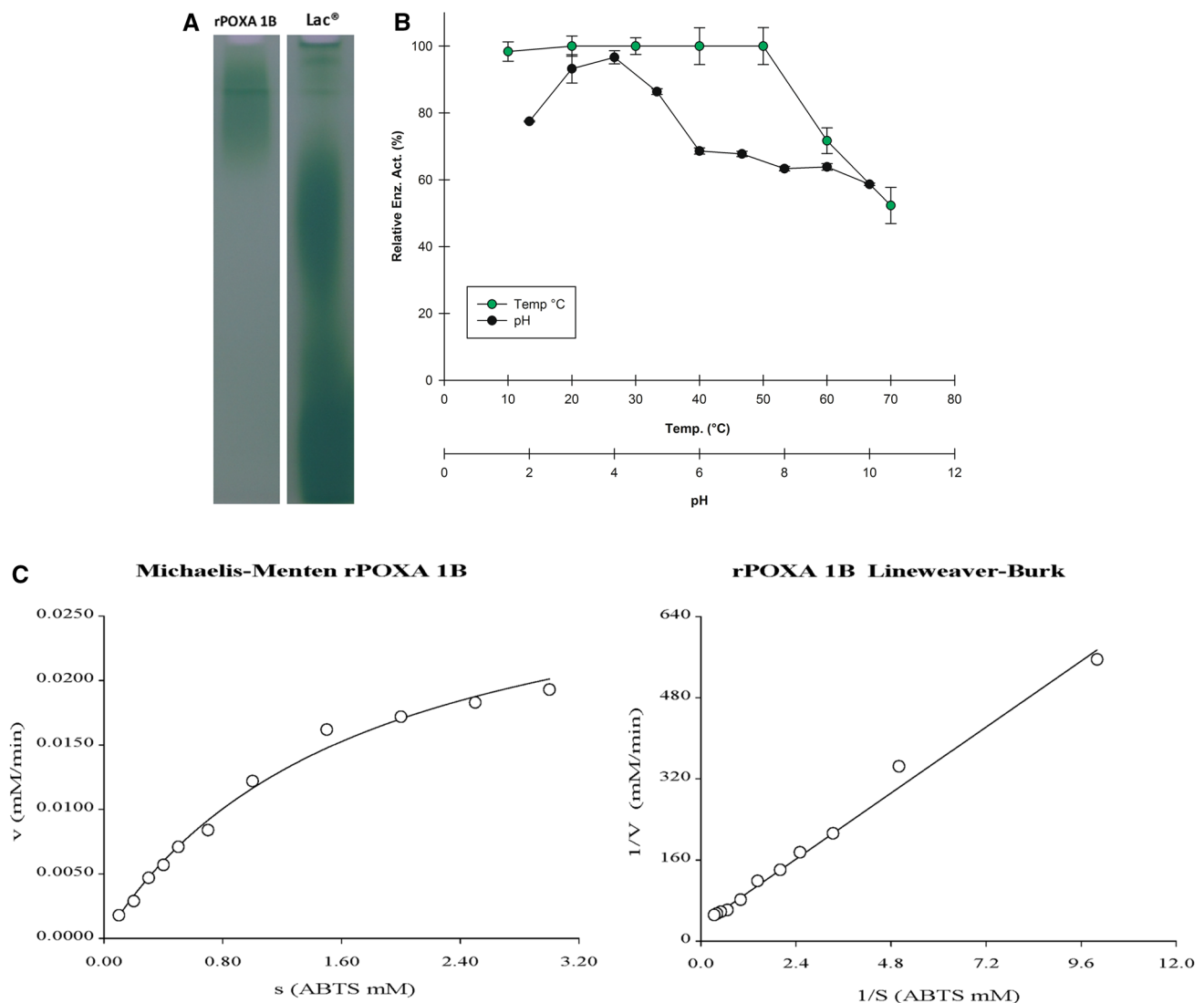


Fig. 5 rPOXA 1B concentrate characterization. **a** Zymogram (native-PAGE 12% w/v) identification of functional rPOXA 1B, developed with 0.5 M ABTS. Samples: rPOXA 1B concentrate, Lac®: Positive control Laccase Sigma-Aldrich®. **b** Temperature and pH effect on rel-

ative residual enzyme activity, all assays were performed in triplicate. Relative enzyme activity relates to the enzyme activity at the assay's starting point. **c** Concentrate of rPOXA 1B enzyme kinetic results, left. Michaelis-Menten graph and right. Lineweaver-Burk plot

Table 5 Apparent kinetic parameters. Data for rPOXA 1B using ABTS as substrate

Kinetic parameters	Standard error	Confidence limit 95%	<i>p</i>
V_{\max} (mM min ⁻¹)	3.163×10^{-2}	0.001	0.029 0.034 0.000
K_M (mM)	1.716	0.121	1.440 1.990 0.000

in alternative carbon source use, such as gluconeogenesis, respiration, transport, meiosis, and response to stress (Lin et al. 2001; Hedbacker and Carlson 2009).

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH enzyme, E.C. 1.2.1.12) catalyzes the

reversible phosphorylation of glyceraldehyde-3-phosphate into 1,3-biphosphoglycerate, essential for energy metabolism, thus controlling *pGAP* expression. Giardina and Chiang (2013) evaluated in *S. cerevisiae* different enzymes expressed under limited glucose conditions, specifically GAP, participating in glycolytic and gluconeogenic pathways. They evidenced high enzyme activity, demonstrating the importance of this gene under glucose-limited conditions.

Table 6 presents fungal laccase activities expressed in *P. pastoris* from different origins (publications dated from 1997 to 2017), highlighting volume in which production was performed and activity. As can be observed, pAOX1 resulted in the highest activities. In our opinion, it presents a higher risk

Table 6 *P. pastoris* (batch culture) fungal laccase activities from different origins, dated from 1997 to 2017

Origin	Laccase	<i>P. pastoris</i> strain	Enz. Act. (UL ⁻¹)	Culture volume (L)	Time of culture (days)	Promoter	Refs
<i>Pleurotus ostreatus</i>	POXA1B	X33	1373.72	0.30	7	GAP	Present work
<i>Pleurotus ostreatus</i>	POXA1B	X33	3159.93	6	8	GAP	Present work
<i>Ganoderma lucidum</i>	GILCC1	X33	4.69	0.15	7	GAP	(Morales-Álvarez 2017a)
<i>Coriolopsis gallica</i>	LcCg	X33	250	0.50	12	AOX	(Avelar et al. 2017)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	POXA1B	X33	451.08	0.10	6.5	GAP	(Rivera-Hoyos et al. 2015)
<i>Ganoderma lucidum</i>	GILCC1	X33	0.13	0.10	6.5	GAP	(Rivera-Hoyos et al. 2015)
<i>Trametes trogii</i> BAFC 463	lcc3	GS115	5740	Shake flask	–	AOX	(Campos et al. 2016)
<i>Trametes versicolor</i>	lccA	X33	11,972	5	16	AOX	(Li et al. 2014)
<i>Coprinus comatus</i>	lac3/lac4	KM71H	689/1465	0.05	15	AOX	(Gu et al. 2014)
<i>Trametes versicolor</i>	LAC5	X33	14	0.04	5	AOX	(Nishibori et al. 2013)
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	LAC2	X33	100	0.04	5	AOX	(Nishibori et al. 2013)
<i>Botrytis aclada</i>	BaLac	X33	53,300	2.50	3	GAP	(Kittl et al. 2012)
<i>Botrytis aclada</i>	BaLac	X33	51,000	0.40	4	AOX	(Kittl et al. 2012)
<i>Trametes</i> sp.	LacB	GS115	32,000	–	13	AOX	(Li et al. 2007)
<i>Trametes</i> sp. 420	lacD	GS115	83,000	0.03	–	AOX	(Hong et al. 2007)
<i>Trametes versicolor</i>	Lcc1/Lcc2	SMD1168	1.30	–	7	GAP	(Bohlin et al. 2006b)
<i>Trametes trogii</i>	LccI	GS115	2520	2	8	AOX	(Colao et al. 2006)
<i>Trametes</i> sp.	rLacA	GS115	5470	0.03	13	AOX	(Hong et al. 2006)
<i>Fomes lignosus</i>	lcc	GS115	9030	–	2	GAP	(Liu et al. 2003)
<i>Trametes versicolor</i>	LccIV	GS115	1500	5	4	AOX	(Brown et al. 2002)
<i>Trametes versicolor</i>	lcc1	SMD1168	140,000	2.50	9	AOX	(Hong et al. 2002)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	lac4	GS115 and KM71	10,200	0.015	5	AOX	(Soden et al. 2002)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	lac1	X33	20	0.050	10	AOX	(Otterbein et al. 2000)

and is environmentally unfavorable, since it requires methanol addition. Furthermore, it can increase production costs, since it must be guaranteed methanol will not be employed for contaminated effluent treatment. We highlight *Fomes lignosus* laccase expression using pGAP, with elevated activities (production volume was not described). Additionally, *Botrytis aclada* laccase activity was also elevated using pGAP in a 2.5 L volume. On the other hand, laccase activity is influenced by the substrate employed (ABTS, guaiacol, etc.) and the reaction buffer (acetate, citrate, etc.). In this sense, our results are promising, as they are within the range of most of the previously published data.

Enzyme concentration

Concentration steps allowed to increase rPOXA 1B specific activity by 5.3-fold, from 147.11 ± 7.24 U mg⁻¹ (average obtained from the centrifuged supernatant) to

782.48 ± 90.20 U mg⁻¹ (average obtained in final concentrate), with a 3.6-fold volume reduction (Fig. 4).

Functional identification of the enzyme

The zymogram allowed functional identification of the enzyme when it oxidized ABTS, generating a green stain (Fig. 5a). Additionally, for rPOXA 1B enzyme only one band was observed, with no additional bands whether larger or smaller; additional bands were observed for the concentrated enzyme, the native fungus or control laccase, suggesting the enzyme retained its monomeric nature as reported by Giardina et al. (1999).

Temperature and pH stability

Stability studies demonstrated *P. ostreatus* rPOXA 1B concentrated enzyme expressed in *P. pastoris* X33 was stable between 10 and 50 °C and retained more than 70%

of its residual enzyme activity at 60 °C and 50% at 70 °C. Regarding pH stability, rPOXA 1B was more stable at pH 4.0 ± 0.2 with a residual enzyme activity greater than 90%, while at pH 3.0 ± 0.2 or less and greater than pH 5.0 ± 0.2 it was less stable under assay conditions. However, the lowest residual enzyme activity observed was approximately 60% at pH 10.0 ± 0.2 . Our results agree with those reported by Giardina et al., (1999). In their study, they worked with purified laccase isoenzyme from *P. ostreatus*. Their highest activity described was at acid pH 3.0 ± 0.2 and temperatures ranging between 20 and 50 °C (Giardina et al. 1999), in agreement with our results. Taking into consideration temperature and pH stability, it is relevant to point out rPOXA 1B was more stable in comparison with other *P. ostreatus* isoenzymes (POXA 1 W, POXA2, POXC), characterized in previous studies (Giardina et al. 1999).

Kinetic constants

Whether of fungal or bacterial origin, different laccase K_M values present a broad spectrum and can differ even with the same substrate. Nevertheless, for the most part a higher affinity toward ABTS has been reported in comparison with substrates such as syringaldazine or guaiacol, among others. These substrates can be oxidized at a lower velocity with higher Michaelis constants (Manavalan et al. 2013; Patel et al. 2014; Liu et al. 2015). For laccases using ABTS as a substrate, a V_{max} of $3.163 \times 10^{-2} \text{ mM min}^{-1}$, K_M of 1.716 mM was calculated and found within the values previously reported by others (Manavalan et al. 2013; Gu et al. 2014; Li et al. 2014; You et al. 2014; Liu et al. 2015; Park et al. 2015).

Major and minor differences among other laccase kinetic parameters and ours could be accounted by different factors, where the efficiency of the catalytic process could not only be affected by the enzyme's intrinsic characteristics, but also by reaction-specific factors, such as complex reactions with various steps involved in the process (Nelson and Cox 2005). Even a minimum variation in the sequence could play an important role in substrate–enzyme interaction and its oxidation, thus highlighting the importance of molecular characterization for the enzyme of interest. Considerable amount of data is necessary to comparatively determine if the difference present among similar laccases is directly related to gene sequences, or if they obey posttranslational modifications, gathered for instance from culture or purification conditions.

The importance of this work resides in statistically significant improved conditions for culture media production. Furthermore, the obtained concentrated enzyme was demonstrated to be stable in a wide range of pH values and

temperatures, even though laccase origin is from a mesophilic organism. Therefore, establishing a recombinant enzyme can be done under extreme conditions.

Conclusion

In this work, we improved culture media for rPOXA 1B laccase production by a 2.4-fold increase at 10 L bioreactor in 192 h of culture. Furthermore, POXA 1B was functionally identified by zymography. Moreover, pH stability analysis revealed that the enzyme was more stable at pH 4.0 ± 0.2 , with a relative enzyme activity maintained over 60% in a wide range of pH. Regarding temperature stability, it displayed a wide range between 10 and 70 °C. Kinetic parameters obtained for rPOXA 1B showed the enzyme's affinity for ABTS substrate, which is in the range reported for other laccases. rPOXA 1B expressed in *P. pastoris* when using improved culture media, under our experimental conditions, is definitively a promising enzyme for several applications involving a wide range of temperatures and pH values.

Acknowledgements This research was funded by the following grants: Grant ID: 00005575 (Correlación entre la expresión constitutiva la concentración de proteína y la actividad biológica de las lacasas recombinantes POXA1 B de *Pleurotus ostreatus* y GLlac 1 de *Ganoderma lucidum* en *Pichia pastoris*); Grant ID: 00006337 (Optimización del medio de cultivo para producción de la lacasa recombinante POXA 1B de *Pleurotus ostreatus* en *Pichia pastoris*) from Pontificia Universidad Javeriana; Grant ID: 00006169 (Joven Investigador Colciencias 2014), Bogotá, D.C. Colombia; Grant ID: 00007885 (Estudio de la estabilidad a tiempo real del concentrado de la lacasa rPOXA 1B de *Pleurotus ostreatus* producida en *Pichia pastoris*) from Pontificia Universidad Javeriana. The financing entity had no role in the study design, data collection, or analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors thank Fiona Raikes and María Lucía Gutiérrez, Ph.D., for English editing.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare they have no competing interests.

References

- Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra K-H, Cavaco-Paulo A, GuBitz GM (2000) Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl Environ Microbiol* 66(8):3357–3362. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3357-3362.2000>
- Avelar M, Olvera C, Aceves-Zamudio D, Luis Folch J, Ayala M (2017) Recombinant expression of a laccase from *Corioliopsis gallica* in *Pichia pastoris* using a modified α -factor preproleader. *Protein Expr Purif* 136:14–19
- Baumann K, Maurer M, Dragosits M, Cos O, Ferrer P, Mattanovich D (2008) Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases

- specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnol Bioeng* 100(1):177–183
- Bohlin C, Johnson LJ, Roth R, Van Zyl WH (2006a) Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger*. *Appl Biochem Biotechnol* 129–132:195–214. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-268-7_15
- Bohlin C, Jonsson LJ, Roth R, Van Zyl WH (2006b) Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger*. *Appl Biochem Biotechnol* 129–132:195–214
- Brooks MR, Crowl DA (2007) Flammability envelopes for methanol, ethanol, acetonitrile and toluene. *J Loss Prev Process Ind* 20:144–150
- Brown MA, Zhao Z, Mauk AG (2002) Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. *Inorg Chim Acta* 331:232–238. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(01\)00814-3](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(01)00814-3)
- Burquillo FJ, Holgado M, Bardsley WG (2003) Uso del paquete estadístico SIMFIT en la enseñanza del análisis de datos en ciencias experimentales. *J Sci Educ* 4(1):8–14
- Camarero S, García O, Vidal T, Colom J, del Río JC, Gutiérrez A, Gras JM, Monje R, Martínez MJ, Martínez ÁT (2004) Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme Microb Technol* 35:113–120. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.10.019>
- Campos PA, Levin LN, Wirth SA (2016) Heterologous production, characterization and dye decolorization ability of a novel thermostable laccase isoenzyme from *Trametes trogii* BAFC 463. *Process Biochem* 51:895–903
- Çelik E, Çalık P (2012) Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol Adv* 30:1108–1118
- Colao MC, Lupino S, Garzillo AM, Buonocore V, Ruzzi M (2006) Heterologous expression of lcc1 gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Microb Cell Fact* 5:1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-31>
- Cos C, Ramón R, Montesinos JL, Valero F (2006) Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microb Cell Fact* 5:17. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-17>
- GaMB Soares, Pessoa de Amorim MT, Costa-Ferreira M (2001) Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. *J Biotechnol* 89:123–129. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00302-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00302-9)
- García HA, Hoffman CM, Kinney KA, Lawler DF (2011) Laccase-catalyzed oxidation of oxybenzone in municipal wastewater primary effluent. *Water Res* 45:1921–1932. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.12.027>
- Gelo-Pujic M, Hyung-Han K, Butlin NG, Palmore GTR (1999) Electrochemical studies of a truncated laccase produced in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol* 65:5515–5521
- Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Faraco V, Cennamo G, Sannia G (1999) Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem J* 341:655–663
- Gómez-Méndez LD, Moreno-Bayona DA, Poutou-Piñales RA, Salcedo-Reyes JC, Pedroza-Rodríguez AM, Vargas A, Bogoya JM (2018) Biodeterioration of plasma pretreated LDPE sheets by *Pleurotus ostreatus*. *PLoS One* 13(9):e0203786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203786>
- Gu C, Zheng F, Long L, Wang J, Ding S (2014) Engineering the expression and characterization of two novel laccase isoenzymes from *Coprinus comatus* in *Pichia pastoris* by fusing an additional ten amino acids tag at N-terminus. *PLoS One* 9(4):e93912. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093912>
- Hedbacker K, Carlson M (2009) SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci* 13:2408–2420
- Hong F, Meinander NQ, Jönsson LJ (2002) Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* 79(4):438–449
- Hong Y, Xiao Y, Zhou H, Fang W, Zhang M, Wang J, Wu L, Yu Z (2006) Expression of a laccase cDNA from *Trametes* sp. AH28-2 in *Pichia pastoris* and mutagenesis of transformants by nitrogen ion implantation. *FEMS Microbiol Lett* 258:96–101
- Hong Y-z, Zhou H-m, Tu X-m, Li J-f, Xiao Y-z (2007) Cloning of a laccase gene from a novel Basidiomycete *Trametes* sp. 420 and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Curr Microbiol* 54:260–265
- Hou H, Zhou J, Wang J, Du C, Yan B (2004) Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochem* 39:1415–1419. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00267-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00267-X)
- Kern A, Hartner FS, Freigassner M, Spielhofer J, Rumpf C, Leitner L, Frohlich KU, Glieder A (2007) *Pichia pastoris* “just in time” alternative respiration. *Microbiology* 153(4):1250–1260. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/001404-0>
- Kittl R, Mueangtoom K, Gonaus C, Khazaneh ST, Sygmund C, Haltrich D, Ludwig R (2012) A chloride tolerant laccase from the plant pathogen ascomycete *Botrytis aclada* expressed at high levels in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 157:304–314
- Landázuri P, Poutou-Piñales RA, Acero-Godoy J, Córdoba-Ruiz HA, Echeverri-Peña OY, Sáenz H, Delgado-Boada JM, Barrera-Avellaneda LA (2009) Cloning and shake flask expression of hrIDS-Like in *Pichia pastoris*. *Afr J Biotech* 8(12):2871–2877
- Li JF, Hong YZ, Xiao YZ, Xu YH, Fang W (2007) High production of laccase B from *Trametes* sp. in *Pichia pastoris*. *World J Microbiol Biotechnol* 23:741–745. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9286-2>
- Li Q, Pei J, Zhao L, Xie J, Cao F, Wang G (2014) Overexpression and characterization of laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Microbiol* 50(2):140–147. <https://doi.org/10.1134/S0003683814020124>
- Lin SS, Manchester JK, Gordon JI (2001) Enhanced gluconeogenesis and increased energy storage as hallmarks of aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 276(38):36000–36007
- Liu W, Chao Y, Liu S, Bao H, Qian S (2003) Molecular cloning and characterization of a laccase gene from the basidiomycete *Fame lignosus* and expression in *Pichia pastoris*. *App Microbiol Biochem* 63(2):174–181
- Liu H, Cheng Y, Du B, Tong C, Liang S, Han S, Zheng S, Lin Y (2015) Overexpression of a novel thermostable and chloride-tolerant laccase from *Thermus thermophilus* SG0.5JP17-16 in *Pichia pastoris* and its application in synthetic dye decolorization. *PLoS One* 10(3):0119833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119833>
- Majeau J-A, Brar SK, Tyagi RD (2010) Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresour Technol* 101(7):2331–2350. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.087>
- Manavalan T, Manavalan A, Thangavelu KP, Heese K (2013) Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum*. *Biochem Eng J* 70:106–114. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.10.007>
- Miller G (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31(3):426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Morales-Álvarez ED, Rivera-Hoyos CM, González-Ogliastri N, Rodríguez-Vázquez R, Poutou-Piñales RA, Daza CE, Pedroza-Rodríguez AM (2016) Partial removal and detoxification of Malachite Green and Crystal Violet from laboratory artificially contaminated water by *Pleurotus ostreatus*. *Univ Sci* 21(3):259–285. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC21-3.prad>
- Morales-Álvarez ED, Rivera-Hoyos CM, Cardozo-Bernal ÁM, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM, Díaz-Rincón DJ,

- Rodríguez-López A, Alméciga-Díaz CJ, Cuervo-Patiño CL (2017a) Plackett-Burman design for rGILCC1 laccase activity enhancement in *Pichia pastoris*: concentrated enzyme kinetic characterization. *Enzyme Res*. 2017:5947581. <https://doi.org/10.1155/2017/5947581>
- Morales-Álvarez ED, Rivera-Hoyos CM, Chaparro-Núñez LE, Daza CE, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM (2017b) Decolorization and detoxification of Malachite Green by *Ganoderma lucidum*: key operating parameters and adsorption studies. *J Environ Eng* 143(4):04016093. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001180](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001180)
- Moreno-Bayona DA, Gómez-Méndez LD, Blanco-Vargas A, Castillo-Toro A, Herrera-Carlosama L, Poutou-Piñales RA, Salcedo-Reyes JC, Díaz-Ariza LA, Castillo-Carvajal LC, Rojas-Higuera NS, Pedroza-Rodríguez AM (2019) Simultaneous bioconversion of lignocellulosic residues and oxodegradable polyethylene by *Pleurotus ostreatus* for biochar production, enriched with phosphate solubilizing bacteria for agricultural use. *PLoS One* 14(5):e0217100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217100>
- Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger, principles of biochemistry, 5th edn. W.H. Freeman and Company, New York
- Nishibori N, Masaki K, Tsuchioka H, Fujii T, Iefuji H (2013) Comparison of laccase production levels in *Pichia pastoris* and *Cryptococcus* sp. S-2. *J Biosci Bioeng* 115(4):394–399
- O'Callaghan J, O'Brien MM, McClean K, Dobson AD (2002) Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29(2):55–59. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000268>
- Otterbein L, Record E, Longhi S, Asther M, Moukha S (2000) Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem* 267:1619–1625
- Park M, Kim M, Kim S, Ha B, Ro H-S (2015) Differential expression of laccase genes in *Pleurotus ostreatus* and biochemical characterization of laccase isozymes produced in *Pichia pastoris*. *Mycobiology* 43(3):280–287. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.3.280>
- Patel H, Gupte S, Gahlout M, Gupte A (2014) Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1. *3 Biotech* 4(1):77–84. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0129-1>
- Poutou RA, Amador E, Candelario M (1994) Banco de células primario (BCP): caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes. *Biocología Aplicada* 11(1):55–59
- Qing Yang X, Xia Zhao X, Yun Liu C, Zheng Y, Jun Qian S (2009) Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase. *Process Biochem* 44:1185–1189. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.06.015>
- Reynolds JE III, Josowicz M, Vegh RB, Solntsev KM (2013) Spectral and redox properties of the GFP synthetic chromophores as a function of pH in buffered media. *Chem Commun* 49(71):7788–7790. <https://doi.org/10.1039/C3CC44113J>
- Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poveda-Cuevas SA, Reyes-Guzmán EA, Poutou-Piñales RA, Reyes-Montaña EA, Pedroza-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R, Cardozo-Bernal ÁM (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):e0116524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116524.g002>
- Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Abelló-Esparza J, Buitrago-Pérez DF, Martínez-Aldana N, Salcedo-Reyes JC, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM (2018) Detoxification of pulping black liquor with *Pleurotus ostreatus* or recombinant *Pichia pastoris* followed by CuO/TiO₂/visible photocatalysis. *Sci Rep* 8:3503. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21597-2>
- Sarria-Alfonso V, Sánchez-Sierra J, Aguirre-Morales M, Gutiérrez-Rojas I, Moreno-Sarmiento N, Poutou-Piñales RA (2013) Culture media statistical optimization for biomass production of a lignolytic fungus for future rice straw degradation. *Indian J Microbiol* 53(2):199–207. <https://doi.org/10.1007/s12088-013-0358-3>
- Soden DM, O'Callaghan J, Dobson ADW (2002) Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology* 148:4003–4014
- Taha AA, Shwaish II, Mohammed AH, Haider AJ, Stamatis H (2013) Production of a laccase from *Botrytis cinerea* (DSMZ 877) and application for textile phenolic dye decolorization. *Energy Proc* 36:862–871. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2013.07.099>
- Tinoco R, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R (2001) Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Lett Appl Microbiol* 32(5):331–335. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00913.x>
- Vogl T, Glieder A (2013) Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnol* 30(4):385–404. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.11.010>
- You L-F, Liu Z-M, Lin J-F, Guo L-Q, Huang X-L, Yang H-X (2014) Molecular cloning of a laccase gene from *Ganoderma lucidum* and heterologous expression in *Pichia pastoris*. *J Basic Microbiol* 54(S1):S134–S141. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200808>
- Zeng X, Cai Y, Liao X, Zeng X, Luo S, Zhang D (2012) Anthraquinone dye assisted the decolorization of azo dyes by a novel *Trametes trogii* laccase. *Process Biochem* 47:160–163. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.10.019>
- Zouari-Mechichi H, Mechichi T, Dhoub A, Sayadi S, Martínez AT, Martínez MJ (2006) Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme Microb Technol* 39:141–148. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.027>

Affiliations

Leidy D. Ardila-Leal¹ · Diego A. Albarracín-Pardo¹ · Claudia M. Rivera-Hoyos¹ · Edwin D. Morales-Álvarez² · Raúl A. Poutou-Piñales¹ · Angela M. Cardozo-Bernal³ · Balkys E. Quevedo-Hidalgo⁴ · Aura M. Pedroza-Rodríguez⁵ · Dennis J. Díaz-Rincón⁶ · Alexander Rodríguez-López⁶ · Carlos J. Alméciga-Díaz⁶ · Claudia L. Cuervo-Patiño⁷

¹ Laboratorio de Biotecnología Molecular, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Carrera 7ma No 43-82, Edificio 50 Lab. 124, Bogotá D.C. 110-23, Colombia

² Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia

- ³ Joven Investigador COLCIENCIAS, Laboratorio de Biotecnología Molecular, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Bogotá D.C., Colombia
- ⁴ Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Bogotá D.C., Colombia
- ⁵ Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Bogotá D.C., Colombia
- ⁶ Laboratorio de Expresión de Proteínas, Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM), Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Bogotá D.C., Colombia
- ⁷ Laboratorio de Parasitología Molecular, Grupo de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Bogotá D.C., Colombia

Capítulo 5. Optimización estadística a escala de laboratorio de un medio de bajo costo para la producción de rPOXA 1B

Abreviaturas

ABTS:	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
BCP:	Banco de células primario
Bs:	Base seca
CCD-1:	Diseño central compuesto 1
CCD-2:	Diseño central compuesto 2
CT:	Carbono total
IVA:	Impuesto sobre el valor añadido
NT:	Nitrogeno total
OFED:	One Factor Experimental Design
pGAP:	Promotor gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa POXA 1B
rPOXA 1B:	Enzima recombinante POXA 1B de <i>Pleurotus ostreatus</i> producida en <i>Pichia pastoris</i> .
TCA:	Flujo del ciclo de Krebs.
VET:	Volumen efectivo de trabajo
YPD:	Medio de extracto de levadura, peptona y dextrosa. <i>Abreviatura en inglés</i> (Yeast Extract Peptone Dextrose)

5.1 Introducción

Diferentes hongos de podredumbre blanca como *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Rigidoporus lignosus*, *Trametes villosa* y *Ganoderma lucidum* han sido reportados como productores de lacasa. Específicamente *P. ostreatus* produce 11 tipos de lacasas (isoenzimas), (Rivera-Hoyos et al., 2013), dentro de las cuales, POXA 1B ha sido muy estudiada por su gran estabilidad a pH alcalino y alta actividad enzimática (Giardina et al., 1999; Rivera-Hoyos et al., 2015; Ardila-Leal et al., 2019). Sin embargo, la obtención de esta enzima a partir del organismo nativo no cubre las necesidades de la industria, debido fundamentalmente a que el tiempo para el cultivo de hongos filamentoso es prolongado (Flores et al., 2009).

La producción heteróloga de lacasas en hospederos como *Trichoderma reesei* (Saloheimo and Niku-Paavola, 1991), *Pichia methanolica* (Guo et al., 2006), *Yarrowia lipolytica* (Theerachat et al., 2012), *Saccharomyces cerevisiae* (Bleve et al., 2008) y *Pichia pastoris* (Rivera-Hoyos et al., 2015) ha sido una estrategia utilizada para satisfacer las necesidades industriales, debido a la sobreexpresión que puede lograrse con la tecnología del DNA recombinante (Trono, 2019). Sin embargo, entre varios hospederos heterólogos, *Pichia pastoris* (levadura metilotrófica) es reconocida en la producción de proteínas recombinantes, debido al potente sistema de secreción, que favorece el procesamiento de la proteína (Gidijala et al., 2018), puede alcanzar una densidad celular alta (Juturu and Wu, 2018), es de fácil manipulación, expresa altos niveles de proteínas extracelulares y realiza las modificaciones postraduccionales características de eucariotas, tales como glicosilaciones y formación de puentes disulfuro, entre otros (Cereghino et al., 2002; Zhang et al., 2009).

La expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris* está influenciada por factores como el pH, la temperatura, la composición del medio (Batra et al., 2014) y el promotor utilizado en la construcción genética (Mao et al., 2015). *P. pastoris* puede crecer en medios básicos, químicamente definidos (Zhang et al., 2009) y en medios complejos con precursores biosintéticos que pueden canalizarse hacia vías anabólicas; reduciendo la

necesidad de producir precursores biosintéticos, lo que implica ahorro de energía metabólica y eficiencia en la producción de enzimas (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2005; Nocon *et al.*, 2014). Para el diseño de un medio de cultivo es necesario conocer los requerimientos nutricionales del microorganismo a cultivar (Gómez and Batista, 2006), así como los aportes nutricionales de cada uno de los componentes (Matthews *et al.*, 2018), para lo cual se han empleado diferentes metodologías de diseño y optimización de medios. Por otro lado, se sabe que aproximadamente el 28 % de los costos de operación corresponden a las materias primas (Osma *et al.*, 2011; Ravindran and Jaiswal, 2016), por lo que se han realizado investigaciones con medios de cultivo de bajo costo y se ha demostrado que el uso de compuestos grado industrial, incrementa los rendimientos, las productividades y la producción de enzimas (Zheng *et al.*, 2012; Mao *et al.*, 2015).

Con el medio mejorado usado para la producción en biorreactor de 10 L (6 L volumen efectivo de trabajo VET) se obtuvo una actividad de $3159.93 \pm 498.90 \text{ UL}^{-1}$ en 192 h empleando la técnica de Tinoco *et al.* (2001), (Ardila-Leal *et al.*, 2019) y $8506.95 \pm 1993.65 \text{ UL}^{-1}$ usando la técnica de medición, estandarizada en el Capítulo 3 y evaluada en el Capítulo 4. Por consiguiente, las mediciones realizadas en las siguientes evaluaciones se realizaron usando la técnica de medicación con buffer citrato a $\text{pH } 3.0 \pm 0.2$.

El objetivo de este capítulo fue diseñar y optimizar estadísticamente un medio de cultivo de bajo costo, para incrementar la actividad de la lacasa rPOXA 1B de *Pleurotus ostreatus* en *P. pastoris*.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Cepa

Se empleó la cepa de *P. pastoris* X33/*pGAPZ α A-LaccPost-Stop* que contiene el gen sintético optimizado que codifica para la lacasa POXA 1B de *P. ostreatus*, bajo el control del promotor constitutivo (*pGAP*) de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (E.C. 1.2.1.12), (Rivera-Hoyos et al., 2015). El Banco de Células Primario (BCP) del microorganismo se encuentra conservado en caldo YPD suplementado con glicerol al 20 % v/v, a -30 °C (Poutou et al., 1994) del Laboratorio de Biotecnología Molecular perteneciente al Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

5.2.2 Reactivación de la cepa y preparación del inóculo

Se tomaron viales del BCP de *P. pastoris* X33/*pGAPZ α A-LaccPost-Stop* y se inocularon en Erlenmeyer de 50 mL con 5 mL de caldo YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa) y se incubaron durante 24 horas a 200 r.p.m., y 30 °C. Una vez reactivada la cepa se preparó el inóculo en medio previamente mejorado (10 g L⁻¹ D-glucosa, 20 g L⁻¹ peptona, 15 g L⁻¹ extracto de levadura, 0.16 g L⁻¹ CuSO₄, 2.67 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄), (Ardila-Leal et al., 2019) y fue incubada a 200 r.p.m. y 30 °C hasta alcanzar una densidad óptica (OD_{λ600}) mínima de 1.00. Los ensayos realizados en Erlenmeyer de 250 mL con volumen efectivo de trabajo (VET) de 150 mL que fueron inoculados con el 10 % v/v de inóculo.

5.2.3 Selección de fuentes de nitrógeno de bajo costo

Se evaluaron 3 fuentes de nitrógeno a diferentes concentraciones, las cuales fueron seleccionadas por costos: proteína aislada de soya al 90 %, (Ciacomeq SAS), extracto de malta (Proquímicas JG SAS) y suero de leche en polvo (ChemiPharma), (Tabla 5.1), (Material Suplementario MS 5.1, 5.2 y 5.3). Teniendo en cuenta que la concentración de las fuentes orgánicas de nitrógeno con diferentes concentraciones de Nitrógeno Total (NT) eran utilizadas en el medio previamente mejorado (Ardila-Leal et al., 2019), fue de 35 g L⁻¹ (peptona 20 g L⁻¹ [NT = 14.0 %, (% w/w)], extracto de levadura 15 g L⁻¹ [NT = 10.0 - 12.5 %]); las concentraciones de las fuentes de nitrógeno a evaluar en

cada tratamiento se ajustaron a 35 g L⁻¹. Cada tratamiento se realizó por triplicado en Erlenmeyer de 250 mL con VET de 150 mL, 10 % (v/v) de inóculo y se incubó a 200 rpm, 30 °C, durante 168 h. Como medio de cultivo control se usó el medio previamente mejorado (Ardila-Leal et al., 2019). Se realizaron muestreos a las 0 y 168 h de cultivo y se centrifugaron durante 10 min a 4427 x g a 25 °C y a partir del sobrenadante se determinó la actividad lacasa (UL⁻¹), (Pezzella et al., 2017).

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó una prueba ANOVA de un factor seguida de una prueba Post-Hoc de Tukey para detectar diferencias significativas entre los tratamientos a las 168 h de cultivo. Previamente la distribución normal de la variable de respuesta (actividad enzimática en UL⁻¹), fue verificada con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas con la prueba de Levene. El análisis estadístico fue realizado en el programa estadístico IBM SPSS Statistics® V. 21.0.

Tabla 5.1. Composición de los medios de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno económicas.

Tratamiento	Fuente de carbono/(g L ⁻¹)	Fuente de Nitrógeno orgánico/(g L ⁻¹)	Fuente de nitrógeno inorgánico/(g L ⁻¹)	Cofactor/(g L ⁻¹)	Otro/(g L ⁻¹)
Control	Glucosa/ (10)	Peptona/ (20) Extracto de levadura/ (15)			
T1	D-Glucosa USP/ (10)	Proteína aislada de soya / (20) Extracto de malta/ (15)	(NH ₄) ₂ SO ₄ / (2.67)	CuSO ₄ / (0.16)	Cloranfenicol/ (0.1)
T2		Proteína aislada de soya / (35)			
T3		Suero de leche/ (20) Extracto de malta/ (15)			

5.2.4 Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) para el diseño de un medio de cultivo de bajo costo

5.2.4.1 Diseño Central Compuesto-1 (CCD-1)

Los resultados obtenidos con los medios de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno fueron considerados para el primer diseño experimental. Se realizó un primer Diseño Central Compuesto-1 (CCD-1) incluyendo un punto central (ensayado por triplicado) y dos puntos axiales (-1.5 y 1.5) con el fin de determinar las concentraciones óptimas de cada factor preseleccionado con anterioridad. La [Tabla 5.2](#) muestra los factores y los niveles incluidos en el CCD-1. Cada tratamiento se realizó en Erlenmeyer de 250 mL con VET de 150 mL, 10 % v/v de inóculo y se incubó a 200 r.p.m., y 30 °C durante 168 h. Se realizaron muestreos de 2 mL a las 0, 12, 72 y 168 h de cultivo y se centrifugaron durante 10 min a 4427 x g; en el sobrenadante se midió la concentración de azúcares reductores residuales (g L⁻¹), ([Miller, 1959](#)), la actividad lacasa (U L⁻¹), ([Pezzella et al., 2017](#)) y la concentración de proteínas totales (mg mL⁻¹), ([Amaral and Ribeiro, 2013](#)). Como variables de respuesta se utilizaron la actividad enzimática (UL⁻¹) y la actividad específica (Umg⁻¹) a las 72 y 168 h de cultivo.

Tabla 5.2 Composición, factores evaluados en el CCD-1 y sus respectivos niveles.

Factor	Nivel				
	-1.5	-1	Central	1	1.5
Glucosa USP (g L ⁻¹)	0.0	3.3	6.65	10.0	13.35
Proteína aislada de soya (g L ⁻¹)	5.0	10.0	15.0	20.0	25.0
Extracto de Malta (g L ⁻¹)	3.5	7.0	10.5	14.0	17.5
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g L ⁻¹)	1.3	2.6	3.9	5.2	6.5
CuSO ₄ (g L ⁻¹) *	0.16				
Cloranfenicol (g L ⁻¹) *	0.1				

*Estos factores se mantuvieron fijos para todas las combinaciones

5.2.4.2 Diseño Central Compuesto-2 (CCD-2)

Para ajustar la concentración de los factores significativos en el CCD-1, se realizó un segundo Diseño Central Compuesto-2 (CCD-2) que incluía un punto central (que fue ensayado por triplicado) y dos puntos axiales (-1.5 y 1.5) que fueron evaluados por

triplicado para un total de 27 experimentos. La [Tabla 5.3](#) muestra la composición de cada tratamiento propuesto en este diseño. Las condiciones de ensayo, el muestreo y las variables de respuesta fueron similares a la del CCD-1

Tabla 5.3 Composición, factores evaluados en el CCD-2 y sus respectivos niveles.

Factor	Nivel				
	-1.5	-1	Central	1	1.5
D-Glucosa USP (g L^{-1})	7.9	10.0	15.0	20.0	22.1
Proteína aislada de soya (g L^{-1})	15.9	20.0	30.0	40.0	44.1
Extracto de Malta (g L^{-1}) **	11.74				
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g L^{-1}) **	4.91				
CuSO_4 (g L^{-1}) *	0.161				
Cloranfenicol (g L^{-1}) *	0.1				

*Estos factores se mantuvieron fijos para todas las combinaciones.

** Estos factores se mantuvieron fijos para todas las combinaciones y se derivan de los resultados obtenidos en el CCD-1

5.2.5 Diseño One Factor (OFED)

Para este diseño se tuvo en cuenta que la proteína aislada de soya fue el factor significativo en el CCD-2. Se utilizó un modelo cúbico entre 20 g L^{-1} y 80 g L^{-1} (-1 y +1 respectivamente), que arrojó 5 puntos centrales para un total de 10 tratamientos (las combinaciones con $20, 50$ y 80 g L^{-1}) se hicieron por duplicado. En este diseño se mantuvo fijo el factor D-Glucosa (20 g L^{-1}), establecido en el CCD-2 ([Tabla 5.4](#)). Las condiciones de ensayo, el muestreo y las variables de respuesta fueron similares a la del CCD-1 y CDD-2.

Tabla 5.4 Composición, factores evaluados en el OF y sus respectivos niveles.

Factor	Niveles						
	-1	Centrales					1
Proteína aislada de soya (g L ⁻¹)	20.00	30.02	40.01	50.00	59.99	69.98	80.00
Glucosa USP (g L ⁻¹) ***	20						
Extracto de Malta (g L ⁻¹) **	11.74						
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g L ⁻¹) **	4.91						
CuSO ₄ (g L ⁻¹) *	0.16						
Cloranfenicol (g L ⁻¹) *	0.1						

*Estos factores se mantuvieron fijos para todas las combinaciones.

** Estos factores se mantuvieron fijos para todas las combinaciones y se derivan de los resultados obtenidos en el CCD-1

*** Este factor se mantuvo fijo para todas las combinaciones y se deriva de los resultados obtenidos en el CCD-2

5.2.6 Análisis estadístico CCD-1, CCD-2 y OFED

Los diseños factoriales y análisis estadísticos, se realizaron con el programa Design Expert® 9.0.0. La distribución normal de las variables de respuesta fue verificada con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas con la prueba de Levene.

5.2.7 Técnicas analíticas

5.2.7.1 Determinación de azúcares reductores residuales.

Se determinó la concentración de azúcares reductores del sobrenadante de cada muestra por medio de la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), (Miller, 1959). La curva de calibración estuvo representada por la Ecuación 5.1.

$$y = 0.5609x + 0.0001 \quad R^2 = 0.9992 \quad [\text{Ecuación. 5.1}]$$

5.2.7.2 Ensayo actividad enzimática

La medición de la actividad lacasa se realizó utilizando ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) como sustrato. En una cubeta de espectrofotómetro se agregaron 100 µL de ABTS 20 mM, de 2 a 20 µL de sobrenadante centrifugado a

temperatura ambiente (este volumen fue dependiente de la cantidad de enzima presente en la muestra) y se completó el volumen a 1 mL con Buffer citrato 0.1 M (pH 3.0 ± 0.2). Se midió el cambio de absorbancia como consecuencia de la oxidación del ABTS durante 1 minuto a 420 nm (Pezzella et al., 2017). La unidad enzimática (U) está definida como la cantidad de enzima capaz de transformar 1 μmol de sustrato (ABTS) por minuto, por litro y se calculó mediante la Ecuación 5.2.

$$UL^{-1} = \frac{(\Delta E \times V_t)}{(\varepsilon \times d \times V_s)} \quad \text{[Ecuación 5.2]}$$

Donde: ΔE corresponde a la absorbancia final menos la absorbancia inicial durante 1 min de reacción, V_t hace referencia al volumen total utilizado en la reacción, ε al coeficiente de extinción molar del ABTS ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 420 nm, d es la longitud de la cubeta en cm y V_s es el volumen de muestra (enzima) que agregó en la reacción (Amaral and Ribeiro, 2013).

5.2.7.3 Determinación de proteínas totales

La concentración de proteínas totales de cada muestra se determinó por absorbancia directa a 280 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop (Thermo Scientific).

5.2.7.4 Determinación de Carbono total (TC, gL^{-1}), Nitrógeno total (NT, gL^{-1}) y relación Carbono/Nitrógeno inicial (C/N)₀

Las concentraciones de CT (Carbono total) y NT (Nitrógeno total) fueron medidas utilizando un analizador de TOC (Shimadzu TOC-L total organic carbon analyzer), este equipo desarrolla un método de oxidación catalítica de combustión y NDIR (sensor de infrarrojo no dispersivo), de acuerdo con el Método Estándar 5310B (Rice, 2017). La solución estándar (0.1 gL^{-1}) de cada uno de los componentes del medio (separadamente) fueron preparados y analizados en el equipo TOC. Una vez analizadas las concentraciones se realizaron cálculos estequiométricos para determinar la concentración en cada medio de cultivo (gL^{-1}) y la relación carbono nitrógeno inicial (C/N)₀.

5.2.8 Análisis de costos directo

Se calculó el costo de la materia prima empleada para la formulación del medio económico optimizado, incluyendo el 10 % de imprevistos y el 19 % de impuesto sobre el valor añadido (IVA), que es el actualmente establecido en Colombia.

5.3 Resultados

5.3.1 Selección de fuentes de nitrógeno económicas

Los tratamientos se agruparon en 2 grupos significativamente diferentes ($p < 0.001$), en función de la actividad lacasa, a las 168 h de cultivo (Figura 5.1). El medio control no fue incluido en la comparación de medias y tuvo una actividad lacasa de $5583.33 \pm 324.14 \text{ UL}^{-1}$. Los tratamientos T3 y T1 tuvieron una actividad lacasa máxima de $2636.57 \pm 402.1 \text{ UL}^{-1}$ y $2645.83 \pm 208.7 \text{ UL}^{-1}$ respectivamente (grupo **a** en la comparación de medias), cuyas diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$). Por otro lado, la actividad lacasa en T2 ($958.33 \pm 158.11 \text{ UL}^{-1}$), (grupo **b**), fue considerablemente menor. El T1 (10 g L^{-1} D-glucosa USP, 20 g L^{-1} proteína aislada de soya, 15 g L^{-1} extracto de malta, $2.67 \text{ g L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $0.16 \text{ g L}^{-1} \text{ CuSO}_4$) fue el medio de cultivo elegido para comenzar la optimización estadística.

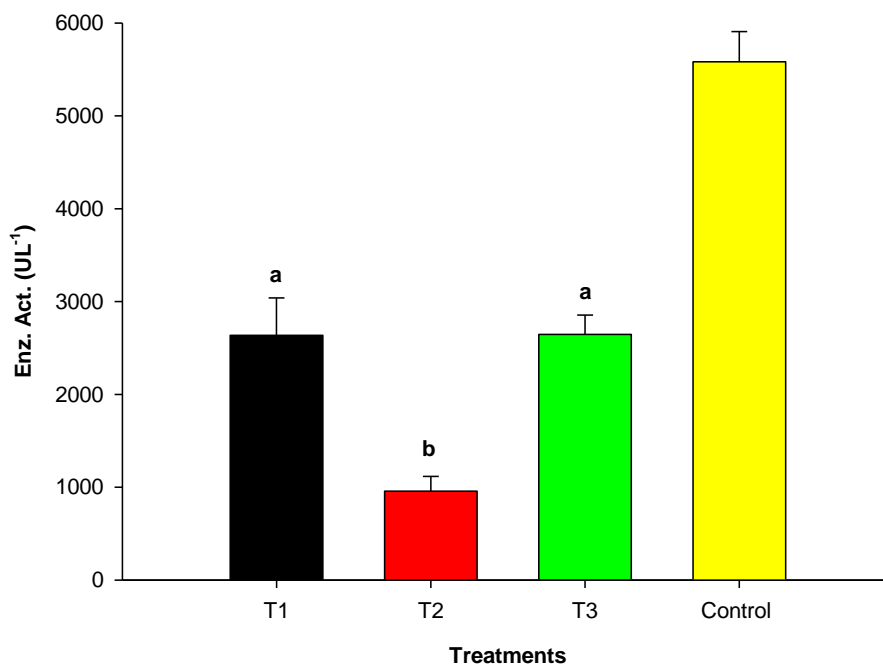


Figura 5.1. Comparación de medias entre las actividades lacasa (UL^{-1}) obtenidas en los diferentes tratamientos. Cada barra corresponde a la media ($n=3$) de la actividad lacasa determinada a las 168 h de cultivo. Se utilizó un $\alpha = 0.05$. [T1: Proteína de soya y extracto de malta; T2: Proteína de soya y T3: Suero de leche y extracto de malta].

5.3.2 Diseño Central Compuesto-1 (CCD-1)

En el CCD-1, el modelo cuadrático fue significativo a la hora 72 tanto para la actividad enzimática ($U L^{-1}$) como para la actividad específica ($U mg^{-1}$); mientras que a las 168 h el modelo lineal fue el significativo (Tabla 5.5). Sin embargo, pese a que los R-Squared fueron bajos se continuó trabajando con los resultados de actividad específica ($U mg^{-1}$) a las 72h por tener el lack of fit menos significativo y el segundo R-Squared más alto.

Tabla 5.5 Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para el CCD-1.

Variable de respuesta	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	p-value Prob > F	R-Squared
Act. enzimática ($U L^{-1}$) 72h	Modelo cuadrático	1.98×10^7	14	1.42×10^6	3.26	0.0235*	0.7917
	Lack of Fit	5.12×10^6	10	5.12×10^5	10.78	0.0878	
Act. enzimática ($U L^{-1}$) 168h	Modelo lineal	1.05×10^7	4	2.64×10^6	4.77	0.0063*	0.4645
	Lack of Fit	1.05×10^7	20	5.26×10^5	0.64	0.7645	
Act. específica ($U mg^{-1}$) 72h	Modelo cuadrático	1.84×10^5	14	1.31×10^4	2.94	0.0345*	0.7740
	Lack of Fit	4.59×10^4	10	4.59×10^3	1.18	0.5418	
Act. específica ($U mg^{-1}$) 168h	Modelo lineal	7.56×10^4	4	1.89×10^4	4.65	0.0072*	0.4580
	Lack of Fit	8.54×10^4	20	4.27×10^3	2.10	0.3722	

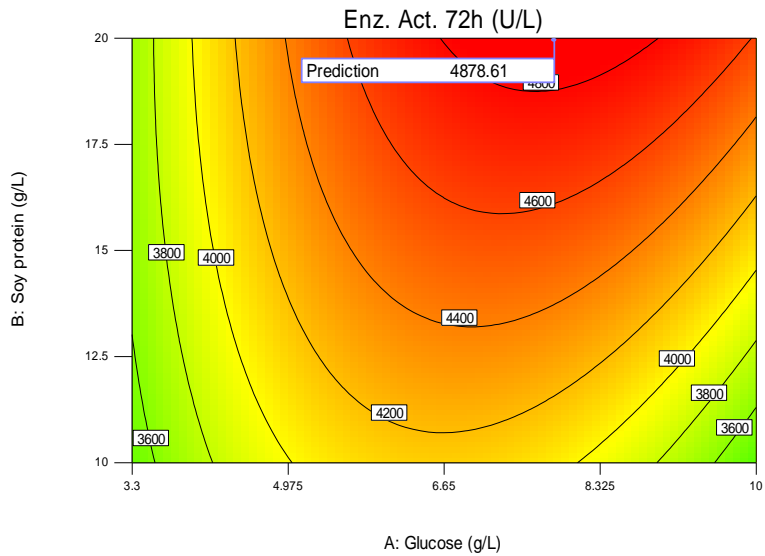
Para ambas variables de respuesta (actividad enzimática o actividad específica) a las dos horas evaluadas (72 ó 168 h) y para ambos modelos (cuadrático o lineal), los factores proteína aislada de soya y glucosa fueron significativos entre el 89 y 99 % (Tabla 5.6); la significancia del resto de factores y sus combinaciones y cuadrados en el modelo cuadrático estuvo por debajo del 85 %. La Figura 5.2 muestra la predicción de la interacción de las dos variables más significativas (D-glucosa USP y proteína aislada de soya 90 %) sobre la actividad específica ($U mg^{-1}$) y la actividad lacasa ($U L^{-1}$) a las 72 y 168 h respectivamente, donde se puede observar que aumentar la concentración de glucosa y proteína aislada de soya simultáneamente aumenta las variables respuesta.

Tabla 5.6 Significancia de los factores individuales, duplicados y combinados en el modelo cuadrático (variable de respuesta actividad específica 72 h de cultivo), CCD-1

* significancia 96-99 %, ** significancia 93-95 %, ***significancia 89-90 %

Spec. Act. (U mg⁻¹) 72 h						
Source	Suma de cuadrados	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Modelo Cuadrático	1.84 x 10 ⁵	14	1.31 x 10 ⁴	2.94	0.0345*	
A-Glucosa USP	1.35 x 10 ⁴	1	1.35 x 10 ⁴	3.02	0.1078***	
B-Proteína aislada de soya	2.54 x 10 ⁴	1	2.54 x 10 ⁴	5.68	0.0346*	
C-Extracto de malta	6.59 x 10 ²	1	6.59 x 10 ²	0.15	0.7076	
D-(NH ₄) ₂ SO ₄	1.30 x 10 ⁴	1	1.30 x 10 ⁴	2.91	0.1140***	
AB	1.75 x 10 ⁴	1	1.75 x 10 ⁴	3.91	0.0715**	
AC	1.07 x 10 ⁴	1	1.07 x 10 ⁴	2.40	0.1473	
AD	3.71 x 10 ³	1	3.71 x 10 ³	0.83	0.3800	
BC	2.81 x 10 ²	1	2.81 x 10 ²	0.06	0.8063	
BD	9.04 x 10 ²	1	9.04 x 10 ²	0.20	0.6608	
CD	1.19 x 10 ²	1	1.19 x 10 ²	0.03	0.8729	
A ²	8.49 x 10 ⁴	1	8.49 x 10 ⁴	19.00	0.0009*	
B ²	1.16 x 10 ²	1	1.16 x 10 ²	0.03	0.8746	
C ²	9.22 x 10 ¹	1	9.22 x 10 ¹	0.02	0.8882	
D ²	3.10 x 10 ³	1	3.10 x 10 ³	0.69	0.4209	
Residual	5.36 x 10 ⁴	12	4.47 x 10 ³			
Lack of Fit	4.59 x 10 ⁴	10	4.59 x 10 ³	1.18	0.5418	
Pure Error	7.75 x 10 ³	2	3.87 x 10 ³			
Cor Total	2.37 x 10 ⁵	26				
R-Squared						0.7740
Adj R-Squared						0.5104
Adeq Precision						7.2192

Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Enz. Act. 72h (U/L)
 4812.5
 1486.11
 X1 = A: Glucose
 X2 = B: Soy protein
 Actual Factors
 C: Malt extract = 11.74
 D: (NH₄)₂SO₄ = 4.91



Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Spec. Act 72h (Umg-1)
 472.912
 141.246
 X1 = A: Glucose
 X2 = B: Soy protein
 Actual Factors
 C: Malt extract = 11.74
 D: (NH₄)₂SO₄ = 4.91

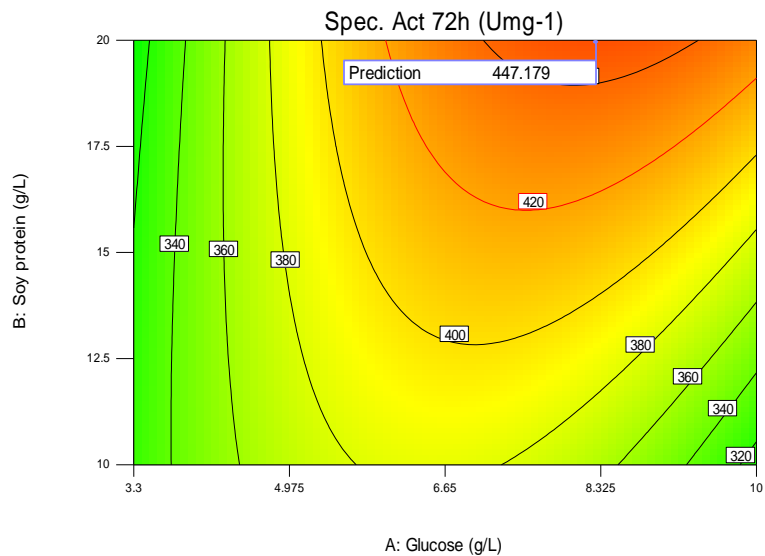


Figura 5.2. Gráfico de contornos. Efecto de la interacción de los factores glucosa **(A)** y proteína aislada de soya **(B)** sobre la actividad lacasa **(arriba)** y la actividad específica **(abajo)**, obtenida en el CCD-1.

Los resultados del CCD-1 a las 72 horas mostraron (Tabla 5.6, Figura 5.2) la necesidad de variar las concentraciones de Glucosa USP y la proteína aislada de soya, por lo que para el CCD-2 se fijaron en 11.74 g L⁻¹ el extracto de malta y en 4.91 g L⁻¹ el sulfato de amonio (concentraciones óptimas predichas por el CCD-1), en lugar de incluirlos como factores en el CCD-2; sin embargo, las concentraciones de glucosa USP (9.53 g L⁻¹) y de proteína

aislada de soya (19.25 gL^{-1}) deberían quedar incluidas en el rango incrementado de concentraciones en el CCD-2, para tener una superficie de navegación más amplia que la propuesta inicialmente en CCD-1 (Tabla 5.3).

En este diseño se destacó el tratamiento T22 cuya relación $(C/N)_0$ fue de 6.0 ± 0.03 (Figura 5.3), (Material Suplementario MS 5.4) pues se obtuvo $4,743.05 \pm 29.46 \text{ UL}^{-1}$ a las 72 horas; sin embargo, la actividad lacasa disminuyó a las 168 h a $3,569.44 \pm 96.23 \text{ UL}^{-1}$. Este comportamiento también se observó con la actividad específica obtenida, que disminuyó de $471.32 \pm 3.37 \text{ Umg}^{-1}$ a las 72h a $332.81 \pm 9.11 \text{ Umg}^{-1}$ a las 168 h. Por otro lado, la concentración de los azúcares reductores disminuyó considerablemente (de 12.99 a 3.11 g L^{-1}) en las primeras 12 h; no obstante, no hubo consumo total a las 168 h, con aproximadamente 3 gL^{-1} de azúcar residual a la hora 168 h (Figura 5.3).

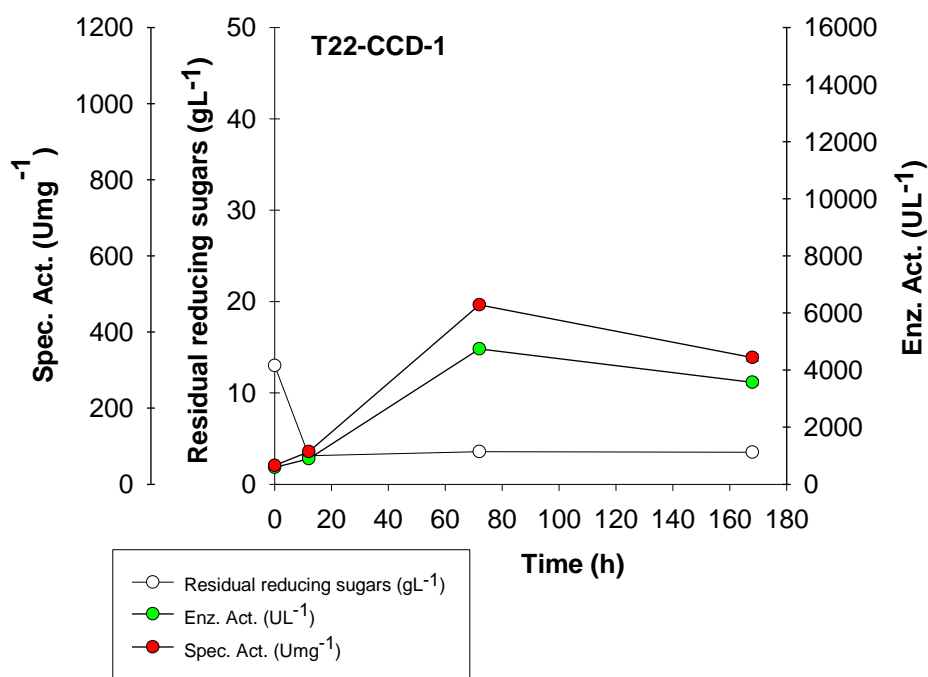


Figura 5.3 Cinética de producción de la rPOXA 1B. Central Composite Design-1 (CCD-1), tratamiento T22.

5.3.4 Diseño Central Compuesto-2 (CCD-2)

En el CCD-2, el modelo cuadrático fue significativo tanto a la hora 72 como a la hora 168 para la actividad enzimática y para la actividad específica; sin embargo, el lack of fit fue significativo para la actividad enzimática a las 72 h, pero no para la actividad específica a las 168 h (Tabla 5.7), (Material Suplementario MS 5.5); por lo tanto, el resto del análisis se basó en la variable de respuesta actividad específica ($U\ mg^{-1}$).

Tabla 5.7 Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la actividad específica ($U\ mg^{-1}$) a las 168 h en el CCD-2.

Factor	Suma de cuadrados	df	Cuadrado medio	F Valor	p-valor Prob > F	
Modelo cuadrático	1×10^6	5	2×10^5	80.49	< 0.0001	
A-Glucosa USP	6×10^5	1	6×10^5	240.24	< 0.0001	
B- Proteína aislada de soya	3×10^5	1	3×10^5	111.96	< 0.0001	
AB	8×10^4	1	8×10^4	34.24	< 0.0001	
A ²	2×10^2	1	2×10^2	0.08	0.7841	
B ²	3×10^4	1	3×10^4	10.61	0.0038	
Residual	5×10^4	21	2×10^3			
Lack of Fit	1×10^4	3	4×10^3	1.89	0.1677	
Pure Error	4×10^4	18	2×10^3			
Cor Total	1×10^6	26				
R-Squared						0.9504
Adj R-Squared						0.9386
Pred R-Squared						0.9193
Adeq Precision						23.496

En negrilla modelo y factores significativos ($p < 0.05$)

Los dos factores glucosa y proteína aislada de soya 90 % tuvieron una influencia positiva sobre la actividad específica y la actividad lacasa y a medida que se aumentó la concentración de los factores, también aumentaron las variables de respuesta (Figura 5.4).

Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Spec. Act. 168h (U/mg)
 ● Design Points
 1006.63
 435.386
 X1 = A: Glucose
 X2 = B: Soy protein

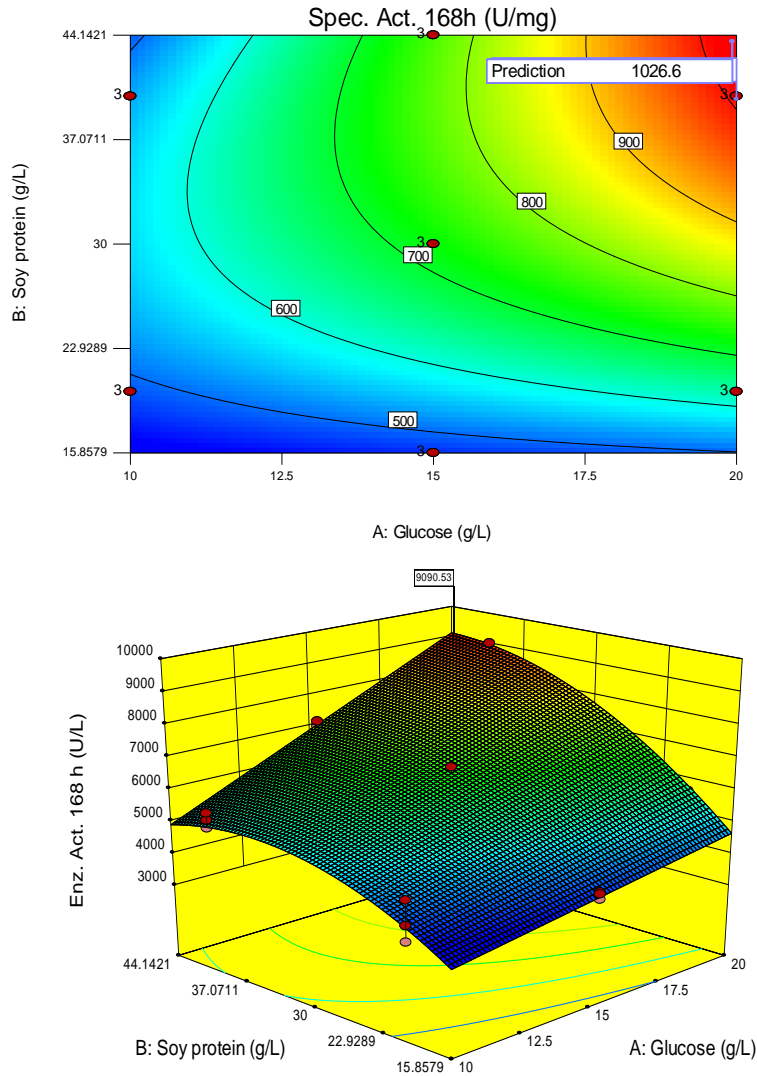


Figura 5.4. Gráficos de contorno (arriba) y superficie (abajo). Efecto de la interacción de los factores glucosa **(A)** y proteína aislada de soya **(B)** sobre la actividad específica (arriba) y actividad enzimática (abajo), obtenida en el CCD-2.

La concentración óptima según la predicción del modelo para obtener una actividad lacasa de $9,090.53 \text{ U L}^{-1}$ y una actividad específica de 1026.6 U mg^{-1} fue 20 g L^{-1} de glucosa y 39.87 g L^{-1} de proteína aislada de soya; sin embargo, aumentar la concentración de proteína aislada de soya podría mejorar los resultados de actividad (Figura 5.5, Tabla 5.7). La Tabla 5.7 muestra que la proteína aislada de soya (Factor B²) fue significativo

para el modelo ($p= 0.0038$); mientras que la interacción entre los factores AB fue significativa ($p < 0.0001$) y A^2 no lo fue ($p= 0.7841$). Por tal motivo se implementó un Diseño One Factor para tratar de optimizar la concentración de proteína aislada de soya.

En este diseño se destacó el tratamiento T9 cuya relación $(C/N)_0$ era de 6.7 ± 0.02 (Figura 5.5) con el que se obtuvo valores más altos de actividad lacasa y actividad específica (Material Suplementario MS 5.6), tanto a las 72 h ($6,608.80 \pm 62.20 \text{ UL}^{-1}$ y $725.21 \pm 14.41 \text{ Umg}^{-1}$), como a las 168 h con $8,944.44 \pm 330.28 \text{ UL}^{-1}$ y $971.92 \pm 17.61 \text{ U mg}^{-1}$. Los resultados muestran que el CCD-2 superó los resultados de T22 (CCD-1) en ambos tiempos (72 y 168 h). Nuevamente se observó la disminución de los azúcares reductores en las primeras 12 h, aunque no completamente, con aproximadamente 5 g L^{-1} de azúcar residual que se mantuvieron hasta las 168 h.

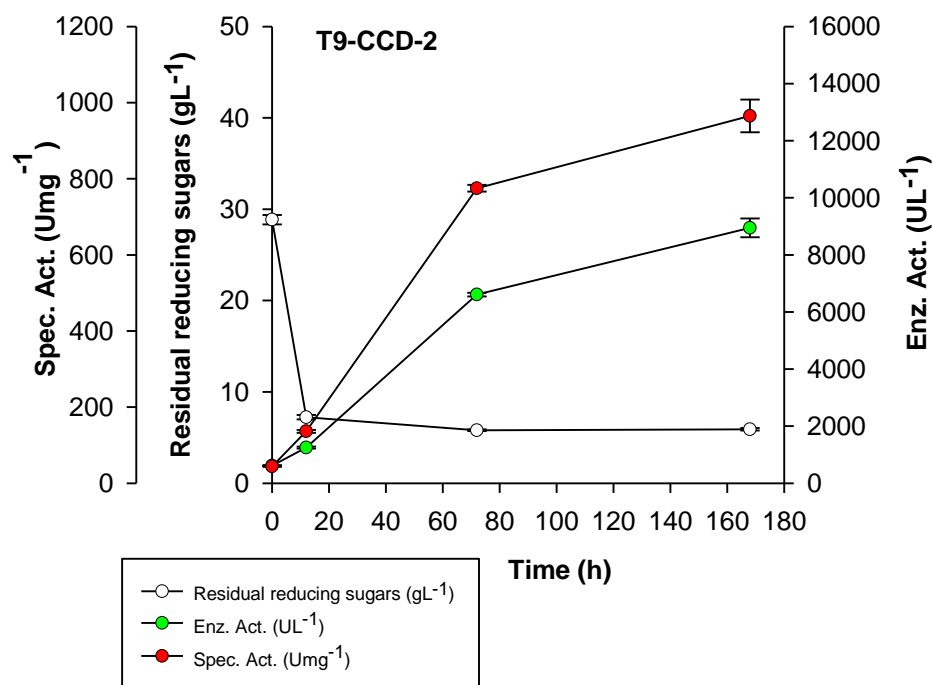


Figura 5.5 Cinética de producción de la rPOXA 1B. Central Composite Design-2 (CCD-2), tratamiento T9.

5.3.5 Diseño Experimental One Factor (OFED)

En este diseño el modelo cúbico fue significativo ($p < 0.0001$) a las 168 h cultivo (Tabla 5.8) y el tratamiento T4 con una relación $(C/N)_0$ de 5.4 ± 0.03 y 50 g L^{-1} proteína aislada de soya, mostró la mayor actividad enzimática ($12,877.31 \pm 481.23 \text{ U L}^{-1}$) y la mayor actividad específica ($1,324.58 \pm 114.19 \text{ U mg}^{-1}$) a las 168 h (Figura 5.6 A), superando ligeramente la predicción del modelo que fue de $12,536.1 \text{ U L}^{-1}$ con una deseabilidad de 0.914 a las 168 h (Figura 5.6 B).

Tabla 5.8 Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la actividad enzimática (U L^{-1}) a las 168 h en el OFED.

Factor	Suma de cuadrados	df	Cuadrado medio	F Valor	p-valor Prob > F
Modelo Cubico	7.39×10^7	3.00	2.46×10^7	84.75	<0.0001
A-Proteína aislada de soya	6.33	1.00	6.33	0.00	0.9964
A ²	3.22×10^7	1.00	3.22×10^7	110.88	<0.0001
A ³	3.55×10^6	1.00	3.55×10^6	12.21	0.0129
Residual	1.74×10^6	6.00	2.91×10^5		
Lack of Fit	1.30×10^6	3.00	4.33×10^5	2.92	0.2014
Pure Error	4.46×10^5	3.00	1.49×10^5		
Cor Total	7.57×10^7	9.00			
R-Squared					0.9769
Adj R-Squared					0.9654
Pred R-Squared					0.9394
Adeq Precision					21.6448

En negrilla modelo y factores significativos ($p < 0.05$)

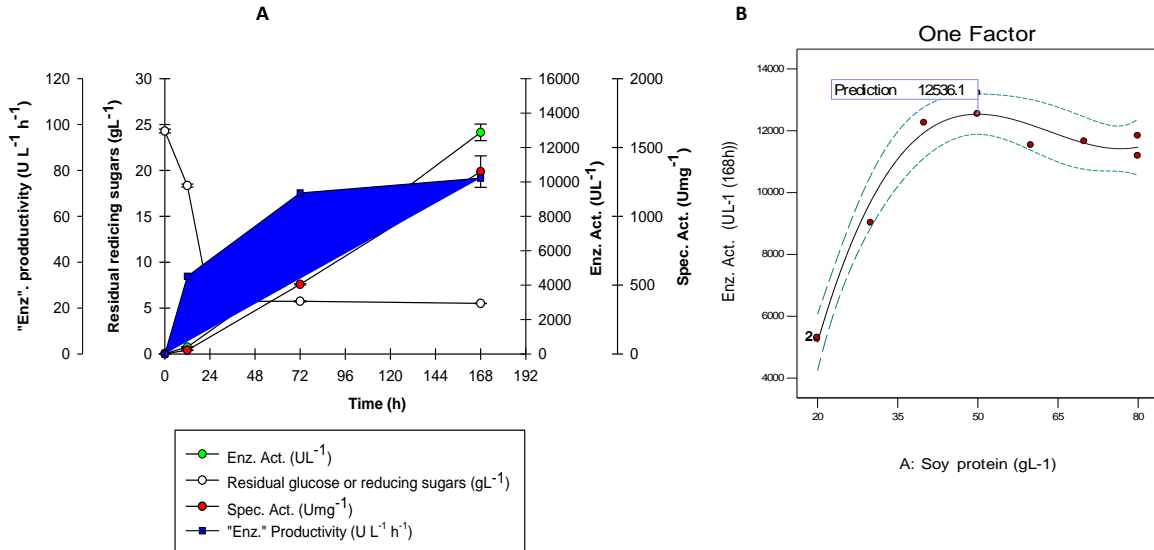


Figura 5.6 Cinética, resultados y predicción del Diseño One Factor. **A.** Cinética de producción de rPOXA 1B. **B.** Predicción del Diseño One Factor.

5.3.6 Análisis de costos directo

El medio de cultivo económico optimizado tuvo un costo total de USD 1,227 por litro, que es alrededor de 89.84 % menos en comparación al medio previamente mejorado (USD 12,084). La [Tabla 5.9](#) muestra el análisis de costos, incluyendo 10 % de imprevistos y el 19 % de IVA, que es el actualmente establecido en Colombia ([Empresa de Acueducto Alcantarillado y Aseo de Bogotá, 2018](#)).

Table 5.9 Comparación de costos del medio de cultivo previamente mejorado vs., el medio económico optimizado.

Medio previamente mejorado			Medio optimizado de bajo costo		
Referencia	(Ardila-Leal et al., 2019)		Reference	Presente estudio	
Componente	(g L ⁻¹) o L	Costo/L	Componente	(g L ⁻¹) o L	Costo/L
Glucosa (Merck)	10	USD 0.640	Glucosa USP (ChemiPharma)	20	USD 0.037
Peptona (Oxoid)	20	USD 6.740	Proteína aislada de soya (Ciacomeq SAS)	50	USD 0.200
Extracto de levadura (Oxoid)	15	USD 1.485	Extracto de Malta (Proquímicas JG SAS)	10.28	USD 0.063
CuSO ₄ (Scharlau)	0.16	USD 0.077	CuSO ₄ (Scharlau)	0.16	USD 0.077
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck)	2.6	USD 0.240	(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck)	4.91	USD 0.389
Cloranfenicol (SIGMA)	0.1	USD 0.184	Cloranfenicol (SIGMA)	0.1	USD 0.184
H ₂ O para dilución*	1	USD 0.001	H ₂ O para dilución *	1	USD 0.001
Total		USD 9.367	Total		USD 0.951
10 % imprevistos		USD 0.937	10 % imprevistos		USD 0.095
19 % IVA		USD 1.780	19 % IVA		USD 0.181
Gran total		USD 12.084	Gran total		USD 1.227
U L⁻¹ (168 h, 0.15 L)		1373.72 ± 0.37	U L⁻¹ (168 h, 0.15 L)		12877.31 ± 481.23

*El valor de agua de disolución fue obtenido a partir del valor por m³ de agua establecido por la empresa de Acueducto y alcantarillado desde Julio de 2018 para la zona industrial de Bogotá D.C., Colombia (Empresa de Acueducto Alcantarillado y Aseo de Bogotá, 2018).

5.4 Discusión

P. pastoris es muy utilizada como hospedero para la expresión de proteínas recombinantes; sin embargo, pese a que el diseño y optimización de los medios de cultivo ha sido muy exitoso con otros organismos, aún no ha sido ampliamente explorado para *P. pastoris*. En general los medios químicamente definidos han sido los más utilizados para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, presionando al microorganismo a sintetizar todos los intermediarios metabólicos que requiere; lo que por lo general implica un crecimiento más lento que disminuye la expresión de las proteínas recombinantes debido a la carga metabólica (Heyland *et al.*, 2011; Matthews *et al.*, 2018). En este sentido los medios químicamente definidos incrementan los costos y no siempre incrementan la producción de metabolitos primarios y secundarios (Matthews *et al.*, 2018).

5.4.1 Selección de las fuentes económicas de nitrógeno

En la [Figura 5.1](#) se observa que con el uso de proteína aislada de soya 90 % como única fuente de nitrógeno orgánico en el medio de cultivo (T2, grupo estadístico b), la actividad enzimática fue inferior en comparación con T1 y T3 que fueron muy similares (grupo estadístico a); sin embargo, ninguno de los tratamientos propuestos superó el medio de cultivo control.

En T1 y T3 con las actividades enzimáticas más altas, el componente común fue el extracto de malta ([Figura 5.1](#)), fuente de nitrógeno orgánico con 2.71 % base seca (Bs) de proteínas y 77.34 % Bs de azúcares reductores como maltosa, ([Material Suplementario MS 5.1](#)). La maltosa funciona como fuente de energía en *P. pastoris* (Calik *et al.*, 2015). Además, el extracto de malta contiene vitaminas que actúan como cofactores dentro del metabolismo celular (Hucker *et al.*, 2014) y han sido reportadas como nutrientes importantes para el crecimiento celular (Matthews *et al.*, 2018). Aunque entre T1 y T3 no hubo diferencias en la actividad lacasa (grupo estadístico b), la selección de la fuente de nitrógeno se realizó teniendo en cuenta la concentración en cada una de las fuentes evaluadas, ya que, el metabolismo del nitrógeno es crítico en el catabolismo y el

anabolismo de proteínas, aminoácidos y otros compuestos nitrogenados (Zhang *et al.*, 2018). T3 contiene suero de leche como fuente de nitrógeno y aunque es rico en vitaminas y minerales, sólo contiene ~ 11 % de proteína en su composición (Material Suplementario MS 5.2) comparado con el 90 % de proteínas que contiene la proteína aislada de soya usada en T1 (Material Suplementario MS 5.3).

Las proteínas de origen vegetal como la proteína aislada de soya (90 %) contienen un alto porcentaje de aminoácidos esenciales como la glutamina (9.1 %), (Calderón De la Barca *et al.*, 2000; Lenders *et al.*, 2009). La glutamina, es una fuente de carbono y nitrógeno que aumenta parcialmente la carga metabólica en la producción de proteínas recombinantes (Heyland *et al.*, 2011), aumenta la tasa de crecimiento, es precursor de otros aminoácidos (Matthews *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018) y aumenta el flujo del ciclo de Krebs (TCA); aumentando el rendimiento y la productividad de las enzimas recombinantes entre el 20 - 26 % y el 15 - 27 %, respectivamente (Heyland *et al.*, 2011).

5.4.2 Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) para el diseño de un medio de cultivo de bajo costo

5.4.2.1 Diseño Central Compuesto-1 (CCD-1)

A partir de la composición de T1 se comenzó la optimización de las concentraciones de las fuentes de nitrógeno orgánico elegidas, el nitrógeno inorgánico y la glucosa. Los resultados del CCD-1 (Figura 5.2), muestran que el tratamiento T22 a las 72 h de cultivo logró una actividad enzimática y una específica, superiores a las encontradas en T1 y T3 (Figura 5.1), pero próximas a los resultados del control en los ensayos de selección de las fuentes económicas de nitrógeno. Sin embargo, en T22 las actividades enzimáticas y específicas disminuyeron a las 168 h de cultivo (Figura 5.2), aun así, continuaron por encima de los resultados de T1 y T3 (Figuras 5.1 y 5.2).

El análisis estadístico de las cuatro variables de respuesta (Tabla 5.5), mostró que el modelo cuadrático fue significativo ($p < 0.05$) para la actividad enzimática y la actividad específica a las 72 h de cultivo, mientras que a las 168 h de cultivo el modelo lineal fue el

que resultó significativo ($p < 0.05$); sin embargo, la pérdida de ajuste para la variable de respuesta actividad enzimática a las 72 h fue significativa al 91 %, por lo cual se prefirió descartar esta variable de respuesta. Pese a que las pérdidas de ajuste para actividad enzimática a las 168 h y las actividades específicas a las 72 y 168 h no fueron significativas ($p > 0.05$) se seleccionó la variable de respuesta actividad específica a las 72 h por tener el R^2 (0.7740) más alto entre las variables de respuestas cuya pérdida de ajuste fue significativa a menos del 63% (Tabla 5.4).

La Tabla 5.5, muestra que el F-valor de 2.94 implica que el modelo es significativo y que solo existe una probabilidad de 3.45% de que el F-valor sea debido al ruido. El Lack of Fit p -valor de 1.18 implica que no es significativa en relación con el error puro y que existe 54.18 % de probabilidad de que la pérdida de ajuste ocurra debido al ruido generado en los experimentos, siendo positiva para el modelo. Por otra parte, la "Precisión adecuada" (7.2192) mide la relación señal ruido y las relaciones mayores a 4 son deseables lo que indica que este modelo cuadrático aplicado a una actividad específica a las 72 h de cultivo se puede utilizar para navegar por el espacio de diseño

La Tabla 5.6 también muestra que la proteína aislada de soya (factor B) y B^2 tuvieron una significancia entre el 96 y 99 %, mientras que el factor A (glucosa) y el factor D ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) fueron significativos entre el 89 y 90 %; sin embargo, la interacción AB fue significativa entre el 93 y 95 %, mientras que AD, BD y D^2 no fueron significativas ($p > 0.05$); razón por la cual se decidió dejar fijos en el valor recomendado por el software los factores C-Extracto de Malta (11.74 g L^{-1}) y D- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4.91 g L^{-1}), (Figura 5.3) y estudiar en un nuevo diseño la interacción entre los factores A y B.

Los análisis estadísticos indicaron que la proteína aislada de soya fue un factor significativo ($p = 0.0346$), por lo que se propuso el aumento de su concentración. Los resultados coinciden con otras investigaciones, en las que el uso de fuentes orgánicas aumentó la producción de proteínas en comparación con las fuentes inorgánicas de nitrógeno (Pritchett and Baldwin, 2004; Choi and Park, 2006; de Almeida *et al.*, 2013); no obstante, la combinación de fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico es una estrategia

para aumentar la actividad lacasa (Patel *et al.*, 2009), cuya efectividad puede deberse a la forma de asimilación del nitrógeno; el nitrógeno inorgánico se absorbe rápidamente, mientras el nitrógeno orgánico suministra a las células factores de crecimiento y los aminoácidos para el metabolismo celular y la síntesis de proteínas (de Almeida *et al.*, 2013).

Pese a que el sulfato de amonio no tuvo un efecto importante sobre la actividad enzimática, se ha reportado que la densidad celular se incrementa con la adición del ion amonio al medio (NH_4^+), siempre y cuando no supere 600 mmol L^{-1} (Yu *et al.*, 2013), debido a que el exceso genera inhibición de crecimiento (Matthews *et al.*, 2018).

Por otra parte, algunos autores han reportado que la expresión de proteínas bajo el control del *pGAP* varía en función de la fuente de carbono (Calik *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016); siendo 30 % más baja en glicerol que en glucosa (Waterham *et al.*, 1997; Heyland *et al.*, 2011; Nicolini *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). Sin embargo, otros autores han reportado niveles de expresión superiores al utilizar glicerol como fuente de carbono (Flores *et al.*, 2009; Várnai *et al.*, 2014), lo que deja en claro que las características intrínsecas de la proteína a expresar también juegan un papel importante.

En esta parte del estudio la glucosa fue un factor significativo ($p = 0.1078$) entre 89-90 % para la actividad específica de rPOXA 1B (Tabla 5.5), muy probablemente a causa del incremento en la demanda energética durante el crecimiento microbiano y para sintetizar la rPOXA 1B, ya que, aunque la célula reajusta la distribución del flujo metabólico para aumentar el rendimiento de ATP, la capacidad del ajuste es limitada (Heyland *et al.*, 2011).

En este orden de ideas se sabe que las proteínas cuya expresión se correlaciona positivamente con el flujo de la vía glucolítica tienden a expresarse de la misma manera que las enzimas que participan en la vía (Ardila-Leal *et al.*, 2019); que es lo que sucede cuando se expresan proteínas bajo el control del promotor *pGAP* en presencia de fuentes de carbono que estimulan la glucólisis.

P. pastoris detecta la presencia de los nutrientes a través de múltiples rutas de señalización, para la formación de biomasa (Schneper *et al.*, 2004; Calik *et al.*, 2015). Una de las rutas más importantes en respuesta a la presencia de carbohidratos es la ruta: Ras/PKA (Proteína quinasa A, E.C. 2.7.11.11). La adición de glucosa activa Ras, (regulador de la proliferación celular) que activa la síntesis de cAMP y de PKA. La Proteína quinasa A, sirve como regulador central del metabolismo, del estado transcripcional de la célula, del almacenamiento de carbohidratos, de factores reguladores de la respuesta al estrés y de la biogénesis ribosomal (Zaman *et al.*, 2008; Ken Peeters *et al.*, 2017).

En comparación con *S. cerevisiae*, la absorción de glucosa en *P. pastoris* es limitada debido a su bajo número de genes transportadores de hexosa (Peña *et al.*, 2018). Mattanovich *et al.*, (2009) identificaron 14 supuestos transportadores de hexosa en *P. pastoris*; sin embargo, encontraron que dos de ellos tenían baja afinidad para transportar hexosas y que eran homólogos a algunos de *S. cerevisiae*, mientras que otros dos transportadores de hexosa de *P. pastoris* con alta afinidad por la glucosa eran homólogos con algunos de *Kluyveromyces lactis* (Mattanovich *et al.*, 2009). En contraste, en *S. cerevisiae* se han reportado 20 genes *HXT* que codifican transportadores de hexosa de baja y alta afinidad (Diderich *et al.*, 1999), lo que implica tasas más altas de absorción de glucosa (Calik *et al.*, 2015) en comparación con *P. pastoris*.

Estudiando el metabolismo del carbono en *P. pastoris* se ha encontrado que en cepas recombinantes, el flujo del ciclo de Krebs (TCA) aumenta 29 % (Nocon *et al.*, 2016) y que una parte de la glucosa suministrada es metabolizada a través de la vía de la pentosa fosfato (PPP); conclusión a la que se ha llegado debido a los análisis de relación del flujo que determinan el origen de un metabolito específico (Baumann *et al.*, 2010; Nocon *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017). Aunque no es posible conocer con exactitud el porcentaje de glucosa oxidada mediante PPP, se sabe que el aumento del flujo metabólico a través de PPP influye sobre el rendimiento de biomasa y la producción de proteínas heterólogas (Nie *et al.*, 2014; Nocon *et al.*, 2016). En consecuencia, se podría decir que el consumo controlado de glucosa es una estrategia celular para conservar carbono y el flujo de

electrones en la célula; lo que le permite a la levadura mantener una tasa alta de crecimiento (Zheng et al., 2012). Nuestros resultados coincidieron con los obtenidos por Vellanki et al., (2009), quienes demostraron que para la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, el porcentaje de glucosa debía ser superior a 1 % (p/v), (Vellanki et al., 2009).

La Figura 5.3, muestra que, al incrementar la concentración de proteína aislada de soya, por encima de la concentración de glucosa podría favorecer tanto la actividad enzimática ($U L^{-1}$) como la actividad específica ($U mg^{-1}$) y la deseabilidad del modelo, manteniendo la concentración de extracto de malta en $11.74 g L^{-1}$ y la concentración de $(NH_4)_2SO_4$ en $4.91 g L^{-1}$; lo cual fue determinado después de 100 ciclos de optimización navegando en la superficie del modelo.

Según lo anterior y además, de que la glucosa y la proteína aislada de soya fueron los únicos factores significativos en el diseño, se decidió continuar con la optimización del medio de cultivo, teniendo en cuenta que las concentraciones predichas por el modelo, glucosa USP ($9.53 g L^{-1}$) y proteína aislada de soya ($19.25 g L^{-1}$) quedarán incluidas dentro de la superficie de navegación ampliada en el CCD-2, mientras que el extracto de malta y el $(NH_4)_2SO_4$ quedaron fijos (Tabla 5.3).

5.4.2.2 Diseño Central Compuesto-2 (CCD-2)

En la Figura 5.4, se observa que el tratamiento T9 del CCD-2 superó al tratamiento T22 del CCD-1, tanto en actividad lacasa como en actividad específica a las 72 y 168 h de cultivo (T9: $6,608.80 \pm 62.20 U L^{-1}$, $775.09 \pm 8.75 U mg^{-1}$ en 72 h), (T9: $8,944.44 \pm 330.29 U L^{-1}$, $965.12 \pm 43.08 U mg^{-1}$ en 168 h). En la Figura 5.4 también se puede observar un cambio de pendiente en la actividad enzimática y en la actividad específica a partir de las 72 h; además, ninguna de las variables de respuesta disminuyó como ocurrió en el CCD-1, lo que sugiere que la relación $(C/N)_0$ pudo influir en el resultado, ya que concentraciones de nitrógeno relativamente más altas y relaciones $(C/N)_0$ más bajas proporcionan mayor crecimiento y producción de metabolitos primarios y secundarios (Zheng et al., 2012; Lopes et al., 2016).

En este diseño (CCD-2) el modelo cuadrático (Tabla 4.7) fue significativo para la actividad lacasa ($p < 0.0001$) y para la actividad específica ($p < 0.0001$), no obstante, el R^2 para la actividad específica fue mayor ($R^2 = 0.9504$) y la pérdida de ajuste no fue significativa ($p = 0.1677$), por lo que se decidió continuar el análisis estadístico con esta variable de respuesta (Material Suplementario MS 5.6). En el modelo cuadrático (CCD-2) el F-valor de 80.49 implica que el modelo es significativo y solo hay 0.01% de probabilidad de que el F-valor ocurra debido al ruido. En este caso A, B, AB and B^2 son significativos. Por otra parte, el Lack of Fit p -valor de 1.89 implica que no es significativo en relación con el error puro y que hay una probabilidad de 16.77 % de que los resultados de la experimentación sean debido al ruido. La R^2 -predicho de 0.9193 concuerda con el R^2 -ajustado de 0.9386 por que la diferencia entre estos es menos de 0.2. La Precisión Adecuada de 23.496 indica que el modelo puede ser usado para navegar por el espacio del diseño (Tabla 5.7).

Los resultados estadísticos del CCD-2, mostraron que la interacción AB fue significativa ($p < 0.0001$), B^2 también es significativo ($p = 0.0038$), mientras que A^2 no es significativo ($p > 0.05$), lo que significa que la concentración de glucosa debe dejarse en 20 gL^{-1} y se debe incrementar la concentración de proteína aislada de soya para ampliar la superficie de navegación, por lo cual se realizó un Diseño One Factor; este estudio de concentraciones mayores permitiría teóricamente incrementar las $U \text{ L}^{-1}$ y las $U \text{ mg}^{-1}$ (Figura 5.4).

5.4.2.3 One Factor Desing (OF)

El análisis estadístico de OF muestra que solo hay una probabilidad de 0.01 % de que el F-valor pueda ocurrir debido al ruido. Los factores A^2 y A^3 fueron significativos. El Lack of Fit p -valor de 2.92 implica que no es significativo en relación con el error puro y que hay una probabilidad de 20.14 % de que los resultados de la experimentación sean debido al ruido. Por otro lado, el R^2 -predicho de 0.9394 coincide con el R^2 -ajustado de 0.9654, por que la diferencia entre estos es menor de 0.2. La relación de la Precisión Adecuada de 21.645 indica que el modelo puede ser usado para navegar por el espacio del diseño.

En la [Figura 5.6 A](#), se observa que el tratamiento T4 del OF superó tanto la actividad lacasa como la actividad específica del tratamiento T9 del CCD-2, alcanzando $12,877.3 \pm 481.2$ U L⁻¹ de actividad enzimática y $1,243.83 \pm 24.1$ U mg⁻¹ de actividad específica a las 168 h. Adicionalmente, no se observó cambio de tendencia en la actividad enzimática y en la actividad específica a partir de las 72 h como se observó en T22 del CCD-1 y en T9 del CCD-2, lo que también podría indicar que la relación (C/N)₀ 5.4 ± 0.03 fue favorable para la producción de rPOXA 1B.

Al comparar el comportamiento de los azúcares reductores residuales en CCD-1, CCD-2 y OF ([Figuras 5.3, 5.5 y 5.6 A](#)), se observó que entre las 12 y 24 h se consumió la mayor parte quedando un remanente aproximado de 5 g L⁻¹ hasta el final del cultivo. Estos resultados son contrarios a lo que observó [Palma et al., \(2012\)](#), ya que ellos observaron reducción de la tasa de absorción de glucosa cuando el medio tenía limitación de nitrógeno en *S. cerevisiae* ([Palma et al., 2012](#)). Sin embargo, es importante recordar que *P. pastoris* posee menos transportadores de hexosa y que puede usar la glutamina presente en la proteína aislada de soya como fuente de carbono, lo que podría influir en la absorción de glucosa por parte de *P. pastoris*. Es importante tener en cuenta que la glucosa USP, el extracto de malta ([Material Suplementario MS 5.1](#)) y la proteína aislada de soya (0.126 g de azúcares reductores/10 g de proteína aislada de soya 90 %, datos no mostrados) tienen compuestos reductores que podrían interferir con la técnica de DNS ([Miller, 1959](#)) utilizada para la medición de los azúcares reductores residuales.

Como puede observar en la [Figura 5.6 B](#), en las concentraciones superiores a 50 g L⁻¹ de proteína aislada de soya, la actividad enzimática disminuyó ligeramente, lo que indica que bajo las condiciones de ensayo se ha alcanzado la optimización del medio. En este orden de ideas, la composición final del medio y las condiciones de cultivo óptimas fueron 20 g L⁻¹ glucosa USP (ChemiPharma), 50 g L⁻¹ proteína aislada de soya (Ciacomeq SAS), 11.74 g L⁻¹ extracto de malta (Proquímicas JG SAS), 4.91 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ (Merck), 0.161 g L⁻¹ CuSO₄ (Merck), 0.1 g L⁻¹ cloranfenicol (SIGMA).

5.4.2.4 Análisis de costos directo

Uno de los objetivos de este trabajo era diseñar un medio de cultivo de bajo costo; con el medio de cultivo resultante del OF se logró aumentar la actividad lacasa 30.54 % con relación a los resultados del CCD-2 y 75.76 % (Tampón acetato) con relación a los resultados obtenidos en biorreactor de 10 L en que se utilizó el medio de cultivo previamente mejorado ([Ardila-Leal et al., 2019](#)), de igual manera, se redujo el costo del medio de cultivo 89.84 %([Tabla 5.9](#)).

5.5 Conclusiones

Se optimizó un medio económico con una relación $(C/N)_0$ de 5.4 ± 0.03 que alcanzó a las 168 h, 12877.3 ± 481.2 U L⁻¹ de actividad enzimática y 1324.58 ± 114.19 U mg⁻¹ de actividad específica, aumentando la actividad lacasa producida en el CCD-1 y CCD-2, 63.16 % y 30.54 %, respectivamente. Los resultados, además, muestran que la proteína aislada de soya, el extracto de malta y la glucosa UPS son sustratos de bajo costo que incrementaron la actividad rPOXA 1B en *P. pastoris* (escala de Erlenmeyer) 28.55 veces con relación a los ensayos de clonación a escala de Erlenmeyer (Rivera-Hoyos et al., 2015), 9.58 veces con relación al medio previamente mejorado en Erlenmeyer (Ardila-Leal et al., 2019) y 4.11 veces con relación al medio mejorado previamente cuando fue ensayado en biorreactor de 10 L (6 L VET), (Capítulo 4), (Ardila-Leal et al., 2019). Por otra parte, se logró una reducción de 89.84 % del costo del medio de cultivo.

5.6 Referencias

- Amaral, P.F.F. and B.D. Ribeiro, (2013) Assays of phenoloxidase activity. In: Vermelho, A.B. and Couri, S. (Eds.), *Methods to Determine Enzymatic Activity*. Bentham eBooks, pp. 195-207.
- Ardila-Leal, L.D., D.A. Albarracín-Pardo, C.M. Rivera-Hoyos, E.D. Morales, R.A. Poutou-Piñales, *et al.*, (2019). Media improvement for 10 L bioreactor production of rPOXA 1B laccase by *P. pastoris*. **3Biotech**, 9 (12): Article 447. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-019-1979-y>
- Batra, J., D. Beri and S. Mishra, (2014). Response Surface Methodology based optimization of β -glucosidase production from *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 172: 380-393. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-013-0519-1>
- Baumann, K., M. Carnicer, M. Dragosits, A.B. Graf, J. Stadlmann, *et al.*, (2010). A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions. **BMC Systems Biology**, 4: 131. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-4-141>
- Bleve, G., C. Lezzi, G. Mita, P. Rampino, C. Perrotta, *et al.*, (2008). Molecular cloning and heterologous expression of a laccase gene from *Pleurotus eryngii* in free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 79: 731-741. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1479-1>
- Calderón De la Barca, A.M., R.A. Ruiz-Salazar and M.E. Jara-Marini, (2000). Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. **Food Chemistry and Toxicology**, 65 (2): 246-253. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb15988.x>
- Calık, P., Ö. Ata, H. Günes, A. Massahi, E. Boy, *et al.*, (2015). Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. **Biochemical Engineering Journal**, 95: 20-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.12.003>
- Cereghino, G.P., J. Cereghino, C. Ilgen and J. Cregg, (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, 13: 329-332. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00330-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00330-0)
- Choi, D.B. and E.Y. Park, (2006). Enhanced production of mouse α -amylase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-batch culture of recombinant *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, 41: 390-397. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2005.06.020>
- de Almeida, A.F., S.M.T. Aulk-Tornisielo and E. Cano Carmona, (2013). Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated *Candida viswanathii* strain. **Annals of Microbiology**, 63: 1225-1234. <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-012-0580-y>
- Diderich, J.A., M. Schepper, P. van Hoek, M.A.H. Luttk, J.P. van Dijken, *et al.*, (1999). Glucose uptake kinetics and transcription of *HXT* genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, 274 (22): 15350-15359. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.22.15350>

- Empresa de Acueducto Alcantarillado y Aseo de Bogotá, (2018) Tarifas acueducto. [https://www.acueducto.com.co/wps/html/resources/2018/tarifas2018/Tarifas BOGOTA 2018 Revisadas-1.xls](https://www.acueducto.com.co/wps/html/resources/2018/tarifas2018/Tarifas%20BOGOTA%202018%20Revisadas-1.xls).
- Flores, C., C. Vidal, M. Trejo-Hernández, E. Galindo and L. Serrano-Carreón, (2009). Selection of *Trichoderma* strains capable of increasing laccase production by *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus* in dual cultures. **Journal of Applied Microbiology**, 106 (1): 249-257. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03998.x>.
- Giardina, P., G. Palmieri, A. Scaloni, B. Fontanella, V. Faraco, *et al.*, (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical Journal**, 341: 655-663.
- Gidijala, L., S. Uthoff, S.J. van Kampen, A. Steinbüchel and R.M.D. Verhaert, (2018). Presence of protein production enhancers results in significantly higher methanol-induced protein production in *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, 17: 112. <http://doi.org/10.1186/s12934-018-0961-4>
- Gómez, G. and C. Batista, (2006). Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. **Cultivos Tropicales**, 27 (3): 17-24.
- Guo, M., F. Lu, L. Du, J. Pu and D. Bai, (2006). Optimization of the expression of a laccase gene from *Trametes versicolor* in *Pichia methanolica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 71 (6): 848-852. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-0210-8>
- Hahn-Hägerdal, B., K. Karhumaa, C.U. Larsson, M. Gorwa-Grauslund, J. Görgens, *et al.*, (2005). Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. **Microbial Cell Factories**, 4: 31. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-4-31>
- Heyland, J., J. FU, L. Blank and A. Schmid, (2011). Carbon metabolism limits recombinant protein production in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, 108: 1942-1953. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.23114>
- Hucker, B., L. Wakeling and F. Vriesekoop, (2014). Vitamins in brewing: the impact of wort production on the thiamine and riboflavin vitamer content of boiled sweet wort. **Journal of Institute of Brewing**, 120: 164-173. <http://dx.doi.org/10.1002/jib.142>
- Juturu, V. and J.C. Wu, (2018). Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. **ChemBiochem**, 19: 7-21. <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201700460>
- Ken Peeters, Frederik Van Leemputte, Baptiste Fischer, Beatriz M. Bonini, Hector Quezada, *et al.*, (2017). Fructose-1,6-bisphosphate couples glycolytic flux to activation of Ras. **Nature Communications**, 8: 922. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-01019-z>
- Lenders, C.M., S. Liu, D.W. Wilmore, L. Sampson, L.W. Dougherty, *et al.*, (2009). Evaluation of a novel food composition database that includes glutamine and other amino acids derived from gene sequencing data. **European Journal of Clinical Nutrition**, 63 (12): 1433-1439. <http://dx.doi.org/10.1038/ejcn.2009.110>

- Lopes, V.R.O., M.A. Farias, I.M.P. Belo and M.A.Z. Coelho, (2016). Nitrogen sources on TPOMW valorization through solid state fermentation performed by *Yarrowia lipolytica* **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 33 (02): 261-270. <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20160332s20150146>
- Mao, R., D. Teng, X. Wang, Y. Zhang, J. Jiao, *et al.*, (2015). Optimization of expression conditions for a novel NZ2114-derived antimicrobial peptide-MP1102 under the control of the GAP promoter in *Pichia pastoris* X-33. **BMC Microbiology**, 15: 57-57. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-0389-5>
- Mattanovich, D., N. Callewaert, P. Rouzé, Y.-C. Lin, A. Graf, *et al.*, (2009). Open access to sequence: Browsing the *Pichia pastoris* genome. **Microbial Cell Factories**, 8: Art 53. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-8-53>
- Matthews, C.B., A. Kuo, K.R. Love and J.C. Love, (2018). Development of a general defined medium for *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, 115: 103-113. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.26440>
- Miller, G., (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31 (3): 426-428. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Nicolini, C., N.L. Bragazzi, E. Pechkova, D. Bruzzese and M.T. Cambria, (2013). Recombinant laccase: I. Enzyme cloning and characterization. **Journal of Cellular Biochemistry**, 114 (3): 599-605. <http://doi.org/10.1002/jcb.24397>
- Nie, Y., M. Huang, J. Lu, J. Qian, W. Lin, *et al.*, (2014). Impacts of high α -galactosidase expression on central metabolism of recombinant *Pichia pastoris* GS115 using glucose as sole carbon source via ^{13}C metabolic flux analysis. **Journal of Biotechnology**, 187: 124-134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.07.011>
- Nocon, J., M. G. Steiger, M. Pfeffer, S.B. Sohn, T.Y. Kim, *et al.*, (2014). Model based engineering of *Pichia pastoris* central metabolism enhances recombinant protein production. **Metabolic Engineering**, 24: 129-138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2014.05.011>
- Nocon, J., M. Steiger, T. Mairinger, J. Hohlweg, H. Rußmayer, *et al.*, (2016). Increasing pentose phosphate pathway flux enhances recombinant protein production in *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 100: 5955-5963. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7363-5>
- Osma, J.F., J.L. Toca-Herrera and S. Rodríguez-Couto, (2011). Cost analysis in laccase production. **Journal of Environmental Management**, 92: 2907-2912. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.052>
- Palma, M., S.C. Madeira, A. Mendes-Ferreira and I. Sá-Correia, (2012). Impact of assimilable nitrogen availability in glucose uptake kinetics in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. **Microbial Cell Factories**, 11: 99. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-11-99>
- Patel, H., A. Gupte and S. Guote, (2009). Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a Basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. **BioResources**, 4 (1): 268-284.
- Peña, D.A., B. Gasser, J. Zanghellini, M.G. Steiger and D. Mattanovich, (2018). Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. **Metabolic Engineering**, 50: 2-15. <http://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.017>

- Pezzella, C., V.G. Giacobelli, V. Lettera, G. Olivieri, P. Cicatiello, *et al.*, (2017). A step forward in laccase exploitation: recombinant production and evaluation of techno-economic feasibility of the process. **Journal of Biotechnology**, 259: 175-181. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jbiotec.2017.07.022>
- Poutou, R.A., E. Amador and M. Candelario, (1994). Banco de células primario (BCP): Caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes. **Biotecnología Aplicada**, 11 (1): 55-59.
- Pritchett, J. and S.A. Baldwin, (2004). The effect of nitrogen source on yield and glycosylation of a human cystatin C mutant expressed in *Pichia pastoris*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 31: 553-558. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-004-0181-2>
- Ravindran, R. and A.K. Jaiswal, (2016). Microbial enzyme production using lignocellulosic food industry wastes as feedstock: A review. **Bioengineering** 3(4): 1-22. <http://doi.org/10.3390/bioengineering3040030>
- Rice, E.W., (2017) Standard methods for the examination of water and wastewater 2540 A, 23rd ed. Water Environment Federation.
- Rivera-Hoyos, C.M., E.D. Morales-Álvarez, R.A. Poutou-Piñales, A.M. Pedroza-Rodríguez, R. Rodríguez-Vázquez, *et al.*, (2013). Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, 27 (3-4): 67-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2013.07.001>
- Rivera-Hoyos, C.M., E.D. Morales-Álvarez, S.A. Poveda-Cuevas, E.A. Reyes-Guzmán, R.A. Poutou-Piñales, *et al.*, (2015). Computational analysis and low-scale constitutive expression of laccases synthetic genes *GLCC1* from *Ganoderma lucidum* and *POXA 1B* from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris*. **Plos One**, 10 (1): e0116524. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116524.g002>
- Saloheimo, M. and M.-L. Niku-Paavola, (1991). Heterologous Production of a Ligninolytic Enzyme: Expression of the *Phlebia Radiata* Laccase Gene in *Trichoderma Reesei*. **Nature Biotechnology**, 9: 987 - 990. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1091-987>
- Schneper, L., K. Düvel and J.R. Broach, (2004). Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, 7: 624-630. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.002>
- Theerachat, M., S. Emond, E. Cambon, F. Bordes, A. Marty, *et al.*, (2012). Engineering and production of laccase from *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, 125: 267-274. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.117>
- Trono, D., (2019) Recombinant enzymes in the food and pharmaceutical industries. In: Singh, R.S., Singhania, R.R., Pandey, A. and Larroche, C. (Eds.), *Advances in Enzyme Technology*. Elsevier, pp. 349-387.
- Várnai, A., C. Tang, O. Bengtsson, A. Atterton, G. Mathiesen, *et al.*, (2014). Expression of endoglucanases in *Pichia pastoris* under control of the GAP promoter. **Microbial Cell Factories**, 13: 57. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-13-57>
- Vellanki, R.N., R. Potumarthi and L.N. Mangamoori, (2009). Constitutive Expression and Optimization of Nutrients for Streptokinase Production by *Pichia pastoris* Using Statistical Methods. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 158: 25-40. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-008-8315-z>

- Wang, B., Y. Yan, Y. Tian, W. Zhao, Z. Li, *et al.*, (2016). Heterologous expression and characterisation of a laccase from *Colletotrichum lagenarium* and decolourisation of different synthetic dyes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 32: 40. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-015-1999-7>
- Waterham, H.R., M.H. Digan, P.J. Koutz, S.V. Lair and J.M. Cregg, (1997). Isolation of the *Pichia pastoris* Glyceroldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Gene and Regulation and Use of Its Promoter. **Gene**, 186: 37-44. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00675-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00675-0)
- Yu, X.-W., X. Lu, L.-S. Zhao and Y. Xu, (2013). Impact of NH₄⁺ nitrogen source on the production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, 48: 1462-1468. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.004>
- Zaman, S., S.I. Lippman, X. Zhao and J.R. Broach, (2008). How *Saccharomyces* Responds to Nutrients. **ANNUAL Review of Genetics**, 42: 27-81. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130206>
- Zhang, A.-L., J.-X. Luo, T.-Y. Zhang, Y.-W. Pan, Y.-H. Tan, *et al.*, (2009). Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. **Molecular Biology Report**, 36: 1611-1619. <http://doi.org/10.1007/s11033-008-9359-4>
- Zhang, W., G. Du, J. Zhou and J. Chen, (2018). Regulation of Sensing, Transportation, and Catabolism of Nitrogen Sources in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 82 (1): e00040-00017. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00040-17>.
- Zhang, Z.-y., Y.-k. Yang, C.-j. Zhan, X. Li, X.-x. Liu, *et al.*, (2017). *Pichia pastoris* X33 GT2 release the glycerol repression on AOX1 and efficiently express heterologous proteins. **China Biotechnology**, 37 (1): 38-45. <http://dx.doi.org/10.13523/j.ch.20170106>
- Zheng, J., W. Zhao, N. Guo, F. Lin, J. Tian, *et al.*, (2012). Development of an industrial medium and a novel fed-batch strategy for high-level expression of recombinant b-mananase by *Pichia pastoris*. **Bioresource Technology**, 118: 257-264. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.065>

5.7 Material Suplementario

MS 5.1. Reporte analítico del extracto de malta (FOOD CHEM)

Propiedades	Estándar (Método)	Resultados	
Análisis sensoriales			
Color visual	Beige claro (visual)	Cumple	
Olor y sabor	Características (S-1.1)	Cumple	
Apariencia	Polvo fino libre de material extraño	Cumple	
Análisis fisicoquímico			
% Humedad	5.0 máximo (FQ-1.1)	1.7	
pH (solución 10 %)	5.0 mínimo – 6.0 máximo (FQ-2.1)	5.72	
% Azúcares reductores (% Bs) (como Maltosa)	63.0 – 80.0 (FQ-3.1)	77.34	
Cenizas (% Bs)	(FQ-5.1)	0.83	
Color Hunter Lab	L	78.50 mínimo – 86.0 máximo (FQ-9.4)	82.96
	B	16.00 mínimo – 22.50 máximo (FQ-9.4)	17.23
% Acidez (Bs) (como ácido láctico)	20.00 máximo (FQ-6.2)	0.58	
Proteína (% Bs) (N x 6.25)	2.6 mínimo (FQ-4.1)	2.71	
Análisis Microbiológico			
Mesofílicos aeróbicos (UFCs/g)	5,000 máximo (MB-1.1)	2,200	
Coliformes totales (UFCs/g)	10 máximo (MB-2.1)	< 10	
<i>E. coli</i>	Negativo (MB-2.2)	Negativo	
Hongos (CFUs/g)	50 máximo (MB-3.1)	< 10	
Levaduras (CFUs/g)	50 máximo (MB-3.1)	< 10	
Esporas "Flat Sour" (UFCs/g)	200 máximo (MB-6.2)	25	
Esporas termofílicas totales	200 máximo (MB-6.2)	25	

MS 5.2 Composición del Suero de leche

Propiedades	Especificaciones	Resultados
Análisis fisicoquímico		
% Humedad	5.0 máximo	4.41
pH	5.5 mínimo - 8.5 máximo	6.27
% Grasas	1.5 máximo	1.01
% Cenizas	9.0 máximo	6.88
% Carbohidratos totales	70.00 mínimo	76.54
% Proteína	11.0 mínimo	11.19
Análisis Microbiológico		
Standar Plate count (UFCs/g)	≤ 30,000	5,000
Coliformes totales (UFCs/g)	≤ 10	< 10
Hongos (UFCs/g)	≤ 30	< 10
Levaduras (UFCs/g)	≤ 30	< 10
<i>Salmonella</i>	Negativo	Negativo

MS 5.3 Composición de la proteína aislada de soya 90% (SOYPRO 900)

Análisis Sensoriales	
Visual color	Creamy white or slightly yellow
Olor	Inodoro
Apariencia	Polvo
Análisis fisicoquímico	
Proteína (% Bs) (N x 6.25)	90.00 mínimo
% Humedad	8.0 máximo
pH	6.5 – 7.5
% Cenizas	8.0 máximo
% Grasas	0.7 máximo
Recuento de placas estándar (UFCs/g)	20000 máximo
Hongos	100/g máximo
Levaduras	100/g máximo
<i>E. coli</i>	Negativo
<i>Salmonella</i>	Negativo

MS 5.4. Tratamientos, relación C/N inicial (C/N)₀, valores de la actividad lacasa y actividad específica de cada uno de los tratamientos CCD-1 las 72 h y 168 h.

Tratamiento	Glucosa USP (g L ⁻¹)	Proteína aislada de soya (90%) (g L ⁻¹)	Extracto de malta (g L ⁻¹)	(NH ₄) ₂ S O ₄ (g L ⁻¹)	(C/N) ₀ ± SD		Actividad enzimática (U L ⁻¹)				Actividad específica (U mg ⁻¹)			
							72h		168h		72h		168h	
							Observada	Predicha	Observada	Predicha	Observada	Predicha	Observada	Predicha
1	3.3	10.0	7.0	2.6	6.13	0.04	2284.72	2548,47	1680,00	1463,83	220,71	246.375	164,10	134,85
2	3.3	20.0	7.0	2.6	5.00	0.04	2576.39	2973,52	1463,00	2487,41	229,44	268.747	124,02	190,11
3	10.0	20.0	14.0	5.2	6.57	0.04	4694.44	4533,61	3689,82	3865,69	431,61	415.877	330,87	338,51
4	3.3	20.0	7.0	5.2	4.88	0.05	2798.61	2968,61	2615,74	2727,81	244,28	264.309	223,35	191,85
5	6.7	5.0	10.5	3.9	9.70	0.06	4333.33	3385,23	824,07	1641,18	411,19	323.319	81,75	102,61
6	6.7	25.0	10.5	3.9	5.44	0.04	4395.83	4914,17	3467,59	3688,34	408,34	453.352	307,74	266,18
7	3.3	10.0	14,0	2.6	7.73	0.05	2784,72	3295,28	1791,67	1979,69	265,80	311.549	165,49	118,51
8	3.3	20.0	14.0	5.2	5.70	0.05	4215.28	3882,09	2925,93	3243,67	354,42	323.648	241,24	229,78
9	6.7	15,0	17.5	3.9	7.50	0.04	4729.17	4461,62	2773,15	3180,62	418,89	399.837	242,88	268,90
10	13.4	15.0	10.5	3.9	7.58	0.03	1486.11	1995,91	3768,52	3286,78	141,25	191.276	339,76	296,50
11	3.3	10.0	14.0	5.2	7.12	0.06	2923.61	3766,06	2092,59	2220,09	270,45	348.105	191,83	205,83
12	10.0	10.0	7.0	2.6	7.85	0.02	1930.56	2590,61	1097,22	2085,85	185,42	249.115	103,83	157,58
13	6.7	15.0	10.5	1.3	6.81	0.03	3534.72	3115,55	2652,78	2424,36	340,07	302.924	250,22	241,94
14	10.0	10.0	7.0	5.2	7.21	0.04	3513.89	3425,97	2518,52	2326,25	345,40	335,67	241,70	224,32
15	0.0	15.0	10.5	3.9	5.28	0.05	2298.61	1344,86	1787,04	2047,38	194,72	100.437	143,86	166,76
16	6.7	15.0	10.5	6.5	6.13	0.05	4222.22	4211,62	3194,44	2905,16	401,67	395,96	299,68	287,26
17, Punto central	6.7	15.0	10.5	3.9	6.43	0.04	4090.28	4340,38	4578,70	2664,76	325,62	397.667	341,49	313,07
18, Punto central	6.7	15.0	10.5	3.9	6.43	0.04	4506.94	4340,38	3574,07	2664,76	438,48	397.667	336,90	313,07
19	3.3	10.0	7.0	5.2	5.75	0.05	2479.17	2753,62	2402,78	1704,23	239,97	272.012	226,62	245,34
20	6.7	15.0	3.5	3.9	5.33	0.04	3972.22	3810,00	2555,56	2148,90	402,67	378.873	248,66	201,94
21	10.0	20.0	7.0	5.2	5.75	0.04	4812.50	4628,80	1777,78	3349,83	472,91	460.086	165,92	255,21

22	10,0	20,0	7,0	2,6	5,96	0,03	4743,06	4003,51	3569,44	3109,43	471,32	403.606	332,81	297,20
23	10,0	20,0	14,0	2,6	6,86	0,03	3590,28	3642,69	4175,93	3625,30	347,60	348.478	380,08	403,66
24	10,0	10,0	14,0	2,6	9,43	0,03	2395,83	2328,75	2041,67	2601,71	220,83	210.741	176,72	186,61
25	3,3	20,0	14,0	2,6	5,91	0,04	3430,56	3621,38	3282,41	3003,28	297,50	317.166	255,43	251,20
26	10,0	10,0	14,0	5,2	8,57	0,04	3500,00	3429,73	2879,63	2842,11	314,60	308.215	253,97	230,19
27, Punto central	6,7	15,0	10,5	3,9	6,43	0,04	4409,72	4340,38	2773,15	2664,76	427,50	397.667	261,15	313,07

Todos los tratamientos de CCD-1 incluyen:

CuSO₄ (g L⁻¹)	0.16
Cloranfenicol (g L⁻¹)	0.1

MS 5.5. Tratamientos, relación C/N inicial (C/N)₀, valores de la actividad lacasa y actividad específica de cada uno de los tratamientos CCD-2 a las 72 h y 168 h.

Tratamientos	Glucosa USP (g L ⁻¹)	Proteína aislada de soya (90%) (g L ⁻¹)	(C/N) ₀ ± SD		Actividad enzimática (UL ⁻¹)				Actividad específica (Umg ⁻¹)			
					72h		168h		72h		168h	
					Observado	Predicho	Observado	Predicho	Observado	Predicho	Observado	Predicho
T2-R1	10,0	40,0	5,10	0,04	5673,61	5450,92	5634,26	5234,12	588,65	551,06	566,27	531,46
T9-R1	22,1	30,0	6,66	0,02	6763,89	6353,8	9231,48	8588,95	788,63	742,49	1006,63	932,64
T2-R2	10,0	40,0	5,10	0,04	5409,72	5450,92	5416,67	5234,12	552,58	551,06	531,16	531,46
T1-R1	7,9	30,0	5,35	0,04	4979,17	5071,55	4500,00	4671,08	555,60	576,86	488,16	493,55
T7-R1	20,0	20,0	7,64	0,02	4763,89	5024,2	5652,78	5853,07	537,08	582,46	619,43	629,99
T8-R1	20,0	40,0	5,82	0,03	6479,17	6714,09	8694,44	9017,59	732,16	751,64	987,55	1007,72
T8-R2	20,0	40,0	5,82	0,03	6618,06	6714,09	9018,52	9017,59	726,47	751,64	971,01	1007,72
T4-R1	15,0	44,1	5,31	0,04	6187,50	6061,79	6990,74	6991,56	636,25	617,92	738,55	764,004
T7-R2	20,0	20,0	7,64	0,02	4798,61	5024,2	5453,70	5853,07	566,54	582,46	610,79	629,987
T3-R1	10,0	20,0	6,33	0,04	4215,28	4473,99	4879,63	4095,84	511,54	548,80	593,64	485,264
T3-R2	10,0	20,0	6,33	0,04	4631,94	4473,99	3652,78	4095,84	579,12	548,80	435,39	485,264
T8-R3	20,0	40,0	5,82	0,03	6444,44	6714,09	8601,85	9017,59	716,99	751,64	957,18	1007,72
T5-R1	15,0	15,9	7,66	0,03	4180,56	4176,06	3912,04	3949,02	487,31	496,69	439,90	464,24
T7-R3	20,0	20,0	7,64	0,02	4965,28	5024,2	5578,70	5853,07	584,28	582,46	618,41	629,99
T3-R3	10,0	20,0	6,33	0,04	4958,33	4473,99	4138,89	4095,84	633,39	548,80	496,76	485,26
T4-R2	15,0	44,1	5,31	0,04	6097,22	6061,79	7120,37	6991,56	606,19	617,92	737,63	764,00
T6- Punto central - R1	15,0	30,0	6,00	0,03	6020,83	6041,67	6064,81	6268,52	756,82	715,01	733,29	722,31
T9-R2	22,1	30,0	6,66	0,02	6666,67	6353,8	8453,70	8588,95	783,71	742,49	902,65	932,64
T5-R2	15,0	15,9	7,66	0,03	4250,00	4176,06	4074,07	3949,02	513,62	496,69	470,96	464,24
T6- Punto central - R2	15,0	30,0	6,00	0,03	5944,44	6041,67	6018,52	6268,52	701,02	715,01	683,01	722,31
T1-R2	7,9	30,0	5,35	0,04	4770,83	5071,55	4421,30	4671,08	539,89	576,86	472,03	493,55

T6- Punto central - R3	15,0	30,0	6,00	0,03	6159,72	6041,67	6722,22	6268,52	687,18	715,01	750,64	722,31
T2-R3	10,0	40,0	5,10	0,04	5597,22	5450,92	5171,30	5234,12	569,75	551,06	500,86	531,46
T1-R3	7,9	30,0	5,35	0,04	4916,67	5071,55	4379,63	4671,08	538,98	576,86	460,44	493,55
T9-R3	22,1	30,0	6,66	0,02	6395,83	6353,8	9148,15	8588,95	752,91	742,49	986,07	932,64
T5-R3	15,0	15,9	7,66	0,03	4166,67	4176,06	4134,26	3949,02	475,96	496,69	453,84	464,24
T4-R3	15,0	44,1	5,31	0,04	6048,61	6061,79	6944,44	6991,56	626,17	617,92	881,28	764,00

Todos los tratamientos de CCD-1 incluyen

Extracto de malta (g L⁻¹)	11.74
(NH₄)₂SO₄ (g L⁻¹)	4.91
CuSO₄ (g L⁻¹)	0.16
Cloranfenicol (g L⁻¹)	0.1

MS 5.6. ANOVA de las variables de respuesta de CCD-2

Response variable	Modelo	Suma de cuadrados	df	Cuadrado medio	F-Value	p-value Prob > F	R-Squared	Adj R-Squared	Adeq Precision	Pred R-Squared	Adj R-Squared - Pred R-Squared
Actividad enzimática (U L⁻¹) 72h	Modelo Cuadrático	1.81E+10	5	3.62E+09	69.31	< 0.0001	0.9429	0.9293	23.5692	0.9080	0.0213
	Lack of Fit	6.08E+05	3	2.03E+05	7.48	0.0019					
Actividad enzimática (U L⁻¹) 168h	Modelo Cuadrático	8.11E+07	5	1.62E+07	118.94	0.0000	0.9659	0.9578	29.1228	0.94316	0.0146
	Lack of Fit	1.15E+06	3	3.84E+05	4.03	0.0234					
Actividad específica (U mg⁻¹) 72h	Modelo Cuadrático	2.09E+05	5	41796.26	32.49	0.0000	0.8855	0.8583	15.0798	0.8098	0.0485
	Lack of Fit	12795.84	3	4265.28	5.40	0.0079					
Actividad específica (U mg⁻¹) 168h	Modelo Cuadrático	9.69E+08	5	1.94E+08	80.49	< 0.0001	0.9504	0.9386	23.4957	0.9193	0.0193
	Lack of Fit	12105.57	3	4035.19	1.89	0.1677					



Research article

Low-cost media statistical design for laccase rPOXA 1B production in *P. pastoris*

Leidy D. Ardila-Leal^{a,1}, María F. Alvarado-Ramírez^{b,1}, Ivonne S. Gutiérrez-Rojas^b, Raúl A. Poutou-Piñales^{a,*}, Balkys Quevedo-Hidalgo^b, Alejandro Pérez-Flórez^c, Aura M. Pedroza-Rodríguez^d

^a Laboratorio de Biotecnología Molecular, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Bogotá, D.C., Colombia

^b Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Bogotá, D.C., Colombia

^c Grupo de Fitoquímica de la PUJ (GIFUJ), Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Bogotá, D.C., Colombia

^d Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Bogotá, D.C., Colombia

ARTICLE INFO

Keywords:

Biotechnology
Microbiology
Mycology
Microbial biotechnology
Enzymology
Laccase
Enzyme
Pichia pastoris
Isolated soy protein
Malt extract
Low-cost substrate

ABSTRACT

Laccases (E.C. 1.10.3.2) are multicopper oxidases of great importance in the industry due to their non-specificity and high oxidative potential. Laccases are useful to bleach synthetic dyes, oxidize phenolic compounds and degrade pesticides, among others. Hence, the objective of this work was to optimize low cost culture media for recombinant (rPOXA 1B) laccase production from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris*. To this end, low cost nitrogen sources were studied, such as malt extract, isolated soy protein and milk serum. Following, two central composite designs (CCD) were performed. In CCD-1 different concentrations of glucose USP (0–13.35 gL⁻¹), protein isolated soy protein (5–25 gL⁻¹), malt extract (3.5–17.5 gL⁻¹) and (NH₄)₂SO₄ (1.3–6.5 gL⁻¹) were evaluated. In CCD-2 only different concentrations of glucose USP (7.9–22 gL⁻¹) and isolated soy protein (15.9–44.9 gL⁻¹) were evaluated. CCD-2 results led to a One Factor Experimental design (OFED) to evaluate higher isolated soy protein (20–80 gL⁻¹) concentrations. In all designs, (CCD-1, CCD-2 and OFED) CuSO₄ (0.16 gL⁻¹) and chloramphenicol (0.1 gL⁻¹) concentrations remained unchanged. For the OFED after sequential statistical optimization, an enzyme activity of 12,877.3 ± 481.2 UL⁻¹ at 168 h was observed. rPOXA 1B activity increased 30.54 % in comparison with CCD-2 results. Final composition of optimized media was: 20 gL⁻¹ glucose USP, 50 gL⁻¹ isolated soy protein 90 % (w/w), 11.74 gL⁻¹ malt extract, and 4.91 gL⁻¹ (NH₄)₂SO₄. With this culture media, it was possible to reduce culture media costs by 89.84 % in comparison with improved culture media previously described by our group.

1. Introduction

Laccases (EC 1.10.3.2) or para-benzenediol: dioxygen oxidoreductases are monomeric multicopper enzymes [1], with an approximate molecular weight of 60–70 kDa [2]. They belong to a group of lignolytic enzymes that have the capacity to oxidize phenolic compounds and similar substrates, in addition to reducing simultaneously molecular O₂ to H₂O [3]. Because of laccases low specificity for their substrates [4], they are used in a great number of biotechnological applications; such as

delignification of cellulose pulp, treatment of black liquor residue of cellulose pulping, degradation of aromatic polycyclic hydrocarbons, independent and simultaneous bioconversion of low density plastic and lignocellulosic material, soil bioremediation, wastewater treatment, discoloration and detoxification of industrial dyes, manufacture and synthesis of food processing material [5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12].

Different white rot fungi such as *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Rigidoporus lignosus*, *Trametes villosa*, *Rhizoctonia solani* and *Ganoderma lucidum* [3, 13] have been reported to produce laccase.

* Corresponding author.

E-mail address: rpoutou@javeriana.edu.co (R.A. Poutou-Piñales).

¹ These authors contributed equally to this work.

Specifically, *P. ostreatus* produces 11 types of laccases (isoenzymes) [3], of which POXA 1B has been widely studied for its great stability at alkaline pH and enzyme activity [14, 15]. However, enzyme production from the native organism is not sufficient to meet industrial demand, based fundamentally on fungi prolonged culture time [16].

Heterologous laccase production in hosts such as *Trichoderma reesei* [17], *Pichia methanolic* [18], *Yarrowia lipolytica* [19], *Saccharomyces cerevisiae* [20] and *Pichia pastoris* [15] has been a strategy to comply with industrial demands, due to achieved overexpressions through recombinant DNA technologies [21]. Never the less, among various heterologous hosts, *Pichia pastoris* a methylotrophic yeast, is known for recombinant protein production because of its robust secretion system, favouring protein processing [22]. Moreover, this yeast can reach high cell densities [23], it can be easily manipulated in the lab, expresses high levels of extracellular proteins and performs characteristic post-translational modifications of eukaryotes, such as glycosylations and disulfide bond formation, among others [24, 25].

Recombinant protein expression in *P. pastoris* is influenced by factors such as pH, temperature, media composition [26] and the promoter used for the genetic construction [27]. *P. pastoris* can grow in chemically defined basic media [25] and in complex media with biosynthetic precursors that can be catalyzed into various anabolic pathways, decreasing the need to produce it, which economizes metabolic energy and efficiency in the production of enzymes [28, 29]. For the design of culture media, it is necessary to know the nutritional requirements of the microorganism to be cultured [30], as well as the nutritional value for each component [31], for which different design methodologies and optimization of culture media have been employed. It is known that approximately 28 % of operation costs correspond to raw material [32, 33]. Therefore, research has been carried out with low cost media and it has been demonstrated that industrial grade compounds increases yields, productivities and enzyme production [27, 34].

Previous to this study, our group cloned *P. ostreatus* POXA 1B in *P. pastoris* [15] with an enzyme activity of $451.08 \pm 6.46 \text{ UL}^{-1}$ at 158 h, at shake flask scale in YPD media (2 % (w/v) D-glucose, 2 % (w/v) peptone, 1 % (w/v) yeast extract). Following the media was statistically improved (10 gL⁻¹ D-glucose, 20 gL⁻¹ peptone, 15 gL⁻¹ yeast extract, 0.16 gL⁻¹ CuSO₄, 2.67 gL⁻¹ (NH₄)₂SO₄), obtaining at 168 h a laccase activity of $1,343.52 \pm 40.30 \text{ UL}^{-1}$ at shake-flask scale. Improved media was then assayed at 10 L bioreactor (with 6 L of working effective volume WEV) obtaining $3159.93 \pm 498.90 \text{ UL}^{-1}$ at 192 h [35]. Therefore, the objective of this work was to design and statistically optimize a low cost culture media that increased *Pleurotus ostreatus* rPOXA 1B activity in *P. pastoris*.

2. Materials and methods

2.1. Strain

P. pastoris X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop strain containing the optimized synthetic gene coding for laccase POXA 1B under the control of the constitutive promoter of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (pGAP) (E.C. 1.2.1.12), was used [15]. The microorganism is stored in YPD broth, supplemented with glycerol at 20 % (w/v) at -30 °C at the Working Cell Bank (WCB) [36], of Molecular Biotechnology Laboratory from the “Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia”.

2.2. Strain reactivation and inoculum preparation

P. pastoris X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop vials were recovered from the WCB and inoculated into a 50 mL Erlenmeyer flask containing 5 mL YPD broth and incubated for 24 h at 200 r.p.m., and 30 °C. Once the strain was re-activated the inoculum was prepared in previously improved media (10 gL⁻¹ D-glucose, 20 gL⁻¹ peptone, 15 gL⁻¹ yeast extract, 0.16 gL⁻¹ CuSO₄, 2.67 gL⁻¹ (NH₄)₂SO₄) [35], incubated at 200 rpm and 30 °C until a

minimal optical density reading of 1.00 at 600 nm (OD₆₀₀) was reached. Assays performed in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 150 mL effective work volume (EWV) were inoculated with 10 % (v/v) inoculum.

2.3. Low cost nitrogen sources

Three inexpensive nitrogen sources at different concentrations were selected by cost for evaluation: isolated soy protein (90 %), (Ciacomeq SAS), malt extract (Proquímicas JG SAS) and powdered milk (Chem-iPharma) (Table 1, Supplementary Materials 1, 2 and 3). Taking into account nitrogen organic sources concentration was 35 gL⁻¹ (20 gL⁻¹ peptones, 15 gL⁻¹ yeast extract) in previously improved media [35]; nitrogen sources for each treatment to be evaluated were adjusted to 35 gL⁻¹. Each treatment was performed in triplicate in 250 mL Erlenmeyer flask containing 10 % (v/v) inoculum with WEV of 150 mL at 30 °C, for 168 h. Previously improved culture media was used as control [35]. Samples were collected at 0 and 168 h of culture and centrifuged for 10 min at 4,427 x g and 25 °C. Laccase activity (UL⁻¹) was determined from supernatant [37].

For statistical analysis one factor ANOVA was employed, followed by a Tukey *post-hoc* test to evaluate significant differences among treatments at 168 h of culture. Normal distribution of the response variable (enzyme activity in UL⁻¹) was previously verified using Kolmogorov-Smirnov test and variance homogeneity through Levene test. Statistical analysis was performed using SPSS Statistics® V. 21.0. (IBM).

2.4. Response surface methodology (RSM) for low cost culture media design

2.4.1. Central composite Design-1 (CCD-1)

To determine optimal concentrations for each pre-selected factor a first Central Composite Design-1 (CCD-1) was performed including a Central point (assay in triplicate) and two axial points (-1.5 and 1.5); axial points were calculated using a rotatable alpha (k = 2). Factors and levels included in the CCD-1 are illustrated in Table 2. Each treatment was performed in 250 mL Erlenmeyer flask with a 150 mL WEV, 10 % (v/v) inoculum incubated at 200 r.p.m., at 30 °C for 168 h. 2 mL of sample were collected at 0, 12, 72 and 168 h of culture and centrifuged at 4,427 x g and 25 °C. Residual reducing sugars (gL⁻¹) [38], were measured in the supernatant, as well as laccase activity (UL⁻¹) [37], and total protein concentration (mg mL⁻¹), [39]. Enzyme activity (UL⁻¹) and specific activity (Umg⁻¹) were used as response variables at 72 and 168 h of culture.

2.4.2. Central composite Design-2 (CCD-2)

To adjust the concentrations of significant CCD-1 factors a second Central Composite Design-2 (CCD-2) was performed including one central point, assayed in triplicate and two axial points (-1.5 and 1.5) that were evaluated in triplicate for 27 experiments; axial points were calculated using a rotatable alpha (k = 1.4142). Composition of each treatment proposed for this design is illustrated in Table 3. Assay conditions, sampling and response variables were similar to CCD-1.

2.4.3. One Factor Experimental design (OFED)

For this design, isolated soy protein, the significant factor in CCD-2, was taken into account. A cubic model between 20 gL⁻¹ and 80 gL⁻¹ (-1 and +1 respectively) was used and provided 5 central points for a total of 10 treatments (combinations with 20, 50 and 80 gL⁻¹) performed in duplicates. In this design, the factor Glucose (20 gL⁻¹) remained unchanged as established in CCD-2 (Table 4). Assay conditions, sampling and response variables were similar to CCD-1 and CDD-2.

2.4.4. CCD-1, CCD-2 and OFED statistical analyses

Factorial designs statistical analyses were performed using Design Expert® V9.0. Response variable normal distribution was evaluated using Kolmogorov-Smirnov test and variance homogeneity using Levene test.

Table 1. Media composition with different nitrogen sources.

Treatment	Carbon source/(gL ⁻¹)	Organic sources of nitrogen/(gL ⁻¹)	Inorganic sources of nitrogen/(gL ⁻¹)	Cofactor/(gL ⁻¹)	Other (gL ⁻¹)
Control	Glucose/(10)	Peptone/(20) Yeast extract/(15)	(NH ₄) ₂ SO ₄ /(2.67)	CuSO ₄ /(0.16)	Chloramphenicol (0.1)
T1	D-Glucose USP/(10)	Isolated soy protein/(20) Malt extract/(15)			
T2		Isolated soy protein/(35)			
T3		Milk serum/(20) Malt extract/(15)			

Table 2. CCD-1 composition, evaluated factors and their respective levels.

Factor	Level				
	-1.5	-1	Central Point	1	1.5
Glucose USP (gL ⁻¹)	-0.05**	3.3	6.65	10.0	13.35
Isolated soy protein (gL ⁻¹)	5.0	10.0	15.0	20.0	25.0
Malt extract (gL ⁻¹)	3.5	7.0	10.5	14.0	17.5
(NH ₄) ₂ SO ₄ (gL ⁻¹)	1.3	2.6	3.9	5.2	6.5
CuSO ₄ (gL ⁻¹)*	0.16				
Chloramphenicol (gL ⁻¹)*	0.1				

* These factors remained unchanged for all combinations.

** This value was assumed as 0.0.

Table 3. CCD-2 composition, evaluated factors and their respective levels.

Factor	Level				
	-1.5	-1	Central Point	1	1.5
D-Glucose USP (gL ⁻¹)	7.9	10.0	15.0	20.0	22.1
Isolated soy protein (gL ⁻¹)	15.9	20.0	30.0	40.0	44.1
Malt extract (gL ⁻¹)**	11.74				
(NH ₄) ₂ SO ₄ (gL ⁻¹)**	4.91				
CuSO ₄ (gL ⁻¹)*	0.161				
Chloramphenicol (gL ⁻¹)*	0.1				

* These factors remained unchanged for all combinations.

** These factors remained unchanged for all combinations and were derived from CCD-1 obtained results.

Table 4. OFED composition, evaluated factors and their respective levels.

Factor	Levels					
	-1	Central Points				1
Isolated soy protein (gL ⁻¹)	20.00	30.02	40.01	50.00	59.99	69.98
Glucose USP (gL ⁻¹ ***)	20					
Malt extract (gL ⁻¹ **)	11.74					
(NH ₄) ₂ SO ₄ (gL ⁻¹ **)	4.91					
CuSO ₄ (gL ⁻¹ *)	0.16					
Chloramphenicol (gL ⁻¹ *)	0.1					

* These factors remained unchanged for all combinations.

** These factors remained unchanged for all combinations and were derived from results obtained from CCD-1.

*** This factor remained unchanged for all combinations and was derived from results obtained in CCD-2.

2.5. Analytical techniques

2.5.1. Residual reducing sugar determination

Reducing sugar concentration obtained from sample supernatant was determined by 3,5-dinitrosalicylic acid assay (DNS), [38]. Standard curve was calculated from Eq. (1).

$$y = 0.5609x + 0.0001 \quad R^2 = 0.9992 \quad (1)$$

2.5.2. Enzyme activity assay

Laccase enzyme activity was performed using ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) as substrate. In a spectrophotometric cuvette 100 μ L of 20 mM ABTS was added in addition to centrifuged supernatant (from 2 to 20 μ L, depending on the amount of enzyme present in the sample) to complete a volume of 1 mL with 0.1 M (pH 3.0 \pm 0.2) citrate buffer. Absorbance change for 1 min at 420 nm was measured as resulting from ABTS oxidation [37]. One unit of enzyme (U)

is defined as the quantity of enzyme capable of transforming 1 μmol ABTS substrate per minute, per liter, and was calculated based on the following equation:

$$UL^{-1} = \frac{(\Delta E \times V_t)}{(\epsilon \times d \times V_s)} \quad (2)$$

Where: ΔE corresponds to final absorbance minus initial absorbance during 1 min of reaction, V_t total volume used in the reaction, ϵ ABTS molar extinction coefficient ($M^{-1} \text{cm}^{-1}$) at 420 nm, d cuvette diameter in cm and V_s sample volume (enzyme) added to the reaction [39].

2.5.3. Total protein determination

Total protein concentration determination for each sample was obtained from direct absorbance at 280 nm using UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) spectrophotometer [40].

2.5.4. Total carbon (TC, gL^{-1}), total nitrogen (TN, gL^{-1}) and initial carbon/nitrogen ratio (C/N)₀ determination

Total organic carbon (TOC) analyzer, Shimadzu (TOC-L) was used to measure both TC and TN concentrations, this device develops a unique method of catalytic combustion oxidation and NDIR, according to Standard Method 5310B [41]. Standard solutions (0.1 gL^{-1}) of each media components (separately) were prepared and then analyzed in the TOC device. Once TC and TN concentrations were detected, stoichiometric calculations were performed to determine the concentration in each culture medium (gL^{-1}) and the initial (C/N)₀ ratio.

2.5.5. Raw material cost analysis

Raw material costs employed for optimized low-cost media formulation were calculated, including 10 % contingencies and 19 % sales tax (VAT rate) at present for Colombia.

3. Results

3.1. Selection of low-cost nitrogen sources

Treatments generated two groups which were significantly different ($p < 0.001$) in regard to laccase activity at 168 h of culture (Figure 1). Control media was not included in mean comparison and had a laccase activity of $5,583.33 \pm 324.14 \text{ UL}^{-1}$. Treatments T3 and T1 had maximal laccase activities of $2,636.57 \pm 402.1 \text{ UL}^{-1}$ and $2,645.83 \pm 208.7 \text{ UL}^{-1}$, respectively (group a mean comparison), with no significant differences ($p > 0.05$). Moreover, laccase activity for T2 ($958.33 \pm 158.11 \text{ UL}^{-1}$), (group b), was considerably lower. Treatment T1 was the selected media for statistical optimization (10 gL^{-1} D-glucose USP, 20 gL^{-1} isolated soy protein, 15 gL^{-1} malt extract, 2.67 gL^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 0.16 gL^{-1} CuSO_4).

3.2. Central composite Design-1 (CCD-1)

In CCD-1 quadratic model was significant at 72 h for the enzyme activity (UL^{-1}) and specific enzyme activity (Umg^{-1}); whereas at 168 h the lineal model was significant (Table 5). However, despite R-Squared values were low it was decided to continue working with specific activity (Umg^{-1}) at 72 for having the least significant lack of fit and the second highest R-Squared.

For both response variables (enzyme activity and specific enzyme activity) at both selected hours (72 or 168 h) and both models (quadratic and lineal), the factors isolated soy protein and glucose were significant between 89 and 99% (Table 6). For the rest of the factors and their combinations and squares in the quadratic model was below 85%. Interaction prediction of the two most significant variables (D-glucose USP and isolated soy protein) on specific activity (Umg^{-1}) and laccase activity (UL^{-1}) at 72 and 168 h, respectively is illustrated in Figure 2. It was observed; augmented response variable resulted from simultaneous glucose and isolated soy protein concentration, increase.

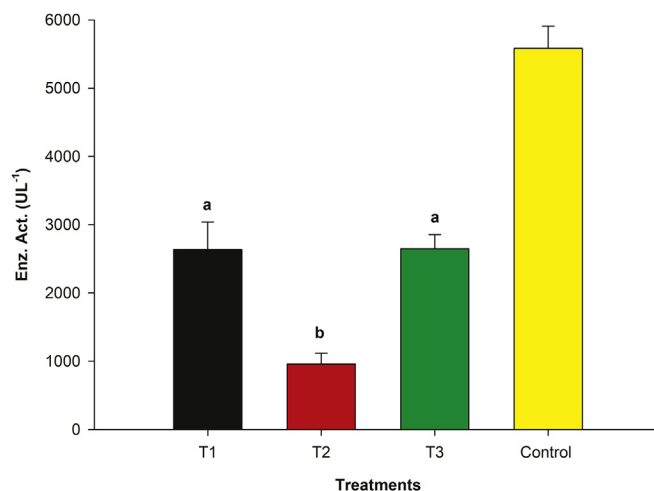


Figure 1. Laccase activity (UL^{-1}) mean comparison obtained from different treatments. Each bar corresponds to laccase activity at 168 h of culture (mean of $n = 3$). An $\alpha = 0.05$ was used.

CCD-1 results at 72 h demonstrated the need to vary glucose USP and isolated soy protein concentrations (Table 6, Figure 2). To this end, for CCD-2 malt extract was defined at 11.74 gL^{-1} and ammonium sulphate at 4.91 gL^{-1} (CCD-1 optimal predicted concentrations, instead of including them as CCD-2 factors). However, to obtain an ampler surface navigation than that initially proposed in CCD-1 glucose USP (9.53 gL^{-1}) and isolated soy protein (19.25 gL^{-1}) concentrations had to be included in the increased range of CCD-2 concentrations (Table 3). This design highlighted T22 treatment, whose (C/N)₀ ratio was 6.0 ± 0.03 (Figure 3, Supplementary Material 4) with an enzyme activity of $4,743.05 \pm 29.46 \text{ UL}^{-1}$ at 72 h. However, at 168 h laccase activity decreased to $3,569.44 \pm 96.23 \text{ UL}^{-1}$. This same behavior was also observed with obtained specific activity, which decreased from $471.32 \pm 3.37 \text{ Umg}^{-1}$ at 72h to $332.81 \pm 9.11 \text{ Umg}^{-1}$ at 168 h. On the other hand, reducing sugar concentrations considerably decreased during the first 12 h from 12.99 to 3.11 gL^{-1} . However, there was no total consumption at 168 h, with approximately 3 gL^{-1} residual sugar concentration at 168 h (Figure 3).

3.3. Central composite Design-2 (CCD-2)

Enzyme activity and specific activity in the CCD-2 quadratic model was significant at 72 h and 168 h. However, lack of fit was significant for enzyme activity at 72 h, but not for specific activity at 168 h (Table 7, Supplementary Material 6). Therefore, the remaining of the analysis was based on specific activity (Umg^{-1}) response variable.

Both factors glucose and isolated soy protein had a positive influence on specific activity and laccase activity. As factor concentration was augmented response variables also increased (Figure 4).

To obtain a laccase activity of 9,985.9 UL^{-1} and a specific activity of 1,137.8 Umg^{-1} (Figure 4) according to the model glucose optimal concentration had to be 20 gL^{-1} and isolated soy protein 39.87 gL^{-1} . Nonetheless, increasing isolated soy protein could improve activity results further (Figure 5, Table 7). Isolated soy protein (Factor B²) was significant for the model ($p = 0.0038$) as depicted in Table 7. Moreover, interaction between factors AB was significant ($p < 0.0001$) although A² was not ($p = 0.7841$). Therefore, in an attempt to optimize isolated soy protein concentration a One Factor Design was implemented.

This design highlighted T9 treatment, whose (C/N)₀ ratio was 6.7 ± 0.02 (Figure 5) with obtained higher laccase activity and specific activity (Supplementary Material 5), at 72 h ($6,608.80 \pm 62.20 \text{ UL}^{-1}$ and $725.21 \pm 14.41 \text{ Umg}^{-1}$), as well as 168 h with $8,944.44 \pm 330.28 \text{ UL}^{-1}$ and $971.92 \pm 17.61 \text{ Umg}^{-1}$. Results demonstrate CCD-2 exceeded T22 (CCD-1) for both sampling time (72 and 168 h). Again, during the first 12 h a

Table 5. CCD-1 ANOVA result analysis.

Response variable	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	p-value Prob > F	R-Squared
Enz. Act. (UL ⁻¹) 72h	Quadratic Model	1.98E+07	14	1.42E+06	3.26	0.0235*	0.7917
	Lack of Fit	5.12E+06	10	5.12E+05	10.78	0.0878	
Enz. Act. (UL ⁻¹) 168h	Linear Model	1.05E+07	4	2.64E+06	4.77	0.0063*	0.4645
	Lack of Fit	1.05E+07	20	5.26E+05	0.64	0.7645	
Spec. Act. (Umg ⁻¹) 72h	Quadratic Model	1.84E+05	14	1.31E+04	2.94	0.0345*	0.7740
	Lack of Fit	4.59E+04	10	4.59E+03	1.18	0.5418	
Spec. Act. (Umg ⁻¹) 168h	Linear Model	7.56E+04	4	1.89E+04	4.65	0.0072*	0.4580
	Lack of Fit	8.54E+04	20	4.27E+03	2.10	0.3722	

* Significant at 95%.

Table 6. CCD-1 quadratic model individual factor significance, duplicates and combined (Response variable: specific activity at 72 h de culture).

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Quadratic Model	1.84E+05	14	1.31E+04	2.94	0.0345*
A-Glucose	1.35E+04	1	1.35E+04	3.02	0.1078***
B- isolated soy protein	2.54E+04	1	2.54E+04	5.68	0.0346*
C-Malt extract	6.59E+02	1	6.59E+02	0.15	0.7076
D-(NH ₄) ₂ SO ₄	1.30E+04	1	1.30E+04	2.91	0.1140***
AB	1.75E+04	1	1.75E+04	3.91	0.0715**
AC	1.07E+04	1	1.07E+04	2.40	0.1473
AD	3.71E+03	1	3.71E+03	0.83	0.3800
BC	2.81E+02	1	2.81E+02	0.06	0.8063
BD	9.04E+02	1	9.04E+02	0.20	0.6608
CD	1.19E+02	1	1.19E+02	0.03	0.8729
A ²	8.49E+04	1	8.49E+04	19.00	0.0009*
B ²	1.16E+02	1	1.16E+02	0.03	0.8746
C ²	9.22E+01	1	9.22E+01	0.02	0.8882
D ²	3.10E+03	1	3.10E+03	0.69	0.4209
Residual	5.36E+04	12	4.47E+03		
Lack of Fit	4.59E+04	10	4.59E+03	1.18	0.5418
Pure Error	7.75E+03	2	3.87E+03		
Cor Total	2.37E+05	26			
R-Squared					0.7740
Adj R-Squared					0.5104
Adeq Precision					7.2192

* 96–99 % significance.

** 93–95 % significance.

*** 89–90 % significance.

decrease in reducing sugars was observed, although not completely with approximately 5 gL⁻¹ residual sugars maintained until 168 h.

3.4. One Factor Experimental design (OFED)

In this design the cubic model was significant ($p < 0.0001$) at 168 h of culture (Table 8) and treatment T4 with a (C/N)₀ ratio of 5.4 ± 0.03 and 50 gL⁻¹ isolated soy protein demonstrated the highest enzyme activity ($12,877.31 \pm 481.23$ UL⁻¹) and the highest specific activity ($1,324.58 \pm 114.19$ Umg⁻¹) at 168 h (Figure 6A), slightly exceeding model prediction which was 12,536.1 UL⁻¹ with a desirability of 0.914 at 168 h (Figure 6B).

3.5. Raw material cost analysis

Optimized low cost culture media had a cost of \$ 1,227 USD/litre, which represents close to 89.84 % less in comparison with previously improved media (\$12,084 USD/litre). Cost analysis is shown in Table 9 including 10 % contingencies and 19 % sales tax at present for Colombia [42].

4. Discussion

P. pastoris is a widely used host for expression of recombinant proteins. Culture media optimization design has been very successful with

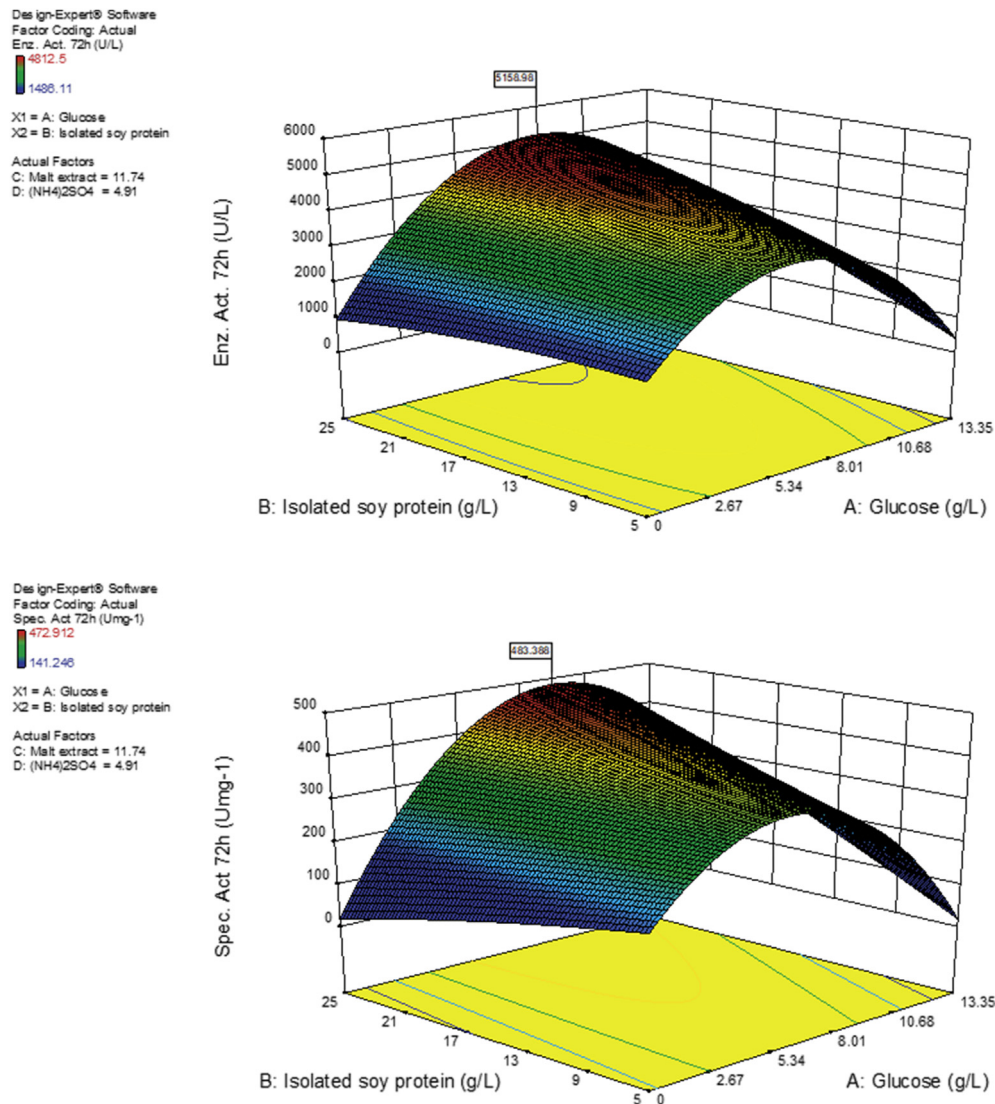


Figure 2. CCD-1 contour graph. Effect of factor interaction between glucose (A) and isolated soy protein (B) on laccase activity (top) and specific activity (bottom).

other organisms; however, it has not been widely explored for *P. pastoris*. In general, chemically defined media are the most used for recombinant protein production in *P. pastoris*, subjecting the microorganism to synthesize required metabolic intermediates, usually implying a slower growth decreasing recombinant protein expression due to metabolic burden [31, 44]. Hence, chemically defined media increase costs, and not always increasing primary and secondary metabolite production [31].

4.1. Low cost nitrogen source selection

It was observed enzyme activity was much lower when, isolated soy protein (90 %) was used as the only source of organic nitrogen source in culture media (T2, statistical group b), in comparison with T1 and T3 treatments, which were similar (statistical group a) (Figure 1). However, none of the proposed treatments exceeded control culture media enzyme activity.

Treatments T1 and T3, with higher enzyme activities, had in common malt extract as the organic source of nitrogen with 2.71 % w/w protein and 77.34 % w/w reducing sugars such as maltose, (Supplementary Material 1). Malt extract also contains vitamins and growth promoters [45], which were important for rPOXA 1B production (Figure 1). Even though, there were no differences in laccase activity between T1 and T3 (statistical group b), nitrogen source selection was performed taking into

account the concentration of each of the evaluated nitrogen sources, since nitrogen metabolism is critical for the catabolism and anabolism of proteins, amino acids and other nitrogenous compounds [46]. T3 contained milk serum as the source of nitrogen, although rich in vitamins and minerals, only 11 % of its composition are proteins (Supplementary Material 2) in comparison with 90 % proteins in isolated soy protein in T1 media (Supplementary Material 3).

Proteins of vegetable origin, such as isolated soy protein (90 %) contain a high percentage of essential amino acids, such as glutamine [47, 48]. Glutamine is a source of carbon and nitrogen that partially increases the metabolic load caused by recombinant protein production [44], it increases growth rate, and is a precursor of other amino acids [31, 46]. In addition, it raises Krebs cycle (TCA) flux, increasing recombinant enzyme yield and productivity between 20 - 26 % and 15–27 %, respectively [44].

4.2. Response surface methodology (RSM) for low cost culture media design

4.2.1. Central composite Design-1 (CCD-1)

Starting from the composition of T1, optimization of the concentrations of selected organic nitrogen sources, inorganic nitrogen and glucose began. CCD-1 results (Figure 2), demonstrated treatment T22 at 72 h of

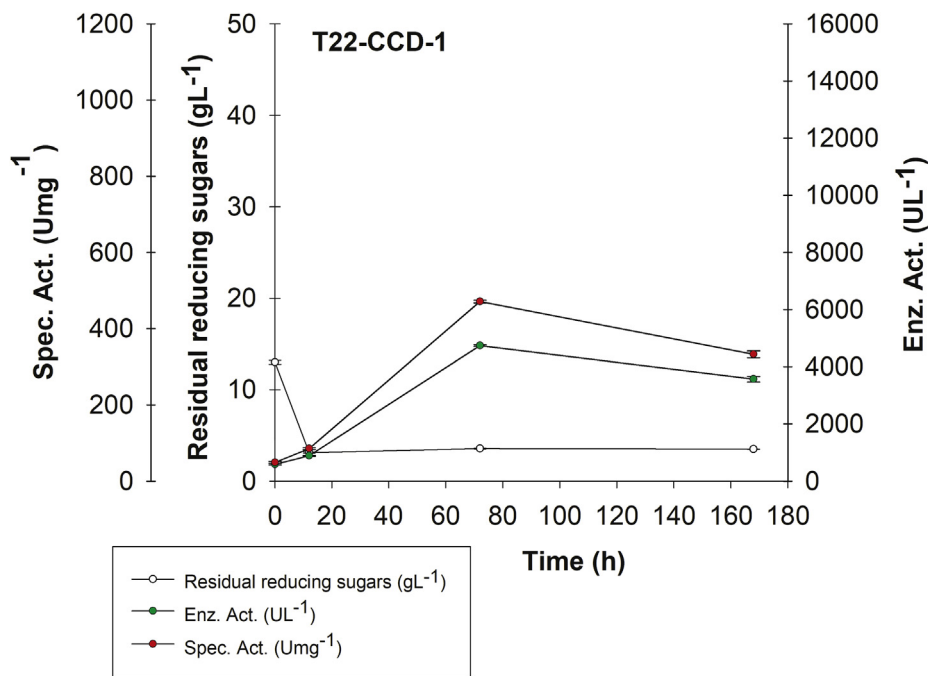


Figure 3. rPOXA 1B production kinetics. Central Composite Design-1 (CCD-1) for treatment T22.

Table 7. CCD-2 ANOVA result analysis for specific activity (Umg⁻¹) at 168 h.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Quadratic Model	1.E+06	5	2.E+05	80.49	< 0.0001
A-Glucose	6.E+05	1	6.E+05	240.24	< 0.0001
B-Isolated soy protein	3.E+05	1	3.E+05	111.96	< 0.0001
AB	8.E+04	1	8.E+04	34.24	< 0.0001
A ²	2.E+02	1	2.E+02	0.08	0.7841
B ²	3.E+04	1	3.E+04	10.61	0.0038
Residual	5.E+04	21	2.E+03		
Lack of Fit	1.E+04	3	4.E+03	1.89	0.1677
Pure Error	4.E+04	18	2.E+03		
Cor Total	1.E+06	26			
R-Squared					0.9504
Adj R-Squared					0.9386
Pred R-Squared					0.9193
Adeq Precision					23.496

In bold: model and significant factors ($p < 0.05$).

culture achieved an enzyme activity and specific activity higher than that observed for T1 and T3 (Figure 1), yet similar to control results in low cost nitrogen source selection. Nonetheless, T22 enzyme activities and specific activities decreased at 168 h of culture (Figure 2), yet they were higher than those observed in T1 and T3 results (Figures 1 and 2).

Statistical analysis for the four response variables (Table 5), revealed the quadratic model was significant ($p < 0.05$) for enzyme activity and specific enzyme activity at 72 h of culture, whereas at 168 h of culture the linear model was significant instead ($p < 0.05$). Nonetheless, lack of fit for response variable: enzyme activity at 72 h was significant at 91 %, therefore this response variable was discarded. Although lack of fit for enzyme activity at 168 h and specific activities at 72 and 168 h were not significant ($p > 0.05$), specific activity at 72 h response variable was selected for having the highest R² (0.7740) among all response variables, whose lack of fit was significant at least less than 63 % (Table 4).

Table 5 shows that an F-value of 2.94 implies the model was significant, and there was only a 3.45 % chance that an F-value this large could occur due to noise. The "Lack of Fit F-value" of 1.18 implied the Lack of Fit was not significant relative to pure error and there was a 54.18 % chance that a "Lack of Fit F-value" this large could occur due to noise, representing a good signal for the model. On the other hand, "Adeq Precision" (7.2192) measures the signal to noise ratio with a desirable ratio greater than 4, indicating that this quadratic model applied at specific activity at 72 h of culture, can be used to navigate the design space.

Table 6 also shows that isolated soy protein (factor B) and B² had a significance between 96 and 99%, whereas factor A (glucose) and factor D ((NH₄)₂SO₄) were significant between 89 and 90%. However, AB interaction was significant between 93 and 95%, while AD, BD and D² were not significant ($p > 0.05$). Hence, it was decided to maintain unchanged the values recommended by the software for the factors: C-Malt

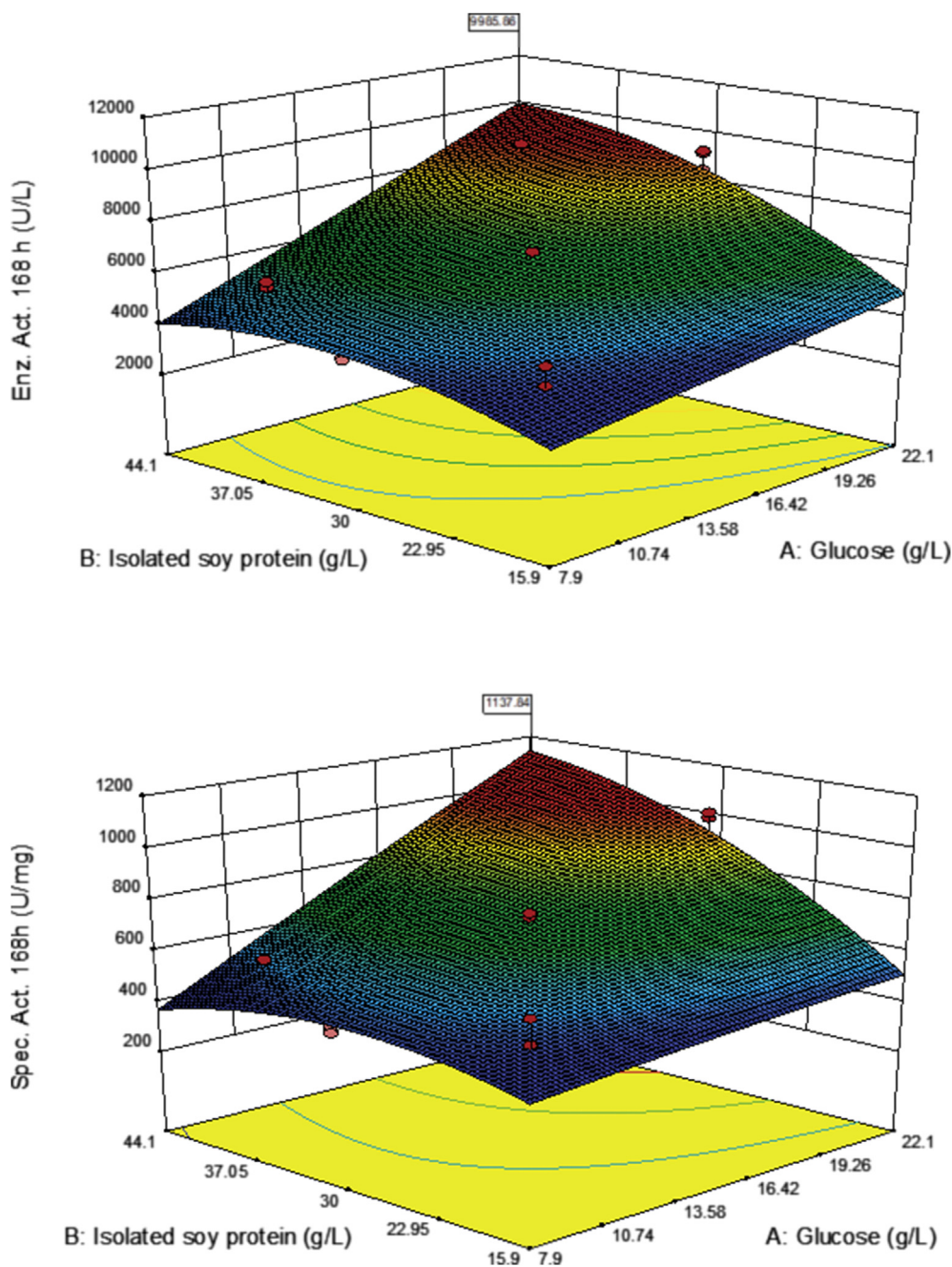


Figure 4. CCD-2 contour graph. Effect of factor interaction between glucose (A) and isolated soy protein (B) on laccase activity (top) and specific activity (bottom).

extract (11.74 g L^{-1}) and $\text{D}-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4.91 g L^{-1}) (Figure 3), and study in a new design the interaction between factors A and B.

Statistical analyses indicated isolated soy protein was a significant factor ($p = 0.0346$); thus, an increase in its concentration was proposed. Our results agree with those of other investigations, where use of organic sources increased protein production in comparison with inorganic sources of nitrogen [49, 50, 51]. Nevertheless, the combination of organic and inorganic nitrogen is a strategy to increase laccase activity [52], whose effectiveness could be due to nitrogen assimilation. Inorganic nitrogen is easily absorbed, while organic nitrogen supplies cells with growth factors and amino acids for cell metabolism and protein synthesis [50].

Even though ammonium sulphate did not have an important effect on enzyme activity, it has been reported cell density increases with media

supplementation with ammonium ion (NH_4^+), as long as it does not exceed 600 mmol L^{-1} [53], since excess inhibits cell growth [31].

Additionally, other authors have reported protein expression under the control of the *pGAP* promoter varies according to carbon source [4, 45]. It has been reported glycerol as a source of carbon results in 30% less production in comparison with glucose [4, 13, 44, 54]. In contrast, other authors have reported higher levels of expression when glycerol is used as a source of carbon [16, 55], evidencing that intrinsic characteristics of the protein to be expressed also play a key role.

In this part of the study for rPOXA 1B specific activity glucose was a significant factor ($p = 0.1078$) between 89–90% (Table 5), probably as a result of energy demand during microbial growth to synthesize rPOXA 1B, although the cell readjusts its metabolic flow distribution to increase ATP yield, this adjustment is limited [44].

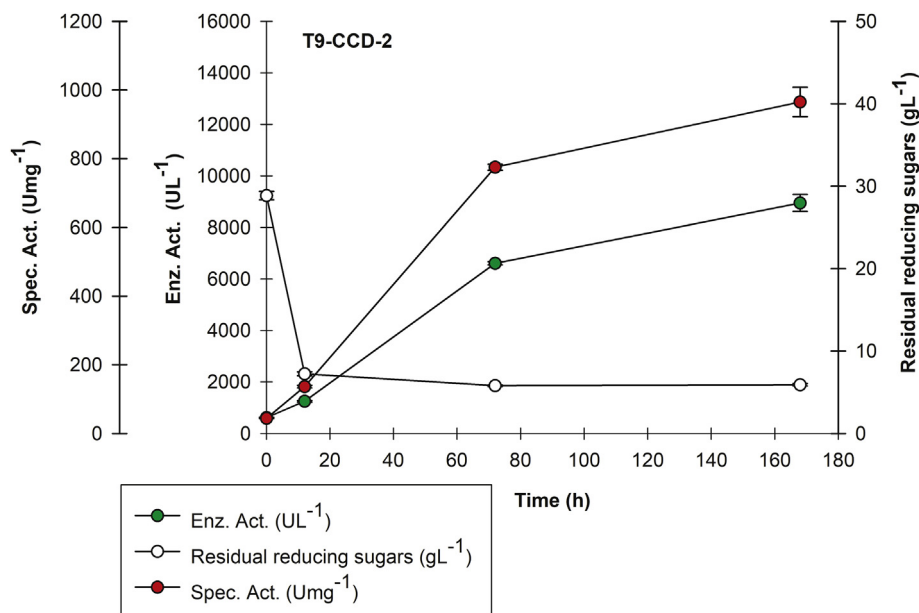


Figure 5. rPOXA 1B production kinetics. Central Composite Design-1 (CCD-2) for treatment T9.

Table 8. OFED ANOVA result analysis for enzyme activity (U L⁻¹) at 168 h.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model Cubic	7.39E+07	3.00	2.46E+07	84.75	<0.0001
A-isolated soy protein	6.33	1.00	6.33	0.00	0.9964
A2	3.22E+07	1.00	3.22E+07	110.88	<0.0001
A3	3.55E+06	1.00	3.55E+06	12.21	0.0129
Residual	1.74E+06	6.00	2.91E+05		
Lack of Fit	1.30E+06	3.00	4.33E+05	2.92	0.2014
Pure Error	4.46E+05	3.00	1.49E+05		
Cor Total	7.57E+07	9.00			
R-Squared					0.9769
Adj R-Squared					0.9654
Pred R-Squared					0.9394
Adeq Precision					21.6448

Bold signifies model and significant factors ($p < 0.05$).

Moreover, proteins whose expression positively correlate with the glycolytic flux tend to express in the same manner the enzymes that participate in the pathway [35]; which arises when proteins are expressed under the control of the *pGAP* promoter in the presence of carbon sources that stimulate glycolysis.

For biomass production *P. pastoris* detects the presence of nutrients through multiple signaling pathways [45]. One of the most important pathways in response to the presence of carbohydrates is the: Ras/PKA (Protein Kinase A, E.C. 2.7.11.11) signaling pathway. Supplementing with glucose activates Ras (a regulator of cell proliferation) that in turn activate synthesis of cAMP and PKA. Protein kinase A acts as a central regulator of metabolism of the cell's transcriptional state, carbohydrate storage, factors regulators of stress and ribosomal biogenesis [56, 57].

In comparison with *S. cerevisiae*, *P. pastoris* glucose absorption is limited due to the decreased number of hexose transporter genes [58]. Mattanovich *et al.*, (2009) identified 14 supposed hexose transporters in *P. pastoris*. They found two had low affinity to transport hexose and they were homologous to some *S. cerevisiae* transporters, whereas two other transporters in *P. pastoris* with high affinity for hexose were homologous

with some in *Kluyveromyces lactis* [59]. In contrast, in *S. cerevisiae* 20 *HXT* genes coding for hexose transporters of high and low affinity have been reported [60], which suggests higher rates of glucose absorption [45] in comparison with *P. pastoris*.

Regarding *P. pastoris* carbon metabolism it has been reported for recombinant strains Krebs cycle flow (TCA) increases 29 % [61], and part of the administrated glucose is metabolized through the phosphate pentose pathway (PPP), conclusion reached due to flow relationship analyzes that determine the origin of a specific metabolite [61, 62, 63]. Although it is not possible to determine with precision the percentage of oxidized glucose through the PPP, it is known an increase in the metabolic flux through the PPP has an influence on the biomass yield and heterologous protein production [61, 64]. Consequently, one could say that controlled consumption of glucose is a cellular strategy to conserve carbon and electron flow within the cell, which allows yeast to maintain a high rate of division [34]. Our results are in agreement with those reported by Vellanki *et al.*, (2009), who demonstrated for recombinant protein expression in *P. pastoris*, glucose percentage should be higher than 1 % (w/v), [65].

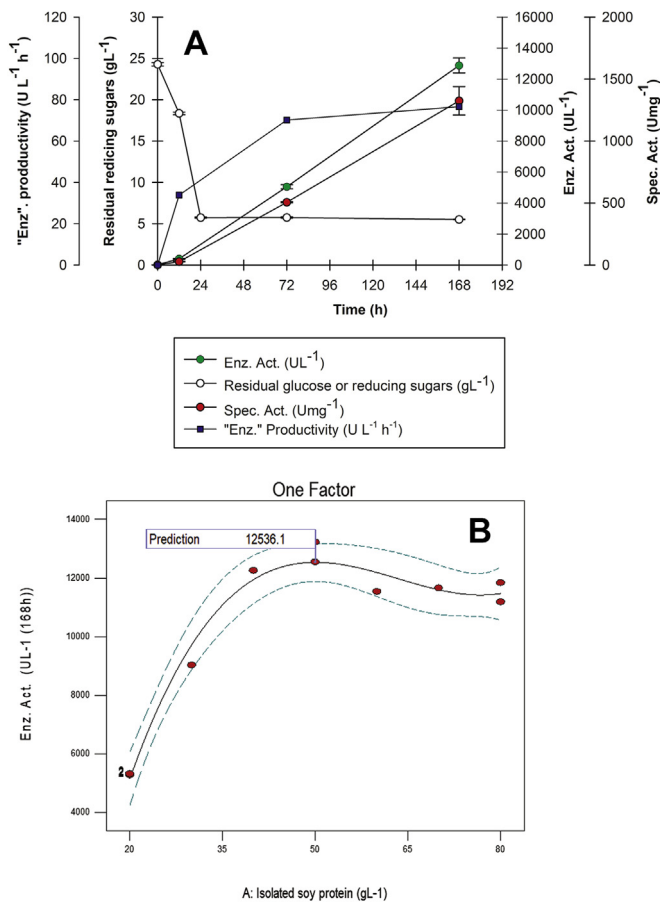


Figure 6. One Factor Design kinetics and prediction. A. rPOXA 1B production kinetics. B. One Factor design prediction.

It was observed enzyme activity (UL^{-1}) and specific activity (Umg^{-1}) and the desirability of the model were favoured when isolated soy protein concentration was increased above glucose's concentration (Figure 3), maintaining malt extract at 11.74 gL^{-1} and $(NH_4)_2SO_4$ at 4.91 gL^{-1} ; which was determined after 100 optimization cycles navigating through the design surface.

According to the aforementioned, and due to the fact that glucose and isolated soy protein were the only significant factors in the design, it was

decided to continue culture media optimization taking into account the model's predicted concentrations. Moreover, glucose USP (9.53 gL^{-1}) and isolated soy protein (19.25 gL^{-1}) were included within the amplified navigation surface in CCD-2, while malt extract and $(NH_4)_2SO_4$ remained unchanged (Table 3).

4.2.2. Central composite Design-2 (CCD-2)

CCD-2 T9 treatment surpassed CCD-1 T22 in laccase activity, as well as specific activity at 72 h and 168 h of culture (T9, $6,608.80 \pm 62.20\text{ U L}^{-1}$, $775.09 \pm 8.75\text{ U mg}^{-1}$ at 72 h), (T9, $8,944.44 \pm 330.29\text{ U L}^{-1}$, $965.12 \pm 43.08\text{ U mg}^{-1}$ at 168 h), Figure 4. In Figure 4, it was observed too a change in slope was observed for enzyme activity and specific activity at 72 h. In addition, none of the response variables decreased, as was observed for CCD-1, suggesting $(C/N)_0$ ratio did not influence the result, since relatively higher nitrogen concentrations and lower $(C/N)_0$ ratios provide primary and secondary metabolite production [34, 66].

In this CCD-2 design the quadratic model (Table 7) was significant for laccase activity ($p < 0.0001$) and specific activity ($p < 0.0001$), however, R^2 for specific activity was higher ($R^2 = 0.9504$) and lack of fit was not significant ($p = 0.1677$). Therefore, it was decided to continue statistical analysis with this response variable (Supplementary Material 5). CCD-2 quadratic model's F-value of 80.49 implied the model was significant and there was only a 0.01% chance that an F-value this large could be due to noise. In this instance, A, B, AB and B^2 were significant model terms. On the other hand, a lack of fit F-value of 1.89 implied it was not significant relative to pure error and that there was a 16.77% chance that an F-value this large could occur due to noise. The Pred R-Squared of 0.9193 was in reasonable agreement with the Adj R-Squared of 0.9386 because differences between them were less than 0.2. An Adeq Precision ratio of 23.496 indicated this model could be used to navigate the design space (Table 7).

CCD-2 statistical results demonstrated AB interaction was significant ($p < 0.0001$), B^2 was also significant ($p = 0.0038$), whereas A^2 was not significant ($p > 0.05$). This connoted glucose concentration had to remain at 20 gL^{-1} and isolated soy protein concentration had to be increased to amplify the navigation surface. Thus, a One Factor Design was performed. This higher concentration study would theoretically allow increasing $U\text{ L}^{-1}$ and $U\text{ mg}^{-1}$ (Figure 4).

4.2.3. One Factor Experimental design (OFED)

The study showed there was only a 0.01% chance an F-value this large could occur due to noise. In this instance, A^2 and A^3 were significant model terms. The lack of fit F-value of 2.92 implied that it was not

Table 9. Media cost comparison between previously improved media [35] vs. low cost optimized media.

Previously improved media			Low cost optimized media		
Reference	[35]		Reference	Present study	
Component	($g\text{ L}^{-1}$) o L	Cost/L (USD)	Component	($g\text{ L}^{-1}$) o L	Cost/L (USD)
Glucose (Merck)	10	\$ 0.640	Glucose USP (ChemiPharma)	20	\$ 0.037
Peptone (Oxoid)	20	\$ 6.740	Isolated soy protein (Ciacomeq SAS)	50	\$ 0.200
Yeast extract (Oxoid)	15	\$ 1.485	Malt extract (Proquímicas JG SAS)	10.28	\$ 0.063
$CuSO_4$ (Scharlau)	0.16	\$ 0.077	$CuSO_4$ (Scharlau)	0.16	\$ 0.077
$(NH_4)_2SO_4$ (Merck)	2.6	\$ 0.240	$(NH_4)_2SO_4$ (Merck)	4.91	\$ 0.389
Chloramphenicol (SIGMA)	0.1	\$ 0.184	Chloramphenicol (SIGMA)	0.1	\$ 0.184
H_2O for dilution*	1	\$ 0.001	H_2O for dilution*	1	\$ 0.001
Total		\$ 9.367	Total		\$ 0.951
10 % contingencies		\$ 0.937	10 % contingencies		\$ 0.095
19 % sales tax		\$ 1.780	19 % sales tax		\$ 0.181
Grand total		\$ 12,084	Grand total		\$ 1.227
$U\text{ L}^{-1}$ (168 h, 0.15 L)		$1,373.72 \pm 0.37$	$U\text{ L}^{-1}$ (168 h, 0.15 L)		$12,877.31 \pm 481.23$

* The cost of water for dissolving was obtained from the value of m^3 of water established by the Waterworks Company for the industrial zone in Bogotá D.C., Colombia, July of 2018 [43].

significant relative to pure error, and there was a 20.14 % chance that an F-value this large could occur due to noise.

On the other hand, the Pred R-Squared of 0.9394 was in reasonable agreement with the Adj R-Squared of 0.9654, because difference between them was less than 0.2. Adeq Precision ratio of 21.645 indicated that this cubic model could be used to navigate the design space.

In Figure 6A it was observed OFED Treatment T4 surpassed CCD-2 T9 laccase activity, as well as specific activity reaching at 168 h an enzyme activity of $12,877.3 \pm 481.2 \text{ U L}^{-1}$ and $1,243.83 \pm 24.1 \text{ U mg}^{-1}$ specific activity. Additionally, no change in enzyme activity tendency was observed from 72 h onwards, as was observed for treatment T22 in CCD-1 and CCD-2 for T9, which could be indicating a $(C/N)_0$ ratio of 5.4 ± 0.03 favoured rPOXA 1B production.

When comparing residual reducing sugars in CCD-1, CCD-2 and OFED (Figures 3 and 5 and 6A), it was observed between 12 and 24 h most of the sugars were consumed, with an approximate remnant of 5 g L^{-1} until the end of the culture. These results are different from those reported by Palma et al., (2012), who observed a reduction in glucose's absorption rate when the media had a nitrogen limitation in *S. cerevisiae* [67]. However, it is important to call to mind, *P. pastoris* possesses less hexose transporters and it can use glutamine present in isolated soy protein as a carbon source, which could influence *P. pastoris* glucose absorption. Additionally, it is important to consider glucose USP, malt extract (Supplementary Material 1) and isolated soy protein (0.126 g reducing sugars/ 10 g isolated soy protein, data not shown) have reducing compounds that could interfere with DNS assay used for residual reducing sugar evaluation [38].

As observed in Figure 6B, enzyme activity slightly decreased for isolated soy protein concentrations higher than 50 g L^{-1} , suggesting under assay conditions media optimization had been reached. Henceforth, final media composition and optimal culture conditions were 20 g L^{-1} glucose USP (ChemiPharma), 50 g L^{-1} isolated soy protein (Ciacomeq SAS), 11.74 g L^{-1} malt extract (Proquímicas JG SAS), 4.91 g L^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), 0.161 g L^{-1} CuSO_4 (Merck), 0.1 g L^{-1} chloramphenicol (SIGMA).

4.2.4. Raw material cost analysis

One of the objectives of this study was to design a low-cost culture media. With the produced OFED media laccase activity increased by 30.54 % in comparison with results obtained from CCD-2 and 75.76 % concerning results obtained from 10 L bioreactor, where previously improved media was used [35]. Likewise, culture media cost was reduced (Table 9).

In conclusion, a low cost culture media with a $(C/N)_0$ ratio of 5.4 ± 0.03 was optimized that attained an enzyme activity of $12,877.3 \pm 481.2 \text{ U L}^{-1}$ and $1,324.58 \pm 114.19 \text{ U mg}^{-1}$ specific activity at 168 h of culture, increasing produced laccase activity in CCD-1 and CCD-2 by 63.16 % and 30.54 %, respectively. Furthermore, results demonstrated that, isolated soy protein, malt extract and glucose USP are low cost substrates that increased *P. pastoris* rPOXA 1B activity at Erlenmeyer flask scale 28.55 fold in comparison with clone assay at Erlenmeyer flask scale [15]; 9.58 fold in comparison with previously improved media at Erlenmeyer flask scale [35], and 4.11 fold in comparison with previously improved media evaluated at 10 L bioreactor scale (6L WEV), [35]. Most important, considerable cost reduction was achieved.

Declarations

Author contribution statement

Leidy D. Ardila-Leal: Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Wrote the paper.

María F. Alvarado-Ramírez: Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data.

Ivonne S. Gutiérrez-Rojas, Balkys Quevedo-Hidalgo, Alejandro Pérez-Flórez, Aura M. Pedroza-Rodríguez: Conceived and designed the experiments; Analyzed and interpreted the data.

Raúl A. Poutou-Piñales: Conceived and designed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Wrote the paper.

Funding statement

This work was supported by Grant ID: 00006337 (Optimización del medio de cultivo para producción de la lacasa recombinante POXA 1B de *Pleurotus ostreatus* en *Pichia pastoris*) from Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C. Colombia and Grant ID: 00007885 (Estudio de la estabilidad a tiempo real del concentrado de la lacasa rPOXA 1B de *Pleurotus ostreatus* producida en *Pichia pastoris*) from Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C. Colombia.

Competing interest statement

The authors declare no conflict of interest.

Additional information

Supplementary content related to this article has been published online at <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03852>.

Acknowledgements

Authors thank to María Lucía Gutiérrez, Ph.D. for English editing.

References

- [1] P.J. Strong, H. Claus, Laccase: a review of its past and its future in bioremediation, Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 41 (2011) 373–434.
- [2] M.D. Cannatelli, A.J. Ragauskas, Two decades of laccases, Adv. Sustain. Chem. Indu. 17 (2017) 122–140.
- [3] C.M. Rivera-Hoyos, et al., Fungal laccases, Fung. Biol. Rev. 27 (2013) 67–82.
- [4] F. Wang, et al., Influence of carbon source on the production of extracellular ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*, BioRes 11 (2016) 5676–5686.
- [5] M.C. Colao, S. Lupino, A.M. Garzillo, V. Buonocore, M. Ruzzi, Heterologous expression of lcc1 gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme, Microb. Cell Factories 5 (2006) 1–11.
- [6] L.D. Gómez-Méndez, et al., Biodeterioration of plasma pretreated LDPE sheets by *Pleurotus ostreatus*, PloS One 13 (2018), e0203786.
- [7] E.D. Morales-Alvarez, et al., Partial removal and detoxification of Malachite Green and Crystal Violet from laboratory artificially contaminated water by *Pleurotus ostreatus*, Univ. Sci. 21 (2016) 259–285.
- [8] E.D. Morales-Alvarez, et al., Malachite Green and Crystal Violet decolorization by *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus ostreatus* supernatant and by rGLCC1 and rPOXA 1B concentrates: molecular docking analysis, Appl. Biochem. Biotechnol. 184 (2018) 794–805.
- [9] D.A. Moreno-Bayona, et al., Simultaneous bioconversion of lignocellulosic residues and oxodegradable polyethylene by *Pleurotus ostreatus* for biochar production, enriched with phosphate solubilizing bacteria for agricultural use, PloS One 14 (2019), e0217100.
- [10] A. Piscitelli, C. Pezzella, P. Giardina, V. Faraco, G. Sannia, Heterologous laccase production and its role in industrial applications, Bioeng. Bug. 1 (2010) 252–262.
- [11] C.M. Rivera-Hoyos, et al., Detoxification of pulping black liquor with *Pleurotus ostreatus* or recombinant *Pichia pastoris* followed by CuO/TiO₂/visible photocatalysis, Sci. Rep. 8 (2018) 3503.
- [12] F. Tonin, et al., Comparison of different microbial laccases as tools for industrial uses, N. Biotech. 33 (2016) 387–398.
- [13] C. Nicolini, N.L. Bragazzi, E. Pechkova, D. Bruzzese, M.T. Cambria, Recombinant laccase: I. Enzyme cloning and characterization, J. Cell. Biochem. 114 (2013) 599–605.
- [14] P. Giardina, et al., Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*, Biochem. J. 341 (1999) 655–663.
- [15] C.M. Rivera-Hoyos, et al., Computational analysis and low-scale constitutive expression of laccases synthetic genes *GLCC1* from *Ganoderma lucidum* and *POXA 1B* from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris*, PloS One 10 (2015), e0116524.
- [16] C. Flores, C. Vidal, M. Trejo-Hernández, E. Galindo, L. Serrano-Carreón, Selection of *Trichoderma* strains capable of increasing laccase production by *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus* in dual cultures, J. Appl. Microbiol. 106 (2009) 249–257.
- [17] M. Saloheimo, M.-L. Niku-Paavola, Heterologous production of a ligninolytic enzyme: expression of the *phlebia radiata* laccase gene in *Trichoderma reesei*, Nat. Biotechnol. 9 (1991) 987–990.
- [18] M. Guo, F. Lu, L. Du, J. Pu, D. Bai, Optimization of the expression of a laccase gene from *Trametes versicolor* in *Pichia methanolic*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 71 (2006) 848–852.
- [19] M. Theerachat, et al., Engineering and production of laccase from *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica*, Biore. Technol. 125 (2012) 267–274.
- [20] G. Bleve, et al., Molecular cloning and heterologous expression of a laccase gene from *Pleurotus eryngii* in free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells, Appl. Microbiol. Biotechnol. 79 (2008) 731–741.

- [21] D. Trono, Recombinant enzymes in the food and pharmaceutical industries, in: R.S. Singh, et al. (Eds.), *Advances in Enzyme Technology*, Elsevier, 2019, pp. 349–387.
- [22] L. Gidijala, S. Uthoff, S.J. van Kampen, A. Steinbüchel, R.M.D. Verhaert, Presence of protein production enhancers results in significantly higher methanol-induced protein production in *Pichia pastoris*, *Microb. Cell Factories* 17 (2018) 112.
- [23] V. Juturu, J.C. Wu, Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: latest research progress and applications, *Chembiochem* 19 (2018) 7–21.
- [24] G.P. Cereghino, J. Cereghino, C. Ilgen, J. Cregg, Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (2002) 329–332.
- [25] A.-L. Zhang, et al., Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*, *Mol. Biol. Rep.* 36 (2009) 1611–1619.
- [26] J. Batra, D. Beri, S. Mishra, Response Surface Methodology based optimization of β -glucosidase production from *Pichia pastoris*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172 (2014) 380–393.
- [27] R. Mao, et al., Optimization of expression conditions for a novel N22114-derived antimicrobial peptide-MP1102 under the control of the GAP promoter in *Pichia pastoris* X-33, *BMC Microbiol.* 15 (2015) 57, 57.
- [28] B. Hahn-Hägerdal, et al., Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use, *Microb. Cell Factories* 4 (2005) 31.
- [29] J. Nocon, et al., Model based engineering of *Pichia pastoris* central metabolism enhances recombinant protein production, *Metab. Eng.* 24 (2014) 129–138.
- [30] G. Gómez, C. Batista, Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola, *Cultiv. Trop.* 27 (2006) 17–24.
- [31] C.B. Matthews, A. Kuo, K.R. Love, J.C. Love, Development of a general defined medium for *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Bioeng.* 115 (2018) 103–113.
- [32] J.F. Osma, J.L. Toca-Herrera, S. Rodríguez-Couto, Cost analysis in laccase production, *J. Environ. Manag.* 92 (2011) 2907–2912.
- [33] R. Ravindran, A.K. Jaiswal, Microbial enzyme production using lignocellulosic food industry wastes as feedstock: a review, *Bioengineering* 3 (2016) 1–22.
- [34] J. Zheng, et al., Development of an industrial medium and a novel fed-batch strategy for high-level expression of recombinant b-mannanase by *Pichia pastoris*, *Biores. Technol.* 118 (2012) 257–264.
- [35] L.D. Ardila-Leal, et al., Media improvement for 10 L bioreactor production of rPOXA 1B laccase by *P. pastoris*, *3 Biotech* 9 (2019). Article 447.
- [36] R.A. Poutou, E. Amador, M. Candelario, Banco de células primario (BCP): caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes, *Biotechnol. Apl.* 11 (1994) 55–59.
- [37] C. Pezzella, et al., A step forward in laccase exploitation: recombinant production and evaluation of techno-economic feasibility of the process, *J. Biotechnol.* 259 (2017) 175–181.
- [38] G. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428.
- [39] P.F.F. Amaral, B.D. Ribeiro, Assays of phenoloxidase activity, in: A.B. Vermelho, S. Couri (Eds.), *Methods to Determine Enzymatic Activity*, Bentham eBooks, 2013, pp. 195–207.
- [40] P. Desjardins, J.B. Hansen, M. Allen, Microvolume protein concentration determination using the NanoDrop 2000c spectrophotometer, *JoVE* 33 (2009) 3p.
- [41] E.W. Rice, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 2540 A, 23rd ed, Water Environment Federation, 2017, p. 277.
- [42] Estatuto Tributario Nacional, Art. 468. Tarifa general de impuesto sobre las ventanas, 2017. <http://estatuto.co/?e=645&w=libro-tercero-top>.
- [43] Empresa de Acueducto Alcantarillado y Aseo de Bogotá, Tarifas acueducto. https://http://www.acueducto.com.co/wps/html/resources/2018/tarifas2018/Tarifas_BOGOTA_2018_Revisadas-1.xls. 2018.
- [44] J. Heyland, J. Fu, L. Blank, A. Schmid, Carbon metabolism limits recombinant protein production in *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Bioeng.* 108 (2011) 1942–1953.
- [45] P. Calik, et al., Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: from carbon source metabolism to bioreactor operation parameters, *Biochem. Eng. J.* 95 (2015) 20–36.
- [46] W. Zhang, G. Du, J. Zhou, J. Chen, Regulation of sensing, transportation, and catabolism of nitrogen sources in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 82 (2018) e00040-17.
- [47] A.M. Calderón De la Barca, R.A. Ruiz-Salazar, M.E. Jara-Marini, Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties, *Food Chem. Toxicol.* 65 (2000) 246–253.
- [48] C.M. Lenders, et al., Evaluation of a novel food composition database that includes glutamine and other amino acids derived from gene sequencing data, *Eur. J. Clin. Nutr.* 63 (2009) 1433–1439.
- [49] D.B. Choi, E.Y. Park, Enhanced production of mouse α -amylase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-batch culture of recombinant *Pichia pastoris*, *Process Biochem.* 41 (2006) 390–397.
- [50] A.F. de Almeida, S.M.T. aulk-Tornisielo, E. Cano Carmona, Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated *Candida viswanathii* strain, *Ann. Microbiol.* 63 (2013) 1225–1234.
- [51] J. Pritchett, S.A. Baldwin, The effect of nitrogen source on yield and glycosylation of a human cystatin C mutant expressed in *Pichia pastoris*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31 (2004) 553–558.
- [52] H. Patel, A. Gupte, S. Guote, Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a Basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation, *BioRes* 4 (2009) 268–284.
- [53] X.-W. Yu, X. Lu, L.-S. Zhao, Y. Xu, Impact of NH_4^+ nitrogen source on the production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*, *Process Biochem.* 48 (2013) 1462–1468.
- [54] H.R. Waterham, M.H. Digan, P.J. Koutz, S.V. Lair, J.M. Cregg, Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter, *Gene* 186 (1997) 37–44.
- [55] A. Várnai, et al., Expression of endoglucanases in *Pichia pastoris* under control of the GAP promoter, *Microb. Cell Factories* 13 (2014) 57.
- [56] Ken Peeters, et al., Fructose-1,6-bisphosphate couples glycolytic flux to activation of Ras, *Nat. Commun.* 8 (2017) 922.
- [57] S. Zaman, S.I. Lippman, X. Zhao, J.R. Broach, How *Saccharomyces* responds to nutrients, *Annu. Rev. Genet.* 42 (2008) 27–81.
- [58] D.A. Peña, B. Gasser, J. Zanghellini, M.G. Steiger, D. Mattanovich, Metabolic engineering of *Pichia pastoris*, *Metab. Eng.* 50 (2018) 2–15.
- [59] D. Mattanovich, et al., Open access to sequence: browsing the *Pichia pastoris* genome, *Microb. Cell Factories* 8 (2009). Art 53.
- [60] J.A. Diderich, et al., Glucose uptake kinetics and transcription of *HXT* genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 15350–15359.
- [61] J. Nocon, et al., Increasing pentose phosphate pathway flux enhances recombinant protein production in *Pichia pastoris*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (2016) 5955–5963.
- [62] K. Baumann, et al., A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions, *BMC Syst. Biol.* 4 (2010) 131.
- [63] Z.-y. Zhang, et al., *Pichia pastoris* X33 GT2 release the glycerol repression on AOX1 and efficiently express heterologous proteins, *China Biotechnol.* 37 (2017) 38–45.
- [64] Y. Nie, et al., Impacts of high-galactosidase expression on central metabolism of recombinant *Pichia pastoris* GS115 using glucose as sole carbon source via 13C metabolic flux analysis, *J. Biotechnol.* 187 (2014) 124–134.
- [65] R.N. Vellanki, R. Potumarthi, L.N. Mangamoori, Constitutive expression and optimization of nutrients for streptokinase production by *Pichia pastoris* using statistical methods, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 158 (2009) 25–40.
- [66] V.R.O. Lopes, M.A. Farias, I.M.P. Belo, M.A.Z. Coelho, Nitrogen sources on TPOMV valorization through solid state fermentation performed by *Yarrowia lipolytica*, *Braz. J. Chem. Eng.* 33 (2016) 261–270.
- [67] M. Palma, S.C. Madeira, A. Mendes-Ferreira, I. Sá-Correia, Impact of assimilable nitrogen availability in glucose uptake kinetics in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation, *Microb. Cell Factories* 11 (2012) 99.

Capítulo 5.1. Adición de metanol después del agotamiento de la glucosa:
estimula la producción de rPOXA 1B bajo el control del promotor *pGap* en
P. pastoris X33

Abreviaturas

ABTS:	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
BCP:	Banco de Células Primario
β-gal:	β -galactosidasa
cAMP:	Adenosin monofosfato cíclico <i>Abr. en inglés</i> (Cyclic adenosine monophosphate)
DHA:	Dihidroxiacetona
DHAP:	Dihidroxiacetona-fosfato
GA:	Gliceraldehído
G3P:	Gliceraldehído-3 -fosfato
GRAS:	Reconocido como seguro <i>Abreviatura en inglés</i> (General Recognized as Safe)
hGM-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humanos <i>Abr. en inglés</i> (Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
NAD:	Nicotinamida adenina dinucleótido
<i>pAOX1</i>:	Promotor alcohol oxidasa
<i>pGAP</i>:	Promotor gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
rPOXA 1B:	Enzima recombinante
RABV-G:	Glicoproteína del virus de la rabia.
TC:	Carbono total. <i>Abreviatura por nombre en inglés</i> (Total carbon)
TN:	Nitrógeno total. <i>Abreviatura por nombre en inglés</i> (Total nitrogen)
t_d:	Tiempo de duplicación
VET:	Volumen Efectivo de Trabajo
$\mu(x)$:	Velocidad específica de crecimiento
YPG:	Medio de cultivo de extracto de levadura, peptona y glucosa <i>Abr. en inglés</i> (Yeast extract, peptone y glucosa)
YPG-Z:	Medio de cultivo de extracto de levadura, peptona y glucosa + Zeocina <i>Abr. en inglés</i> (Yeast extract, peptone y glucosa + Zeocin)
Xu5P:	Xilulosa-5-fosfato

5.1.1 Introducción

Durante tres décadas diversos promotores han sido utilizados para expresar proteínas recombinantes en *P. pastoris*; siendo los promotores de la alcohol oxidasa (*pAOX1*) y de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*pGAP*) los más frecuentemente utilizados (Cregg *et al.*, 1985; Vedvick, 1991; Maeda *et al.*, 2000; Córdoba *et al.*, 2003; Córdoba-Ruiz *et al.*, 2009; Fugthong *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2014; Rivera-Hoyos *et al.*, 2015; Pimentel *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019). El metanol regula fuertemente la expresión de proteínas bajo el control del promotor *pAOX1* a través de un sistema de inducción/represión dependiente de la fuente de carbono. El *pAOX1* es reprimido por glucosa y glicerol; sin embargo, la ausencia de estas fuentes de carbono no implica una transcripción significativa de *AOX1* (alcohol oxidasa, E.C. 1.1.3.13), lo que demuestra que el metanol es necesario para inducir los altos niveles de expresión (Cereghino and Cregg, 2000). El cultivo de *P. pastoris* en medios que contienen metanol como fuente de carbono requiere de la biogénesis de peroxisomas para desintoxicar la célula del H₂O₂ generado durante el metabolismo del metanol (van der Klei *et al.*, 1991; Subramani, 1993; van der Klei *et al.*, 2006; Wriessnegger *et al.*, 2007; Poutou-Piñales *et al.*, 2010; Akşit and van der Klei, 2018). El metanol es catabolizado a dihidroxiacetona (DHA) y gliceraldehído fosfato (GAP). DHA sale del peroxisoma y es fosforilado en el citosol para convertirse en dihidroxiacetona-fosfato (DHAP); posteriormente en gliceraldehído-3-fosfato (G3P) para alimentar la vía glucolítica. En general, este es el mecanismo mediante el cual *P. pastoris* procesa el metanol. Además, es como se induce la expresión de proteínas recombinantes controladas por el promotor *pAOX1*, favorecido por la vía de detoxificación del metanol (Tschopp *et al.*, 1987; Poutou-Piñales *et al.*, 2010; Juturu and Wu, 2018).

El promotor constitutivo *pGAP* controla la expresión la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (E.C. 1.2.1.12) dependiente de NAD; enzima que participa en la vía glucolítica y la gluconeogénesis (Waterham *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2009a; Poutou-Piñales *et al.*, 2010; Nelson and Cox, 2017). La fortaleza de *pGAP* depende de la fuente de carbono.

Una investigación realizada por [Waterham et al., \(1997\)](#) demostró la expresión elevada de β -lactamasa (E.C. 3.5.2.6) usando el promotor *pGAP* (*pGAP-bla*) con glucosa en comparación con el promotor *pAOX1* (*pAOX1-bla*) bajo inducción con metanol. [Waterham et al., \(1997\)](#) también determinó que la expresión de *pGAP-bla* fue dependiente de la fuente de carbono: 100 % usando glucosa > 73 % usando glicerol > 45 % usando ácido oleico > 36 % usando metanol ([Waterham et al., 1997](#)); demostrando que el metanol estimula el *pGAP*, aumentando la producción de proteínas recombinantes bajo el control de este promotor. La eficiencia de *pGAP* y *pAOX1* se han estudiado previamente ([Waterham et al., 1997](#); [Zhang et al., 2009a](#); [Azoun and Kallel, 2017](#)) y algunos autores han obtenido resultados contradictorios ([Sears et al., 1998](#); [Boer et al., 2000](#); [Vassileva et al., 2001](#)), sugiriendo que otros factores no controlados pueden interferir con la expresión de la enzima recombinante, tal como la naturaleza de la proteína y las características intrínsecas ([Boettner et al., 2007](#)).

Algunas estrategias satisfactorias se han usado para mejorar la expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor *pAOX1* (fenotipo Mut^s, utilización lenta de metanol) y/o del promotor *pGAP*. Por ejemplo, la integración de varias copias de genes dentro del genoma de *P. pastoris* ([Azoun and Kallel, 2017](#)), medios de cultivos con mezclas de fuentes de carbono, como glucosa/metanol ([Paulová et al., 2012](#)), glicerol/metanol ([Xie et al., 2003](#); [Jungo et al., 2007a](#)) o sorbitol/metanol ([Jungo et al., 2007b](#); [Ramón et al., 2007](#)). Adicionalmente, el uso combinado de *pGAP* y *pAOX1* en la misma cepa ([Wu et al., 2003a](#)), para inducir *pAOX1* después del agotamiento de la glucosa. Una estrategia también utilizada para expresar y recuperar secuencialmente la proteína clonada por separado (extra e intracelular), ([Wu et al., 2003a](#); [Wu et al., 2003b](#); [Cos et al., 2006](#)). Adicionalmente, la co-expresión de chaperonas, la ingeniería de glicosilación y modificación en las vías de secreción han sido implementados como estrategia para maximizar la producción de enzimas recombinantes ([Looser et al., 2015](#); [Peña et al., 2018](#)) y la regulación de los patrones de glicosilación de proteínas farmacéuticas ([Jacobs et al., 2008a](#); [Jacobs et al., 2008b](#)).

El objetivo de este capítulo fue aumentar la producción de rPOXA 1B obtenida en los [Capítulos 4 y 5](#), así como demostrar que después del agotamiento de glucosa o glucosa USP, la adición de metanol incrementa la producción de rPOXA 1B bajo el control de *pGAP*; lo que resultaría en una estrategia factible para la adición secuencial de fuentes de carbono, rompiendo el hábito de usar glucosa para estimular *pGAP* y metanol para inducir *pAOX1*.

5.1.2 Materiales y métodos

5.1.2.1 Condiciones de estudio

Se realizó un estudio completo doble ciego para evitar sesgos positivos o negativos en los resultados obtenidos.

5.1.2.2 Cepa

Se utilizó *P. pastoris* X33 transformadas con el vector integrativo de expresión *pGAPZαA-LaccPost-Stop* (Clon 1) que codifica el gen sintético previamente optimizado de la lacasa *POXA 1B* de *Pleurotus ostreatus*. El clon estaba preservado en medio YPG (1 % (p/v) extracto de levadura, 2 % (p/v) peptona, 2 % (p/v) glucosa) suplementado con 20 % (p/v) glicerol y almacenado a -80 °C (Rivera-Hoyos et al., 2015).

5.1.2.3 Preparación de inóculo

En la preparación del inóculo se usaron viales del Banco de Células Primario (BCP) de *P. pastoris* X33/*pGAPZαA-LaccPost-Stop* (Clon 1), (Poutou et al., 1994). Una vez descongelado, se inocularon 5 ml de medio YPG estéril suplementado con 100 µg ml⁻¹ de zeocina (YPG-Z) y se incubaron a 30 °C durante toda la noche a 180 rpm. Luego se inocularon matraces Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de YPG-Z fresco (volumen de efectivo de trabajo, VET) y se cultivaron durante 12 h en las mismas condiciones.

5.1.2.4 Medio de cultivo y condiciones

Para la producción de la enzima recombinante, se usaron cuatro medios de cultivos (Tabla 5.1.1) que fueron cultivados a escala de Erlenmeyer a 30 °C, 180 rpm, con y sin adición de metanol después del agotamiento de la glucosa. El cultivo A, B y C provienen de diseños estadísticos secuenciales y de procesos mejorados publicados previamente (Capítulos 4), (Ardila-Leal et al., 2019). El medio de cultivo D fue obtenido a partir de un diseño estadístico secuencial para el mejoramiento del medio de cultivo, en el que se sustituyó la fuente de nitrógeno y carbono que corresponde al mejor medio de cultivo obtenido en el CCD-2 (Capítulo 5), (Ardila-Leal et al., 2019), (Tabla 5.1.1). Todos los medios de cultivo fueron ensayados por triplicado con la adición de 0.5 % v/v de metanol (Invitrogen, 1996b, a), cada 24 h, iniciando a las 24 h. Los muestreos se

hicieron a la 0, 12, 24 h y luego cada 24 h hasta las 168 h de cultivo (para los medios A, B, C y D sin metanol) y hasta las 192 h (para los medios A, B, C y D con metanol).

Tabla 5.1.1 Condiciones y descripción de componentes de los cuatro medios de cultivo usados.

Descripción y composición teórica	Medio de cultivo			
	A	B	C	D
Volumen total del Erlenmeyer (ml)	500			
Inoculo con 9.1 ± 0.0005 gL ⁻¹ biomasa (% v/v)	10			
CuSO ₄ (g L ⁻¹)	0.16			
Cloranfenicol (g L ⁻¹)	0.10			
Volumen del medio (ml)	150	300		
Glucosa (g L ⁻¹)	10			--
Glucosa USP (g L ⁻¹)	--	--	--	20
Peptona (g L ⁻¹)	20	10	20	--
Proteína aislada de soya 90 % (g L ⁻¹)	--	--	--	40
Extracto de levadura (g L ⁻¹)	10	10	15	--
Extracto de malta (g L ⁻¹)	--	--	--	11.74
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g L ⁻¹)	2.64	0.66	2.64	4.91
Relación (C/N)₀	3.4 ± 0.04	4.4 ± 0.03	3.5 ± 0.03	6.7 ± 0.02
Referencias	(Ardila-Leal et al., 2019)			(Ardila-Leal et al., 2020)

Relación (C/N)₀: es la relación carbono/nitrógeno (antes de realizar la inoculación)

Las muestras tomadas a las diferentes horas fueron centrifugadas a $5,867 \times g$, 17 ± 2 °C durante 15 min y luego utilizadas para determinar (por triplicado) la concentración de glucosa o azúcares reductores residuales (g L⁻¹), [\(Miller, 1959\)](#), la actividad enzimática (U L⁻¹), [\(Tinoco et al., 2001; Pezzella et al., 2017; Ardila-Leal et al., 2019\)](#), la concentración de proteínas extracelulares (mg mL⁻¹), [\(Desjardins et al., 2009\)](#), la actividad específica (U mg⁻¹) y la relación C/N [\(Rice, 2017\)](#). Todas las muestras fueron recolectadas antes de la adición de metanol en cada muestreo.

5.1.2.5 Técnicas analíticas

5.1.2.5.1 Determinación de biomasa seca ($g L^{-1}$)

La concentración de biomasa seca fue calculada para los medios A, B, C y D con metanol usando una curva de calibración (Landázuri *et al.*, 2009), (Ecuación 5.1.1).

$$X = 1.1726 \times OD_{\lambda 600nm} \quad R^2 = 0.9870 \text{ [Ecuación 5.1.1]}$$

Donde: $X = g L^{-1}$ biomasa seca, $OD_{\lambda 600nm}$ = densidad óptica a 600 nm. Posteriormente, para obtener $\mu_{(x)}$ (h^{-1}) y t_d (h), X ($g L^{-1}$) fue transformado en $\ln (x/x_0)$ (Doran, 2013).

5.1.2.5.2 Cuantificación de la proteína extracelular ($mg mL$)

La proteína extracelular total para cada muestra fue cuantificada por determinación directa mediante absorción UV (280 nm) usando un NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), (Desjardins *et al.*, 2009).

5.1.2.5.3 Determinación de la actividad Lacasa ($U L^{-1}$; $U mg^{-1}$) y productividad

Para determinar la actividad enzimática se usó el tampón acetato de sodio 0.6 M en los medios A, B y C para los medios con o sin metanol y el tampón ácido cítrico 0.1 M para el medio D con o sin metanol.

En el primer ensayo, la actividad lacasa fue monitoreada en tampón acetato de sodio 0.6 M (pH 4.5 ± 0.2) siguiendo el cambio en la absorbancia a 436 nm ($\epsilon_{436} = 29.300 M^{-1} cm^{-1}$) debido a la oxidación del ABTS [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)]. 800 μL de muestra fueron adicionados a 100 μL de tampón acetato de sodio 600 mM y 100 μL de ABTS (5 mM) a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ C$). La formación del radical verde fue evaluada mediante espectrofotometría por 3 minutos. La solución blanco estaba compuesta por 800 μL de agua destilada, 100 μL de tampón acetato de sodio 0.6 M y 100 μL de ABTS 5 mM (Tinoco *et al.*, 2001), (Ecuación 5.1.2).

En el segundo ensayo, la actividad lacasa ($U L^{-1}$) fue monitoreada por el cambio en la absorbancia a 420 nm ($\epsilon_{420}=36.000 M^{-1} cm^{-1}$) debido a la oxidación del ABTS en tampón citrato 0.1 M (pH 3.0 ± 0.2). 2 μL de muestra fueron adicionados a 898 μL de tampón citrato 0.1 M y 100 μL de ABTS 20 mM a temperatura ambiente (25 °C). La formación del radical verde fue evaluada mediante espectrofotometría por 1 minuto. La solución blanca tenía 2 μL de agua destilada, 898 μL de tampón citrato 0.1 M y 100 μL de ABTS 20 mM (Pezzella et al., 2017; Ardila-Leal et al., 2019), (Capítulo 3), (Ecuación 5.1.2).

$$U mL^{-1} = \frac{(\Delta E \times V_t)}{(\epsilon \times d \times V_s)} \quad [\text{Ecuación. 5.1.2}]$$

Donde: ΔE corresponde a la diferencia entre la absorbancia final e inicial después de 1 minuto de reacción, V_t refiere al volumen total de la reacción (ml), ϵ es el coeficiente de extinción molar del ABTS ($M^{-1} cm^{-1}$), d es la longitud de la cubeta (cm) y V_s es el volumen de la muestra (ml) contenida en la reacción.

En ambos métodos de medición, una unidad de actividad lacasa es la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μmol de ABTS en 1 minuto.

La actividad específica fue calculada como el cociente entre la actividad enzimática y la concentración total de proteína extracelular (Ecuación 5.1.3).

$$Spec. Act. = \frac{Enz. Act.}{Prot. Conc.} \quad [\text{Eq. 5.1.3}]$$

Donde: *Enz. Act.* es la actividad enzimática expresada como UL^{-1} y *Prot. Conc.* es la concentración total de proteína extracelular expresada como $mg mL^{-1}$.

La productividad como una función de la actividad biológica de la enzima fue expresada en $UL^{-1} h^{-1}$ y calculada con la Ecuación 5.1.4:

$$P_{Enz.} = \frac{Enz.Act.}{Time} \quad [Ecuación. 5.1.4]$$

5.1.2.5.4 Cuantificación de azúcares reductores residuales ($g L^{-1}$)

Se determinó la concentración de azúcares reductores totales residuales (glucosa o glucosa USP) para cada una de las muestras por triplicado. Para esto se utilizó la técnica del ácido 3,5 dinitrosalicílico (Miller, 1959). Para esta determinación se preparó una curva de patrón que osciló entre 0.1 y 2 $g L^{-1}$ de D-glucosa de acuerdo con la Ecuación 5.1.5.

$$y = 0.6181x - 0.048; \quad R^2 = 0.9984 \quad [Ecuación 5.1.5]$$

5.1.2.5.5. Determinación de carbono total (TC, $g L^{-1}$), nitrógeno total (TN, $g L^{-1}$) y la relación Carbono/Nitrógeno (C/N)

La concentración de TC y TN fueron obtenidas usando un analizador TOC (Total organic carbon analyzer, Shimadzu TOC-L), este equipo desarrolla un método único de oxidación catalítica de combustión y NDIR, de acuerdo con el Método Estándar 5310B (Rice, 2017). Se preparó una solución estándar ($0.1 gL^{-1}$) de cada uno de los componentes del medio (por separado) y fueron analizadas en el equipo TOC. Una vez conocidas las concentraciones de TC y TN se realizaron cálculos estequiométricos para determinar la concentración en cada medio de cultivo ($g L^{-1}$) y la relación carbono nitrógeno (C/N). La relación C/N del comportamiento cinético (después de la inoculación de la cepa) fue medida directamente después de la remoción de biomasa por centrifugación, siguiendo las condiciones mencionadas previamente.

5.1.3 Resultados

En este estudio diferentes medios de cultivo obtenidos de procesos estadísticos para el mejoramiento, optimización y/o reducción de costos fueron usados ([Ardila-Leal et al., 2019](#); [Ardila-Leal et al., 2020](#)) para evaluar la producción de la lacasa POXA 1B de *P. ostreatus* expresada en *P. pastoris* bajo el control del promotor constitutivo pGAP usando glucosa como la fuente de carbón primario, seguido por la adición de metanol (medios de cultivos requeridos) después del agotamiento de la glucosa en el medio.

El comportamiento de la cinética de crecimiento de *P. pastoris* X33/pGAPZ α A-LaccPost-Stop (Clon 1) en diferentes medios de cultivo con y sin metanol después del agotamiento de la fuente de carbono se observa en la [Figura 5.1.1 A, B, C y D](#). Es posible observar algunos cambios en el comportamiento cinético cuando el metanol fue añadido a las 24 h de cultivo.

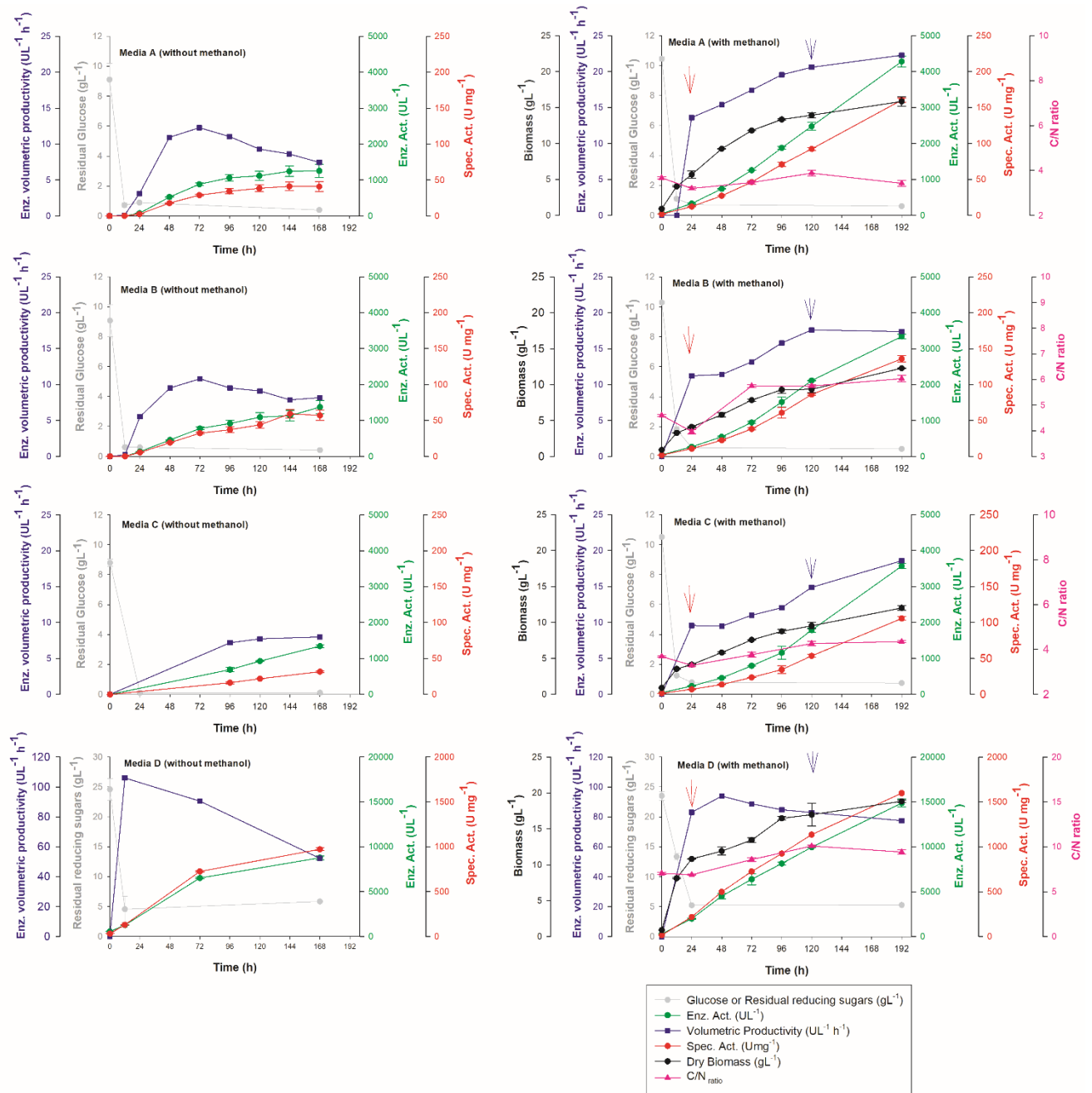


Figura 5.1.1 Cinética de crecimiento *P. pastoris* X33/pGAPZ α A-LaccPost-Stop (Clon 1) en diferentes medios (A, B, C y D) con o sin la adición de metanol después del agotamiento de la glucosa (medios A, B y C) o azúcares reductores residuales (medio D). Las flechas rojas en los medios con metanol indican el tiempo inicial de la adición de metanol y las flechas azules indica el tiempo final de la adición de metanol.

5.1.3.1 Medio de cultivo sin metanol

En los medios de cultivos sin metanol (A, B, C y D), la concentración de glucosa o glucosa USP se agotó aproximadamente a las 12 o 24 h de cultivo (Figura 5.1.1), sugiriendo que 24 h era el tiempo adecuado para el inicio de la adición de metanol (Poutou-Piñales et al., 2010).

Los medios de cultivo A, B y C tenían concentraciones similares de glucosa y se diferenciaban en las concentraciones de extracto de levadura, peptona y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Tabla 5.1.1). La Tabla 5.1.2 y la Figura 5.1.1 muestran las actividades volumétricas y las actividades específicas para los medios A, B y C a las 168 h de cultivo.

Table 5.1.2 Actividad volumétrica (U L^{-1}) y específica (U mg^{-1}) a 168 y 192 h de cultivo en los diferentes medios de cultivo sin metanol o suplementado con metanol, respectivamente.

Medio de cultivo	Actividad volumétrica		Actividad específica	
	$\text{U L}^{-1} \pm \text{SD (168 h)}$	$\text{U L}^{-1} \pm \text{SD (192 h)}$	$\text{U mg}^{-1} \pm \text{SD (168 h)}$	$\text{U mg}^{-1} \pm \text{SD (192 h)}$
A	$1,254.30 \pm 182.44$		40.87 ± 7.15	
B	$1,373.70 \pm 182.44$		57.05 ± 7.15	
C	$1,343.50 \pm 40.30$		31.64 ± 1.22	
D	$8,771.61 \pm 218.79$		971.92 ± 15.21	
A con metanol		$4,280.43 \pm 148.82$		160.38 ± 2.90
B con metanol		$3,339.02 \pm 64.36$		135.95 ± 4.30
C con metanol		$3,569.39 \pm 68.38$		105.56 ± 2.66
D con metanol		$14,868.06 \pm 461.58$		1597.6 ± 76.28

Para el medio A y B la productividad volumétrica máxima fue obtenida a las 72 h de cultivo (12.28 y $10.81 \text{ UL}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y disminuyó a 7.47 y $8.18 \text{ UL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a las 168 h, respectivamente (Figura 5.1.1). Para el medio de cultivo C las muestras no fueron colectadas a las 72 h; sin embargo, la productividad a las 168 h fue $8.0 \text{ UL}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

El medio D obtuvo la actividad enzimática volumétrica y la actividad específica más alta a las 168 h de cultivo, en comparación con los medios A, B y C. Así mismo, obtuvo la

productividad volumétrica más alta ($105.97 \text{ UL}^{-1}\text{h}^{-1}$) a las 12 h de cultivo, disminuyendo a $52.21 \text{ UL}^{-1}\text{h}^{-1}$ a las 168 h de cultivo (Figura 5.1.1).

5.1.3.2 Medios de cultivo con metanol

El agotamiento de la concentración de glucosa o de glucosa USP mostró una tendencia similar (aproximadamente 12 h de cultivo) para todos los medios de cultivo (A, B, C y D con metanol). Por lo tanto, se confirma la decisión de iniciar la adición del metanol a partir de las 24 h.

En los medios de cultivo con metanol la relación C/N se incrementó levemente al inicio del cultivo (0 h), como resultado del efecto de la inoculación (Tabla 5.1.1, Figura 5.1.1 A, B, C y D). Para el medio A el incremento fue de 3.4 ± 0.04 a 3.7 ± 0.5 ; el medio B de 4.4 ± 0.03 a 4.6 ± 0.39 ; el medio C de 3.5 ± 0.003 a 3.7 ± 0.3 y el medio D de 6.7 ± 0.02 a 7.1 ± 1.2 . Posteriormente, se observó que la relación (C/N) disminuyó entre 0 a 24 h, pero se incrementó levemente desde las 24 a 120 h (adición final de metanol). Finalmente, disminuyó a las 192 h, finalizando en 3.43 ± 0.3 ; 6.03 ± 0.13 ; 4.35 ± 0.41 y 9.42 ± 0.27 , para los medios A, B, C y D, respectivamente (Figura 5.1.1 A, B, C y D).

Para los medios A, B, C y D con metanol a las 192 h de cultivo la actividad enzimática volumétrica se incrementó (Tabla 5.1.2); lo que significó un incremento aproximado de 3.4; 2.4; 2.7 y 1.7 veces comparado con el medio sin metanol. La actividad específica también se incrementó (Tabla 5.1.2), obteniendo un incremento aproximado de 3.9; 2.4; 3.3 y 1.6 veces (Figura 5.1.1) comparado con el mismo medio sin metanol.

El comportamiento de la productividad volumétrica dependió del medio de cultivo. Durante el período de adición de metanol (entre 24 y 120 h) para los medios A y C su valor aumentó, alcanzando en la 192 h $22.29 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $18.59 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Por el contrario, para el medio B se observó un valor máximo a las 120 h de $17,61 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y a las 192 h se detectó un descenso despreciable y finalizó en $17,39 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. En el medio D se observó la mayor productividad volumétrica a las 48 h con $94.0 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y

se observó una disminución gradual hasta alcanzar $77.4 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a las 192 h (Figura 5.1.1 A, B y C).

El crecimiento de biomasa en los medios de cultivo A, B, C y D con metanol aumentó dependiendo del consumo de glucosa o glucosa USP hasta las 24 h. Se observó un cambio en la pendiente de crecimiento después del agotamiento de la glucosa (como se esperaba), que se extendió de las 24 a las 192 h, incluido el período de suplementación con metanol (Figura 5.1.1 A, B, C y D). La tasa específica de crecimiento ($\mu_x \text{ h}^{-1}$) y el tiempo de duplicación (t_d h) fueron similares en los diferentes medios de cultivo evaluados con metanol. Por otro lado, la biomasa máxima expresada en g L^{-1} (Tabla 5.1.3), (al final del cultivo) osciló entre 12 y 18 g L^{-1} .

Tabla 5.1.3. Pendiente de crecimiento de la biomasa producida durante la adición de metanol y parámetros cinéticos después del agotamiento de la glucosa, durante la adición de metanol.

Medio de cultivo (con metanol)	$\mu_x \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$t_d \text{ (h)}$	Biomasa ($\text{g L}^{-1} \pm \text{SD}$)
			192 h
A	0.003	208	15.85 ± 0.68
B	0.004	155	12.28 ± 0.06
C	0.005	148	12.22 ± 0.33
D	0.003	225	18.84 ± 0.16

5.1.4 Discusión

En este estudio, se realizaron ensayos para demostrar el efecto positivo de la suplementación con metanol después del agotamiento de la glucosa, en un cultivo de *P. pastoris* que produce la lacasa rPOXA 1B bajo el control del promotor *pGap*, usando un medio de cultivo previamente mejorados por diseños estadísticos (Ardila-Leal et al., 2019; Ardila-Leal et al., 2020). El uso de medios de cultivo optimizados o mejorados son más eficiente que el proceso tradicional de optimización siguiendo un diseño experimental One Factor at Time como sugiere en algunas investigaciones (Burgard et al., 2017). La selección de medios de cultivo ricos en nutrientes en lugar de mínimos, responde al hecho de que se ha comprobado que los medios mínimos, en general, tienen una composición desequilibrada, favorecen la precipitación de sal, tienen una fuerza iónica alta, tienen insuficiente aporte de nutrientes, promueven la precipitación de compuestos de fósforo, genera estrés osmótico que puede generar la inducción de la proteína desplegada y favorecer la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) entre otras como ha resumido Burgard et al. (2017).

Por otra parte, la especificidad de la lacasa por el sustrato varía con el pH, entre otros factores (Capítulo 3). Por lo tanto, para analizar la actividad de diferentes tipos de lacasa, se han utilizado varios tampones (Tinoco et al., 2001; Pezzella et al., 2017) y sustratos (Rivera-Hoyos et al., 2013). La hipótesis ensayada fue que después del agotamiento de la glucosa, la adición de metanol sería el factor principal que incrementa la actividad enzimática, independientemente de la influencia del tampón en la detección volumétrica de la actividad enzimática y la afinidad de la enzima por el sustrato. Por lo tanto, para el medio de cultivo D se ensayó la actividad enzimática en tampón citrato.

5.1.4.1 Medios de cultivo sin metanol

P. pastoris es una levadura metalotrófica que cuando crece en glucosa, glicerol o etanol promueve la degradación activa del peroxisoma a través del proceso de autofagia (mediado por proteólisis), lo que genera la represión de la expresión de genes de la vía

Mut como AOX (Holzer, 1976; Veenhuis *et al.*, 1978; Yuan *et al.*, 1997; Guan *et al.*, 2001; Poutou-Piñales *et al.*, 2010).

Se usó glucosa como fuente primaria de carbono debido a que rPOXA 1B está bajo el control de *pGap* (Rivera-Hoyos *et al.*, 2015) y considerando que generalmente, la levadura tiene una preferencia alta sobre la glucosa como sustrato, haciendo que la señal de transporte de glucosa se encamine muy rápidamente hacia la maquinaria de biosíntesis y regulación celular, generando la represión de los genes implicados en la gluconeogénesis, respiración, transporte, ciclo de glioxilato y metabolismo alternativo de otros sustratos carbonados (Stasyk *et al.*, 2018).

En general, cuando *P. pastoris* crece en glucosa, el nivel intracelular de AMPc es bajo, porque la glucosa inhibe la actividad de la Adenil ciclasa (E.C.4.6.1.1). Cuando se agota la glucosa, la concentración de AMPc aumenta rápidamente y forma un complejo con la "proteína receptora de AMPc", complejo que puede actuar sobre el *pAOX1*, induciendo el uso de otras fuentes de carbono (Demain and Davies, 1996; Poutou *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos con los medios A, B y C (con glucosa, sin metanol) a las 168 h de cultivo, sugieren que una relación (C/N)₀ ligeramente superior y una superficie menor para la transferencia de oxígeno (relación de 3/5 volumen del medio/volumen de matraz agitado), (Tabla 5.1) favoreció discretamente la actividad enzimática en el medio de cultivo B ($1,373.70 \pm 182.44$ U L⁻¹), presentando un aumento de 1.095 veces en comparación con el cultivo A y un aumento de 1.022 veces en comparación con el cultivo C.

Se observó un aumento similar en la productividad volumétrica para los cultivos A, B, C y D (sin metanol), (Figura 5.1) como resultado de actividades enzimáticas volumétricas comparables, realizando las mediciones en los mismos tiempos de recolección.

El medio de cultivo D (sin metanol) tenía las siguientes modificaciones en comparación con otros medios: la glucosa se sustituyó por glucosa USP a una concentración dos veces mayor (en comparación con los medios A, B y C, sin metanol). Además, la peptona y el extracto de levadura fueron sustituidos por proteína aislada de soja (Ardila-Leal et al., 2020), dando como resultado una relación(C/N)₀ del medio de 6.7 ± 0.02 (Tabla 5.1). Esta modificación representó un incremento de 7,0, 6,4 y 6,5 veces en la actividad enzimática volumétrica en comparación con los cultivos A, B y C, respectivamente (actividad enzimática volumétrica del medio D, fue $8,771.61 \pm 218.79 \text{ UL}^{-1}$). Estos datos sugieren que la actividad lacasa fue favorecida por una relación C/N más alta en comparación con los medios A, B y C. Un fenómeno similar ha sido observado en lacasas nativas, cuando el hongo nativo coloniza la madera genera mayor cantidad de lacasas como resultado del incremento en la relación C/N (Pedroza-Rodríguez and Rodríguez-Vázquez, 2013). Por lo tanto, para este estudio, un aumento en la relación C/N mimetiza la "relación C/N del entorno propio" presente en la naturaleza.

5.1.4.2 Medios de cultivo con metanol

Cuando *P. pastoris* se cultiva en metanol, se produce la biogénesis de peroxisomas para detoxificar el metanol, como se mencionó anteriormente; sin embargo, los peroxisomas también están involucrados en la asimilación de fuentes de nitrógeno (fundamentalmente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pero en la investigación, el aislado de proteína de soja y el extracto de malta se incluyen en un medio de cultivo como fuentes de nitrógeno orgánico), (Tabla 5.1.1) mediante el uso de amina oxidasas (Zwart et al., 1983; Siverio, 2002; Shiraishi et al., 2015). En este sentido, otras investigaciones demostrado que la regulación positiva de los genes asociados al nitrógeno es más fuerte en presencia de metanol (Burgard et al., 2017); debido a que las concentraciones de las fuentes de nitrógeno son mayores, se podría explicar porque el medio D con metanol aumenta la actividad enzimática más que los otros medios de cultivo ensayados (Tabla 5.1.1).

Los medios de cultivo A, B y C sin metanol tuvieron resultados de actividad enzimática muy similares entre ellos a las 168 h de cultivo y cuando se evaluó los mismos medios con metanol, la tendencia de aumento fue similar (Tabla 5.1.2). El medio D con y sin

metanol tuvo un comportamiento muy similar entre 0 y 72 horas con relación a la actividad enzimática, pero a las 72 h el incremento de la actividad enzimática en el medio D con metanol fue considerablemente mayor (Figura 5.1.1). Al comparar la tendencia de la actividad enzimática ($U L^{-1}$) entre los medios con y sin metanol a las 168 horas (Figura 5.1.1), se puede observar que la actividad enzimática fue mucho mayor en los cultivos con metanol.

La adición de metanol cada 24 h resultó en un mejoramiento importante de la actividad enzimática para todos los cultivos (A, B, C y D), con rangos de incrementos de 1.7 a 3.4 veces comparados con los medios de cultivo sin metanol (Figura 5.1). Por otra parte, un incremento leve de la relación C/N durante la adición de metanol fue soportado por el incremento en la concentración de metanol, coincidiendo con los cambios observados después del agotamiento de la glucosa (Figura 5.1.1 A, B, C y D con metanol).

La producción de biomasa fue duplicada al final del cultivo (A, B, C y D con metanol), dependiendo de la composición del medio de cultivo (Tabla 5.1.3). En contraste, dependiendo de la composición del medio de cultivo, la actividad enzimática volumétrica (UL^{-1}) se incrementó durante la adición de metanol, oscilando entre $3,339.02 \pm 64.36$ and $14,868.06 \pm 461.58 UL^{-1}$ a las 192 h, lo que sugiere que la adición de metanol fue menos crítica para el crecimiento celular (Tabla 5.1.3), como se ha investigado previamente (Azoun and Kallel, 2017). Sin embargo, la principal importancia radica en el hecho de que el metabolismo del metanol genera formaldehído, que se transfiere a xilulosa-5-fosfato (Xu5P); generando G3P y DHA. Xu5P se regenera en el ciclo Xu5P (ubicado en los peroxisomas) que involucra reacciones de la vía de las pentosas fosfato (Peña et al., 2018). En resumen, el suministro de metanol estimula la biogénesis de peroxisomas, la vía Mut, el ciclo Xu5P y las vías glicolítica y pentosa fosfato (Poutou-Piñales et al., 2010; Peña et al., 2018), estimulando el *pGAP* nativo y el putativo, importantes para la producción de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD y la rPOXA 1B respectivamente.

El uso combinado de los promotores *pGAP* y *pAOX1* en *P. pastoris* ha sido reportado anteriormente (Wu et al., 2003a; Zhang et al., 2009b). Por ejemplo, el gen del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos humanos (hGM-CSF) fue insertados en los vectores *pPIC9 K* y *pGAPZA*. Ambos vectores fueron transformados en la cepa hospedero GS115 para producir constitutivamente hGM-CSF bajo el promotor *pGAP* e inducir la producción de hGM-CSF mediante la adición de metanol después del agotamiento de la glucosa (Wu et al., 2003a).

Otros autores han estudiado la expresión secuencial de proteínas recombinantes y su recuperación separada (intra o extracelular) de un cultivo de *Pichia pastoris* (Wu et al., 2003b). En el estudio mencionado anteriormente, la β -galactosidasa (β -gal) se expresó constitutiva e intracelularmente bajo el control del promotor *pGAP* y se secretó hGM-CSF por inducción de *pAOX1* con metanol después de que el medio con glucosa (extracto de levadura, peptona, dextrosa) fuera reemplazado por medio con metanol (extracto de levadura, peptona, metanol), respectivamente (Wu et al., 2003b). En la investigación, cuando se agotó la glucosa no fue necesario reemplazar el medio para inducir el *pAOX* nativo y estimular el *pGAP* nativo y el *pGAP* putativo, por lo que la adición de metanol se hizo inmediatamente al medio con trazas de glucosa.

Azoun and Kallel (2017) estudiaron mediante un enfoque transcriptómico en *P. pastoris* el efecto que tendría una fuente de carbono en la producción de glicoproteína del virus de la rabia (RABV-G). Sus resultados demostraron que los niveles de transcripción de genes involucrados en el metabolismo central se regularon positivamente cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono (*pGAP*-RABV-G), mientras que los niveles de transcripción de genes antioxidantes fueron más bajos. Cuando se utilizó metanol (*pAOX1*-RABV-G), el metabolismo se redirigió hacia una ruta diferente mediante la regulación positiva del formaldehído deshidrogenasa (E.C. 1.2.1.1) y la regulación negativa de las enzimas implicadas en el metabolismo central. Estas observaciones apoyaron el uso de glucosa en *P. pastoris* para mejorar la expresión de RABV-G (Azoun

and Kallel, 2017). Sus resultados coinciden con el mismo efecto de la glucosa en nuestro trabajo.

Burgard et al., (2017) evaluaron la expresión de procarboxipeptidasa B porcina (CPB) bajo el control de pGap en *P. pastoris*. En su trabajo, las pruebas de pulso de metanol después de la depleción de glicerol mostraron una fuerte inducción de la regulación genética (regulación significativa hacia arriba y hacia abajo) 1 h después de comenzar la alimentación de metanol (Burgard et al., 2017); que se correlacionó con la reestructuración del metabolismo hacia el uso de metanol, encontrando que la regulación de los genes peroxisomales fue positiva durante la adición de metanol; lo que concuerda con nuestros hallazgos pero usando glucosa en lugar de glicerol.

5.1.5 Conclusión

Fue posible estimular la producción de proteína recombinante bajo el control del promotor *pGAP* añadiendo metanol después del agotamiento de la glucosa; alcanzando $14,868.06 \pm 461.58 \text{ U L}^{-1}$, lo que superó los resultados obtenidos en los [Capítulos 4 y 5](#). La propuesta de usar metanol podría ser una estrategia interesante, con resultados teóricos y bioquímicos esperados, que ya habían sido ensayados previamente usando glicerol en lugar de glucosa como fuente primaria de carbono en la expresión del gen CPB, bajo el control de *pGap*. Sin embargo, es importante señalar que la adición de metanol no es una opción amigable con el medio ambiente, ya que la enzima se usa impura (como propuesta ambiental), lo que podría generar efectos negativos por la presencia de trazas de metanol, aun así, la estrategia podría ser útil si la producción de la enzima pura es necesaria para usos no ambientales, o si la producción de enzimas se lleva a cabo a pequeña escala con fines de investigación. Además, nuestra propuesta rompe el hábito de utilizar estrictamente glucosa (o glicerol) para la expresión de proteínas recombinantes bajo el control del pGap, como es lo más frecuente.

5.1.6 Referencias

- Ahmad, M., M. Hirz, H. Pichler and H. Schwab, (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98: 5301-5317. <http://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>
- Aksit, A. and I.J. van der Klei, (2018). Yeast peroxisomes: How are they formed and how do they grow? **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 105: 24-34. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.09.019>
- Ardila-Leal, L.D., D.A. Albarracín-Pardo, C.M. Rivera-Hoyos, E.D. Morales, R.A. Poutou-Piñales, *et al.*, (2019). Media improvement for 10 L bioreactor production of rPOXA 1B laccase by *P. pastoris*. **3Biotech**, 9 (12): Article 447. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-019-1979-y>
- Ardila-Leal, L.D., M.F. Alvarado-Ramírez, I.S. Gutierrez-Rojas, R.A. Poutou-Piñales, B.E. Quevedo-Hidalgo, *et al.*, (2020). Low-cost media statistical design for production of rPOXA 1B laccase in *P. pastoris*. **Heliyon**, 6 (4): e03852. <http://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03852>
- Azoun, S.B. and H. Kallel, (2017). Investigating the effect of carbon source on rabies virus glycoprotein production in *Pichia pastoris* by a transcriptomic approach. **Microbiology Open**, 6: e489. <http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.489>
- Boer, H., T.T. Teeri and A. Koivula, (2000). Characterization of *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase Cel7A Secreted from *Pichia pastoris* Using Two Different Promoters. **Biotechnology and Bioengineering**, 69 (5): 486-494.
- Boettner, M., C. Steffens, C. von Mering, P. Bork, U. Stahl, *et al.*, (2007). Sequence-based factors influencing the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris*—A comparative view on 79 human genes. **Journal of Biotechnology**, 130: 1-10.
- Burgard, J., M. Valli, A.B. Graf, B. Gasser and D. Mattanovich, (2017). Biomarkers allow detection of nutrient limitations and respective supplementation for elimination in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. **Microbial Cell Factories**, 16: 117. <http://doi.org/10.1186/s12934-017-0730-9>
- Cereghino, J.L. and J.M. Cregg, (2000). Heterologous Protein Expression in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, 24: 45-66. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>
- Córdoba, H., N. Algecira, R.A. Poutou and L.A. Barrera, (2003). *Pichia pastoris* una Alternativa para la Producción de Glicoproteínas Humanas de Uso Terapéutico. Estrategias de Fermentación. **Revista Colombiana de Biotecnología**, 5 (2): 73-84.
- Córdoba-Ruiz, H.A., R.A. Poutou-Piñales, O.Y. Echeverri-Peña, N.A. Algecira-Enciso, P. Landázuri, *et al.*, (2009). Laboratory scale production of the human recombinant iduronate 2-sulfate sulfatase-Like from *Pichia pastoris*. **African Journal of Biotechnology**, 8 (9): 1786-1792.
- Cos, C., R. Ramón, J.L. Montesinos and F. Valero, (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. **Microbial Cell Factories**, 5: 17p. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-5-17>

- Cregg, J.M., K.J. Barringer, A.Y. Hessler and K.R. Madden, (1985). *Pichia pastoris* as a Host System for Transformations. **Molecular Cell Biology**, 5 (12): 3376-3385.
- Demain, A.L. and J.E. Davies, (1996) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2nd ed. American Society of Microbiology Press, Washington, D.C. USA.
- Desjardins, P., J.B. Hansen and M. Allen, (2009). Microvolume protein concentration determination using the NanoDrop 2000c spectrophotometer. **Journal of Visualized Experiments**, 33: 3p. <http://doi.org/10.3791/1610>
- Doran, P.M., (2013) Bioprocess Engineering Principles. Elsevier Ltd.
- Fugthong, A., K. Boonyapakron, W. Sornlek, S. Tanapongpipat, L. Eurwilaichitr, *et al.*, (2010). Biochemical characterization and in vitro digestibility assay of *Eupenicillium parvum* (BCC17694) phytase expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, 70: 60-67.
- Guan, J., P.E. Stromhaug, M.D. George, P. Habibzadegah, A. Bevan, *et al.*, (2001). Cvt18/Gsa12 Is Required for Cytoplasm-to-Vacuole Transport, Pexophagy, and Autophagy in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. **Molecular Biology of the Cell**, 12: 3821-3838.
- Holzer, H., (1976). Catabolite Inactivation in Yeast. **Trends in Biochemistry Science**, 1: 176-181.
- Invitrogen, (1996a) Multi-Copy Pichia Expression Kit. For the Isolation and Expression of Recombinant Proteins from *Pichia pastoris* Strains Containing Multiple Copies of a Particular Gene. Invitrogen, California, USA.
- Invitrogen, (1996b) Pichia Expression Kit. Protein Expression. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *P. pastoris*. Cat. No. K1710-01. Invitrogene, California, USA.
- Jacobs, P.P., S. Geysens, W. Vervecken, R. Contreras and N. Callewaert, (2008a). Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. **Nature Protocols**, 4 (1): 58-70. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.213>
- Jacobs, P.P., S. Ryckaert, S. Geysens, K.D. Vusser, N. Callewaert, *et al.*, (2008b). Pichia surface display: display of proteins on the surface of glycoengineered *Pichia pastoris* strains. **Biotechnology Letters**, 30 (12): 2173-2181. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-008-9807-1>
- Jungo, C., I. Marison and U. von Stockar, (2007a). Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: A quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures. **Journal of Biotechnology**, 128: 824-837.
- Jungo, C., J. Schenk, M. Pasquier, I.W. Marison and U. von Stockar, (2007b). A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, 131: 57-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.05.019>
- Juturu, V. and J.C. Wu, (2018). Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. **ChemBiochem**, 19: 7-21. <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201700460>

- Landázuri, P., R.A. Poutou-Piñales, J. Acero-Godoy, H.A. Córdoba-Ruiz, O.Y. Echeverri-Peña, *et al.*, (2009). Cloning and shake flask expression of hrIDS-Like in *Pichia pastoris*. **African Journal of Biotechnology**, 8 (12): 2871-2877.
- Liu, W.-C., S. Inwood, T. Gong, A. Sharma, L.-Y. Yu, *et al.*, (2019). Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production. **Critical Reviews in Biotechnology**, 39 (2): 258-271. <http://doi.org/10.1080/07388551.2018.1554620>
- Looser, V., B. Bruhlmann, F. Bumbak, C. Stenger, M. Costa, *et al.*, (2015). Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. **Biotechnology Advances**, 33 (6): 1177-1193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.008>
- Maeda, Y., R. Kuroki, H. Suzuki and H. Reilander, (2000). High-Level Secretion of Biologically Active Recombinant Human Macrophage Inflammatory Protein-1a by the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, 18 (1): 56-63.
- Miller, G., (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31 (3): 426-428. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Nelson, D.L. and M.M. Cox, (2017) Lehninger, principles of biochemistry, 7th ed. W.H. Freeman and Company, Macmillan Higher Education, New York, USA.
- Paulová, L., P. Hyka, B. Branská, K. Melzoch and K. Kovar, (2012). Use of a mixture of glucose and methanol as substrates for the production of recombinant trypsinogen in continuous cultures with *Pichia pastoris* Mut+. **Journal of Biotechnology**, 157: 180-188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.10.010>
- Pedroza-Rodríguez, A.M. and R. Rodríguez-Vázquez, (2013). Optimization of C/N ratio and inducers for wastewater paper industry treatment using *Trametes versicolor* immobilized in bubble column reactor. **Journal of Mycology**, 2013 (Article ID 536721): 11 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/536721>
- Peña, D.A., B. Gasser, J. Zanghellini, M.G. Steiger and D. Mattanovich, (2018). Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. **Metabolic Engineering**, 50: 2-15. <http://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.017>
- Pezzella, C., V.G. Giacobelli, V. Lettera, G. Olivieri, P. Cicatiello, *et al.*, (2017). A step forward in laccase exploitation: recombinant production and evaluation of techno-economic feasibility of the process. **Journal of Biotechnology**, 259: 175-181. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jbiotec.2017.07.022>
- Pimentel, N., A. Rodríguez-López, S. Díaz, J.C. Losada, D. Díaz, *et al.*, (2018). Production and characterization of a human lysosomal recombinant iduronate-2-sulfatase produced in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 65 (5): 655-664. <http://dx.doi.org/10.1002/bab.1660>
- Poutou, R.A., E. Amador and M. Candelario, (1994). Banco de células primario (BCP): Caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes. **Biotecnología Aplicada**, 11 (1): 55-59.
- Poutou, R.A., B.E. Quevedo, H. Córdoba, H. Sáenz and L.A. Barrera, (2005). Influencia de la Fuente de Carbono Sobre la Expresión de Proteínas AOX1-reguladas en *Pichia pastoris*. **NOVA**, 3 (3): 75-87.

- Poutou-Piñales, R.A., H.A. Córdoba-Ruiz, L.A. Barrera-Avellaneda and J.M. Delgado-Boada, (2010). Carbon source feeding strategies for recombinant protein expression in *Pichia pastoris* and *Pichia methanolica*. **African Journal of Biotechnology**, 9 (15): 2173-2184.
- Ramón, R., P. Ferrer and F. Valero, (2007). Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, 130: 39-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.02.025>
- Rice, E.W., (2017) Standard methods for the examination of water and wastewater 2540 A, 23rd ed. Water Environment Federation.
- Rivera-Hoyos, C.M., E.D. Morales-Álvarez, R.A. Poutou-Piñales, A.M. Pedroza-Rodríguez, R. Rodríguez-Vázquez, *et al.*, (2013). Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, 27 (3-4): 67-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2013.07.001>
- Rivera-Hoyos, C.M., E.D. Morales-Álvarez, S.A. Poveda-Cuevas, E.A. Reyes-Guzmán, R.A. Poutou-Piñales, *et al.*, (2015). Computational analysis and low-scale constitutive expression of laccases synthetic genes *GLCC1* from *Ganoderma lucidum* and *POXA 1B* from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris*. **Plos One**, 10 (1): e0116524. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116524.g002>
- Sears, I.B., J. O'connor, O.W. Rossanese and B.S. Glick, (1998). A Versatile Set of Vectors for Constitutive and Regulated Gene Expression in *Pichia pastoris*. **Yeast**, 14: 783-790.
- Shiraishi, K., M. Oku, D. Uchida, H. Yurimoto and Y. Sakai, (2015). Regulation of nitrate and methylamine metabolism by multiple nitrogen sources in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. **FEMS Yeast Research**, 15 (7): fov084. <http://doi.org/10.1093/femsyr/fov084>
- Siverio, J.M., (2002). Assimilation of nitrate by yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, 26 (3): 277-284. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00615.x>
- Stasyk, O.G., I.O. Denega, D. Padhorny, K.V. Dmytruk, D. Kozakov, *et al.*, (2018). Glucose regulation in the methylotrophic yeast *Hansenula (Ogataea) polymorpha* is mediated by a putative transceptor Gcr1. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 103: 25-34. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.08.002>
- Subramani, S., (1993). Protein Import Into Peroxisomes and Biogenesis of the Organelle. **Annual Review in Cell Biology**, 9: 445-478.
- Tinoco, R., M.A. Pickard and R. Vazquez-Duhalt, (2001). Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. **Letters in Applied Microbiology**, 32 (5): 331-335. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00913.x>
- Tschopp, J.F., P.F. Brust, J.M. Cregg, C.A. Stillman and T.R. Gingeras, (1987). Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastons*. **Nucleic Acids Research**, 15 (9): 3859-3876.
- van der Klei, I.J., G.J. Sulter, W. Harder and M. Veenhuis, (1991). Assembly of Alcohol Oxidase in the Cytosol of a Peroxisome-Deficient Mutant of *Hansenula polymorpha*-Properties of the Protein and Architecture of the Crystals. **Yeast**, 7: 195-209.

- van der Klei, I.J., H. Yurimoto, Y. Sakai and M. Veenhuis, (2006). The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1763: 1453–1462.
- Vassileva, A., D.A. Chugh, S. Swaminathan and N. Khanna, (2001). Expression of Hepatitis B Surface Antigen in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris* Using the GAP Promoter. **Journal of Biotechnology**, 88: 21-35.
- Vedvick, T.S., (1991). Gene Expression in Yeast: *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, 2: 742-745.
- Veenhuis, M., K. Zwart and W. Harder, (1978). Degradation of Peroxisomes After Transfer of Methanol-Grown *Hansenula polymorpha* Into Glucose-Containing Media. **FEMS Microbiology Letter**, 3: 21-28.
- Waterham, H.R., M.H. Digan, P.J. Koutz, S.V. Lair and J.M. Cregg, (1997). Isolation of the *Pichia pastoris* Glyceroldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Gene and Regulation and Use of Its Promoter. **Gene**, 186: 37-44. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00675-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00675-0)
- Wriessnegger, T., G. Gübitz, E. Leitner, E. Ingolic, J. Cregg, *et al.*, (2007). Lipid composition of peroxisomes from the yeast *Pichia pastoris* grown on different carbon sources. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1771: 455-461.
- Wu, J., J. Lin, L. Chieng, C. Lee and T. Hsu, (2003a). Combined Use of *GAP* and *AOX1* Promoter to Enhance the Expression of Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, 33: 453–459. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00147-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00147-9)
- Wu, J.-M., L.-L. Chieng, T.-A. Hsub and C.-K. Lee, (2003b). Sequential Expression of Recombinant Proteins and their Separate Recovery from a *Pichia pastoris* Cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, 3715: 1-8. [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00017-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00017-2)
- Xie, J., L. Zhang, Q. Ye, Q. Zhou, L. Xin, *et al.*, (2003). Angiostatin production in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* fed with mixed carbon sources. **Biotechnology Letters**, 25: 173-177.
- Yuan, W., D.L. Tuttle, Y.-J. Shi, G.S. Ralph and W.A. Dunn, (1997). Glucose-induced Microautophagy in *Pichia pastoris* Requires the α -subunit of phosphofructokinase. **Journal of Cell Science**, 110: 1935-1945.
- Zhang, A.-L., J.-X. Luo, T.-Y. Zhang, Y.-W. Pan, Y.-H. Tan, *et al.*, (2009a). Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. **Molecular Biology Reports**, 36 (6): 1611-1619. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-008-9359-4>
- Zhang, A.-L., J.-X. Luo, T.-Y. Zhang, Y.-W. Pan, Y.-H. Tan, *et al.*, (2009b). Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. **Molecular Biology Report**, 36 (6): 1611-1619. <http://doi.org/10.1007/s11033-008-9359-4>
- Zwart, K.B., M. Veenhuis and W. Harder, (1983). Significance of yeast peroxisomes in the metabolism of choline and ethanalamine. **Antonie van Leeuwenhoek**, 49 (4-5): 369-385. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00399317>



Research Article

Methanol addition after glucose depletion improves rPOXA 1B production under the *pGap* in *P. pastoris* X33: breaking the habit

Leidy D. Ardila-Leal¹ · Raul A. Poutou-Piñales¹  · Edwin D. Morales-Álvarez² · Claudia M. Rivera-Hoyos¹ · Aura M. Pedroza-Rodríguez¹ · Balkys E. Quevedo-Hidalgo¹ · Alejandro Pérez-Flórez³

Received: 17 September 2020 / Accepted: 28 December 2020
© The Author(s) 2021 

Abstract

The purpose of this study was to demonstrate that methanol addition after glucose depletion has a positive effect on improving rPOXA 1B production under the control of *pGap* in *P. pastoris*. Four different culture media (A, B, C and D) were used to culture *P. pastoris* X33/*pGapZaA-LaccPost-Stop* (clone 1), containing a previously optimized *POXA 1B* synthetic gene coding for *P. ostreatus* laccase, which after glucose depletion was supplemented or not with methanol. Enzyme activity in culture media without methanol (A, B, C and D) was influenced by media components, presenting activity of 1254.30 ± 182.44 , 1373.70 ± 182.44 , 1343.50 ± 40.30 and 8771.61 ± 218.79 U L⁻¹, respectively. In contrast, the same culture media (A, B, C and D) with methanol addition 24 h after glucose depletion attained activity of 4280.43 ± 148.82 , 3339.02 ± 64.36 , 3569.39 ± 68.38 and $14,868.06 \pm 461.58$ U L⁻¹ at 192 h, respectively, representing an increase of approximately 3.9-, 2.4-, 3.3- and 1.6-fold compared with culture media without methanol. Methanol supplementation had a greater impact on volumetric enzyme activity in comparison with biomass production. We demonstrated what was theoretically and biochemically expected: recombinant protein production under *pGap* control by methanol supplementation after glucose depletion was successful, as a feasible laboratory production strategy of sequential carbon source addition, breaking the habit of utilizing *pGap* with glucose.

Keywords *pGap* · *pAOX1* · *P. pastoris* X33 · rPOXA 1B · Laccase · Glucose · Methanol

1 Introduction

Laccases (p-diphenol: dioxygen oxidoreductases EC 1.10.3.2) are multi-copper oxidoreductase enzymes [4] capable of catalysing the reduction of molecular oxygen (O₂) to water (H₂O) [41, 55]. For industrial applications, the most advantageous laccases are those with a high redox potential [35], owing to the increased range of transformable substrates by the enzyme. The successful application of laccases in industry are derived from fungi, where considerable yields have been achieved [4]. However, fungi have certain limitations, as they

demand high oxygen availability and require long cultivation times because of important changes in the rheology of the medium due to mycelial growth [1, 8, 43, 49]. These limitations have led to the heterologous expression of laccases in hosts such as *Saccharomyces cerevisiae* [39], *Yarrowia lipolytica* [33], *Pichia pastoris* [12, 56] and *Kluyveromyces lactis* [21]. Nevertheless, *P. pastoris* remains an established system for the successful expression of recombinant proteins, mainly for biopharmaceuticals and enzymes for industrial or environmental application [14, 37]. It is also a widely used host for fungal laccase expression. The reasons for the use

✉ Raul A. Poutou-Piñales, rpoutou@javeriana.edu.co | ¹Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Bogotá, D.C., Colombia. ²Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia. ³Grupo de Fitoquímica de la PUJ (GIFUJ), Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Bogotá, D.C., Colombia.



of *P. pastoris* are its high level of expression, the ability to use different carbon sources [51, 52], the advantage of growing in high cell density cultures and its capacity to produce large amounts of recombinant protein [4]. Additional advantages include its positive response to different fermentation strategies [25] and ability for high extracellular expression of recombinant proteins [74]. Lastly, *P. pastoris* is designated as generally recognized as safe (GRAS) by regulatory authorities [2].

For over three decades, diverse promoters have been used to express different types of recombinant proteins in *P. pastoris*, with *pAOX1* and *pGap* among those most frequently adopted [3, 14, 15, 17, 22, 36, 38, 48, 56, 67]. Methanol induces *pAOX1* (tightly regulated carbon source-dependent repression/induction promoter), favouring the expression of proteins under the control of the promoter. *pAOX1* is repressed by glucose and glycerol; even the absence of these carbon sources does not represent a significant transcription of AOX1 (alcohol oxidase, E.C. 1.1.3.13), demonstrating that methanol is necessary to induce high levels of transcription [13]. Culturing *P. pastoris* in media containing methanol as the carbon source requires peroxisome biogenesis to detoxify the cell from H₂O₂ generated during methanol metabolism [3, 52, 61, 64, 65, 70]. Methanol is catabolized into dihydroxyacetone (DHA) and glyceraldehyde phosphate (GAP). DHA exits the peroxisome to be phosphorylated in the cytosol and is converted into dihydroxyacetone-phosphate (DHAP) and later to glyceraldehyde-3-phosphate (GA3P) that feeds the glycolytic pathways. In general, this is the mechanism by which *P. pastoris* processes methanol. Moreover, favoured by the methanol detoxification pathway, this is how it induces recombinant protein expression controlled by the *pAOX1* promoter [32, 52, 63].

The constitutive *pGap* promoter is a strong promoter that controls the expression of NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (E.C. 1.2.1.12), an enzyme that participates in both glycolytic and gluconeogenesis pathways [42, 52, 69, 76]. However, the strength of *pGap* depends on the carbon source.

In 1997, a study conducted by Waterham et al. [69] demonstrated higher β -lactamase (E.C. 3.5.2.6) expression using the *pGap* promoter (*pGap-bla*) under glucose in comparison with the *pAOX1* (*pAOX1-bla*) promoter under methanol induction. Waterham et al. [69] also established remarkable expression of *pGap-bla* depending on the carbon source: 100% expression under glucose > 73% under glycerol > 45% under oleic acid > 36% under methanol [69]. This demonstrated that methanol stimulates *pGap*, thereby increasing the recombinant enzyme production under the control of this promoter. Furthermore, *pGap* and *pAOX1* efficiencies have been previously addressed [7, 69, 76]; however, other authors have obtained contradictory

results [9, 57, 66], suggesting that many other uncontrolled factors can interfere with recombinant protein expression, such as the nature of the protein and intrinsic characteristics [10].

Successful strategies have been used to improve recombinant protein expression under the control of *pAOX1* (Mut^s phenotype, slow methanol utilization) and/or the *pGap* promoter. For example, integration of several gene copies within *P. pastoris*' genome [7], culture with mixed-carbon sources, such as glucose/methanol [44], glycerol/methanol [30, 73] or sorbitol/methanol [31, 53] under *pAOX1* expression control. Additional strategies include the combined use of *pGap* and *pAOX1* within the same strain [71] to induce *pAOX1* after glucose depletion, and a strategy also used to sequentially express and recover the cloned protein separately (extra- and intracellular), [16, 71, 72]. In addition, the co-expression of chaperones and the engineering of glycosylation and secretory pathways have been implemented as a strategy to maximize the production of recombinants [37, 46] and regulate glycosylation patterns of pharmaceutical proteins [28, 29].

Our objective was to assay the effect of methanol addition after glucose depletion on recombinant laccase production controlled by *pGap* from *Pleurotus ostreatus* expressed in *P. pastoris*, hereinafter referred to as rPOXA 1B [56], for which different culture media were used. This equates to searching for a feasible laboratory production strategy of sequential carbon source addition, breaking the habit of using glucose to stimulate *pGap* and methanol to induce *pAOX1*.

2 Materials and methods

2.1 Strain

P. pastoris X33 containing expression vector pGapZaA-LaccPost-Stop (clone 1) with previously optimized POXA 1B synthetic gene coding for *Pleurotus ostreatus* laccase was used. This strain was previously preserved in YPG media (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose) supplemented with 20% (w/v) glycerol and stored at -80 °C [56].

2.2 Inoculum preparation

Vials obtained from *P. pastoris* X33/pGapZaA-LaccPost-Stop (clone 1) Master Cell Bank (MCB) were used [50]. Once thawed, 5 mL sterile YPG media supplemented with 100 μ g mL⁻¹ Zeocin was inoculated and incubated at 30 °C

overnight at 180 rpm. Five-hundred-milliliter Erlenmeyer flasks containing 100 mL fresh YPG-Z (effective work volume, EWV) were inoculated and cultured for 12 h under the same conditions.

2.3 Culture media and conditions

For recombinant strain culture, four culture media were evaluated on an Erlenmeyer shake-flask scale (Table 1) and were cultured at 30 °C, 180 rpm, with or without methanol supplementation after glucose depletion. Culture media A, B and C were based on previously published sequential statistical design and improved processes [5]. Culture media D was based on a sequential statistical design and improved process, where nitrogen and carbon sources were substituted to generate a low-cost culture media for rPOXA 1B production [6] (Table 1). All these media were assayed in triplicate for 0.5% methanol (v/v) addition [26, 27], every 24 h, starting at 24 h. In general, samples were collected at 0, 12, 24 and every 24 h up to 168 h (for media A, B, C and D without methanol), and up to 192 h (for media A, B, C and D with methanol).

Samples were centrifuged at $5867 \times g$, 17 ± 2 °C for 15 min and assayed for residual glucose concentration (g L^{-1}) or residual reducing sugar concentration (g L^{-1}), [40], enzyme activity (U L^{-1}), [5, 47, 62], extracellular protein concentration (mg mL^{-1}), [19], specific enzyme activity (U mg^{-1}) and C/N ratio [54]. Every sample was collected before methanol addition.

2.4 Dry biomass determination (g L^{-1})

The dry biomass concentration was calculated for media A, B, C and D with methanol using a calibration curve as follows [34] (Eq. 1).

$$X = 1.1726 \times OD_{\lambda 600 \text{ nm}} \quad R = 0.9870 \quad (1)$$

where $X = \text{g L}^{-1}$ dry biomass, and $OD_{\lambda 600 \text{ nm}}$ = optical density at 600 nm. Subsequently, to obtain $\mu_{(X)}$ (h^{-1}) and dt (h), X (g L^{-1}) was transformed into $\text{Ln}(X/X_0)$ [20].

2.5 Extracellular protein quantification (mg mL^{-1})

Residual protein for each sample was determined by direct absorbance quantification at 280 nm, using a NanoDrop UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific) [19].

2.6 Laccase activity quantification (U L^{-1})

To determine laccase activity, two different buffers, 60 mM sodium acetate buffer and 0.1 M citrate buffer, were used.

In the first assay, laccase activity (U L^{-1}) was monitored by a change in absorbance at 436 nm ($\epsilon_{436} = 29.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) due to ABTS [2, 20-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] oxidation in a 60 mM sodium acetate buffer (pH 4.5 ± 0.2). An 800-microliter sample was added to 100 μL of 600 mM sodium acetate buffer, and 100 μL of 0.5 mM ABTS at room temperature (25 °C). Green radical formation was evaluated spectrophotometrically for 1 min. Blank solution contained 800 μL distilled water, 100 μL of 600 mM sodium acetate buffer solution and 100 μL of 0.5 mM ABTS [62]

Table 1 Conditions and component description of the four culture media used in the study

Description and theoretical composition	Culture media			
	A	B	C	D
Erlenmeyer total capacity (mL)	500			
Inoculum with $9.1 \pm 0.0005 \text{ g L}^{-1}$ biomass (% v/v)	10			
CuSO_4 (g L^{-1}), (rPOXA 1B enzyme cofactor)	0.16			
Chloramphenicol (g L^{-1}), (to avoid bacterial contamination)	0.10			
Media volume (mL), EWV	150	300		
Glucose (g L^{-1})	10			–
Glucose USP (g L^{-1})	–	–	–	20
Peptone (g L^{-1})	20	10	20	–
Soy protein isolate (g L^{-1})	–	–	–	40
Yeast extract (g L^{-1})	10	10	15	–
Malt extract (g L^{-1})	–	–	–	11.74
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g L^{-1})	2.64	0.66	2.64	4.91
(C/N) ₀ ratio	3.4 ± 0.04	4.4 ± 0.03	3.5 ± 0.03	6.7 ± 0.02
References	[5]			[6]

(C/N)₀ ratio is the carbon/nitrogen ratio (at the beginning, before strain inoculation)

(Eq. 2). This technique was used only for culture media A, B and C with or without methanol.

$$U \text{ mL}^{-1} = \frac{(\Delta E \times V_t)}{(\epsilon \times d \times V_s)} \quad (2)$$

where ΔE corresponds to the difference between final and initial absorbance after 1 min of reaction, V_t refers to the total reaction volume (mL), ϵ is ABTS molar extinction coefficient ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), d is the length of the cuvette in cm and V_s is the volume of sample (mL) contained in the reaction.

For the second assay, laccase activity (U L^{-1}) was monitored by a change in absorbance at 420 nm ($\epsilon_{420} = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) due to ABTS oxidation in a 0.1 M citrate buffer (pH 3.0 ± 0.2). A two-microliter sample was added to 898 μL of 0.1 M citrate buffer and 100 μL of 2 mM ABTS at room temperature (25°C). Green radical formation was evaluated spectrophotometrically for 1 min. Blank solution contained 2 μL distilled water, 898 μL citrate buffer solution and 100 μL of 2 mM ABTS [5, 47] (Eq. 2). This technique was used only for culture media D with or without methanol.

For both assays, an enzyme activity unit is defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 μmol of ABTS per minute. Specific activity was calculated as the quotient between enzymatic activity and total extracellular protein concentration, per minute (Eq. 3).

$$\text{Spec. Act.} = \frac{\text{Enz. Act.}}{\text{Prot. Conc.}} \quad (3)$$

where Enz. Act. is the enzyme activity expressed as U L^{-1} , Prot. Conc. is the extracellular protein concentration expressed as mg mL^{-1} .

Productivity as a function of enzyme biological activity, expressed as $\text{U L}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Eq. 4), was calculated as follows:

$$P_{\text{Enz.}} = \frac{\text{Enz. Act.}}{\text{Time}} \quad (4)$$

2.7 Residual reducing sugar quantification (g L^{-1})

Total residual reducing sugar (glucose or glucose USP) concentrations were determined for each sample in triplicate. To this end, 3,5-dinitrosalicylic acid was used [40]. A standard curve was prepared with D-glucose ranging from 0.1 to 2 g L^{-1} ; values were calculated according to Eq. 5.

$$y = 0.6181x - 0.048; \quad R^2 = 0.9984 \quad (5)$$

2.8 Determination of total carbon (TC, g L^{-1}), total nitrogen (TN, g L^{-1}) and carbon/nitrogen (C/N) ratio

Both TC and TN concentrations were measured by using a total organic carbon (TOC) analyser (Shimadzu TOC-L). This device provides a unique method of catalytic combustion oxidation and NDIR, according to Standard Method 5310B [54]. Standard solutions (0.1 g L^{-1}) of each media component (separately) were prepared and then analysed in the TOC device. Once TC and TN concentrations were established, stoichiometric calculations were performed to determine the concentration for each culture media (g L^{-1}) and media (C/N) ratio. The C/N ratio of the kinetic behaviour (after strain inoculation) was assayed directly from the sample after biomass removal by centrifugation, following the previously mentioned conditions.

3 Results

In this study, different culture media (A, B, C and D) resulting from statistical processes of improvement, optimization and cost reduction were used [5, 6] to test the expression of the laccase POXA 1B from *Pleurotus ostreatus* expressed in *P. pastoris* under the control of the constitutive promoter *pGap*. Glucose was used as the primary carbon source, followed by the addition or not of methanol, after glucose depletion.

P. pastoris X33/pGapZaA-LaccPost-Stop (clone 1) kinetic behaviour grown in different media with or without methanol addition after glucose depletion is illustrated in Fig. 1, where it is possible to observe kinetic behaviour changes when methanol was added at 24 h of culture.

3.1 Culture media without methanol

For culture media without methanol (A, B, C and D), glucose or glucose USP concentration was depleted approximately at 12 or 24 h of culture (Fig. 1), suggesting that 24 h was an adequate time to initiate methanol addition [52].

Culture media A, B and C had similar initial glucose concentrations. They differed in their yeast extract, peptone and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentrations (Table 1). Table 2 and Fig. 1 show the observed volumetric enzyme activity and specific activity for culture media A, B, C and D at 168 h of culture.

For A and B media without methanol, maximum volumetric productivity was obtained at 72 h of culture (12.28 and $10.81 \text{ U L}^{-1} \text{h}^{-1}$) and decreased to 7.47 and $8.18 \text{ U L}^{-1} \text{h}^{-1}$ at 168 h, respectively (Fig. 1). For culture media C, no sample was collected at 72 h; nonetheless, volumetric productivity at 168 h was $8.0 \text{ U L}^{-1} \text{h}^{-1}$.

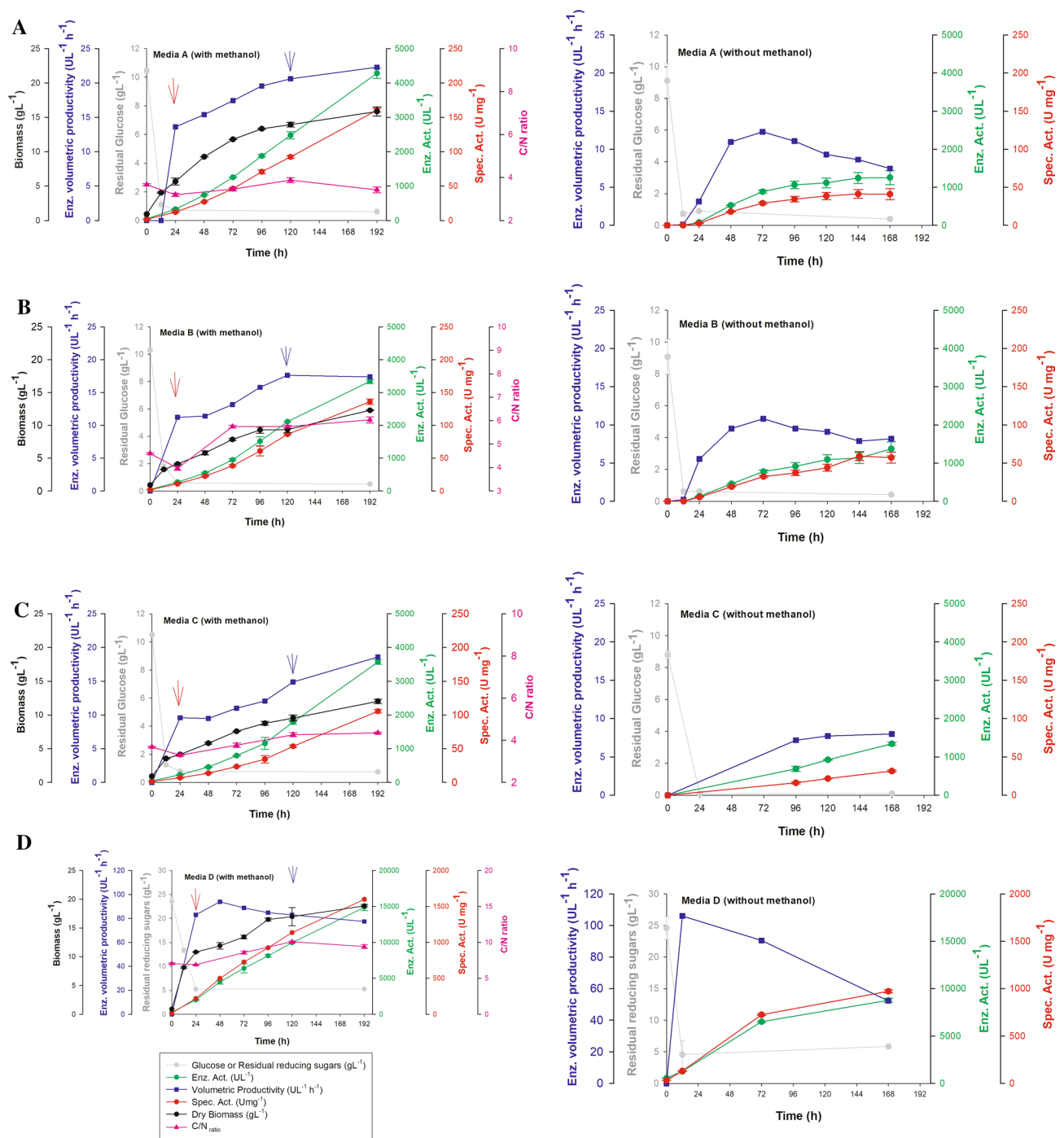


Fig. 1 Growth kinetic of *P. pastoris* X33/pGapZaA-LaccPost-Stop (clone 1) cultured in different media (A, B, C and D) with or without methanol addition after glucose depletion (media A, B and C) or

residual reducing sugar (media D) depletion. In media with methanol, the red arrow indicates time of initial methanol addition, and the blue arrow indicates the last methanol supplementation

Higher volumetric enzyme activity and specific activity at 168 h of culture were observed in media D in comparison with media A, B and C (Table 2, Fig. 1). Yet, higher volumetric productivity ($105.97 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) was obtained at 12 h of culture and decreased to $52.21 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ at 168 h of culture.

3.2 Culture media with methanol

Glucose or glucose USP concentration depletion exhibited similar trends (at approximately 12 or 24 h of culture) for all culture media (A, B, C and D with methanol), thus

Table 2 Volumetric ($U L^{-1}$) a specific ($U mg^{-1}$) activity at 168 and 192 h of culture of different media with or without methanol supplementation, respectively

Culture media	Volumetric activity	
	$U L^{-1} \pm SD$ (168 h)	$U L^{-1} \pm SD$ (192 h)
A	1254.30 \pm 182.44	
B	1373.70 \pm 182.44	
C	1343.50 \pm 40.30	
D	8771.61 \pm 218.79	
A with methanol		4280.43 \pm 148.82
B with methanol		3339.02 \pm 64.36
C with methanol		3569.39 \pm 68.38
D with methanol		14,868.06 \pm 461.58
Culture media	Specific activity	
	$U mg^{-1} \pm SD$ (168 h)	$U mg^{-1} \pm SD$ (192 h)
A	40.87 \pm 7.15	
B	57.05 \pm 7.15	
C	31.64 \pm 1.22	
D	971.92 \pm 15.21	
A with methanol		160.38 \pm 2.90
B with methanol		135.95 \pm 4.30
C with methanol		105.56 \pm 2.66
D with methanol		1597.6 \pm 76.28

confirming the decision to start methanol supplementation at 24 h.

The C/N ratio increased slightly at the beginning (0 h), as a result of the inoculation effect (Table 1, Fig. 1A, B, C, D with methanol), as follows: For media A with methanol from 3.4 ± 0.04 to 3.7 ± 0.5 ; for media B with methanol from 4.4 ± 0.03 to 4.6 ± 0.39 ; media C with methanol from 3.5 ± 0.003 to 3.7 ± 0.3 ; and media D with methanol from 6.7 ± 0.02 to 7.1 ± 1.2 . Subsequently, the C/N ratio decreased from 0 to 24 h, but a modest increase from 24 h up to 120 h (end of methanol addition) was observed. Lastly, a final decrease at 192 h of culture was recognized to conclude at 3.43 ± 0.3 , 6.03 ± 0.13 , 4.35 ± 0.41 and 9.42 ± 0.27 , for media A, B, C and D, respectively (Fig. 1A, B, C, D).

For culture media A, B, C and D with methanol at 192 h of culture, volumetric enzyme activity increased (Table 2), representing an approximate 3.4-, 2.4-, 2.7- and 1.7-fold increase compared with media without methanol, respectively. Specific activity also increased (Table 2), exhibiting an approximate 3.9-, 2.4-, 3.3- and 1.6-fold increase (Fig. 1) compared with the same media without methanol.

Volumetric productivity behaviour depended on culture media. During the methanol addition period (between 24 and 120 h) for A and C media, its value increased up to 192 h with $22.29 U L^{-1} h^{-1}$ and $18.59 U L^{-1} h^{-1}$, respectively. In contrast, for media B at 120 h, a maximum value was observed with $17.61 U L^{-1} h^{-1}$. Lastly, at 192 h, a negligible decrease

was detected ending with $17.39 U L^{-1} h^{-1}$. Furthermore, for media D, the highest volumetric productivity was observed at 48 h with $94.0 U L^{-1} h^{-1}$, and a gradual decrease was recognized until reaching $77.4 U L^{-1} h^{-1}$ at 192 h (Fig. 1A, B, C).

Biomass growth in culture media A, B, C and D with methanol increased, depending on glucose or glucose USP consumption up to 24 h. As expected, a growth slope change was displayed after sugar depletion, which extended from 24 to 192 h including the methanol supplementation period (Fig. 1A, B, C, D). Specific growth rate ($\mu_x h^{-1}$) and doubling time (dt h) were similar for all the different culture media assayed with methanol. On the other hand, maximum biomass expressed as $g L^{-1}$ (Table 3) (at the end of culture) oscillated between 12 and $23 g L^{-1}$.

Table 3 Growth slope final biomass and kinetic parameters after glucose depletion, during methanol supplementation

Culture media (with methanol)	$\mu_x (h^{-1})$	dt (h)	Biomass ($g L^{-1} \pm SD$) 192 h
A	0.003	208	15.85 \pm 0.68
B	0.004	155	12.28 \pm 0.06
C	0.005	148	12.22 \pm 0.33
D	0.003	225	18.84 \pm 0.16

4 Discussion

In this study, we conducted assays to demonstrate the positive effect of methanol supplementation after glucose depletion to produce rPOXA 1B laccase under the control of the *pGap* promoter in a *P. pastoris* culture. Different culture media previously devised by statistical designs were used [5, 6]. As previously suggested, statistical designs are more efficient than the traditional one factor at time of optimization process [11]. The selection of rich culture media instead of a minimal one responds to minimal culture media limitations. In general, minimal media contains an unbalanced composition, favours salt precipitation, with high ionic strength and insufficient nutrient supply. Moreover, it promotes precipitation of phosphorus compounds, generates osmotic stress that can lead to induction of protein unfolding and favours the formation of reactive oxygen species (ROS), among others, as has been summarized by Burgard et al. [11].

On the other hand, laccase substrate specificity varies with pH, among other factors; therefore, to assay laccase activity from different species, several buffers [47, 62] and substrates [55] have been utilized. In this study, only one substrate (ABTS) employing two different buffers (acetate or citrate) was used. The intention was that after glucose depletion, methanol addition would be the main factor increasing enzyme activity, regardless of the influence the buffer might have on volumetric enzyme activity detection, in addition to the affinity of the enzyme for the substrate. Hence, for culture media D (with or without methanol), enzyme activity was assayed in citrate buffer. Although enzyme activity is higher when using the citrate buffer at pH 3.0 compared with acetate buffer at pH 4.5, media D produced higher enzymatic activity compared to the other studied media, even when enzyme activity was evaluated using acetate buffer at pH 4.5 (data not shown).

4.1 Culture media without methanol

P. pastoris is a methylotrophic yeast which, when grown in glucose, glycerol or ethanol, promotes peroxisomal active degradation through autophagy (mediated by proteolysis), repressing Mut pathway genes expression, such AOX [23, 24, 52, 68, 75].

In this study we used glucose as the primary carbon source, because rPOXA 1B is under the *pGap* control [56]. Additionally, yeast generally have a higher preference for glucose as a substrate, resulting in a rapid activation of the glucose transport signal towards the biosynthesis and cellular regulation machinery, repressing the genes involved in gluconeogenesis, respiration, transport, the glyoxylate

cycle and metabolism of alternative carbon substrates [60].

In general, when *P. pastoris* is grown in glucose, intracellular cAMP levels are low, because glucose inhibits adenyl cyclase (E.C.4.6.1.1) activity. When glucose is depleted, cAMP concentration rapidly increases, forming a complex with “cAMP receptor protein”, which may act on the pAOX1 promoter, inducing the use of other carbon sources [18, 51].

Results obtained with media A, B and C (with glucose and without methanol) at 168 h of culture suggest that a slightly higher media (C/N)₀ ratio and a lower oxygen transfer (volume of medium/volume of shake flask ratio 3:5) surface area (Table 1) discretely favoured enzyme activity (1373.70 ± 182.44 U L⁻¹) in culture media B, presenting a 1.095-fold increase in comparison to culture A and 1.022-fold increase in comparison to culture C (Fig. 1).

Culture media D (without methanol) had the following modifications in comparison to other media: glucose was substituted for a two-fold increase in glucose USP concentration (compared to media A, B and C without methanol). Additionally, peptone and yeast extract were both substituted by isolate soy protein [6], resulting in a media (C/N)₀ ratio of 6.7 ± 0.02 (Table 1). This modification represented a 7.0-, 6.4- and 6.5-fold increase in volumetric enzyme activity compared with culture A, B and C, respectively (Media D volumetric enzyme activity 8771.61 ± 218.79 U L⁻¹). These data suggest that laccase activity is favoured with a higher C/N ratio when compared with media A, B and C. This phenomenon has been observed for native laccases, upon native fungus wood colonization, where laccases are produced in greater quantity as a result of C/N ratio increase. Therefore, in our study, an increase in the C/N ratio possibly mimics “nature’s own C/N ratio environment” [45].

4.2 Culture media with methanol

When *P. pastoris* is grown in methanol, as mentioned previously, peroxisome biogenesis occurs to detoxify methanol; however, peroxisomes are also involved in nitrogen source assimilation, mainly (NH₄)₂SO₄. Nevertheless, in this study, soy protein isolate and malt extract were included in the culture media as organic nitrogen sources, (Table 1) by using amine oxidases [58, 59, 77]. In this regard, other authors have demonstrated that upregulation of nitrogen-associated genes is greater upon methanol supplementation [11], possibly explaining why media D with methanol further increased enzyme activity in comparison with other assayed culture media, due to greater nitrogen source concentrations (Table 1).

Methanol addition every 24 h resulted in important enhancements for all cultures (A, B, C and D), with

augmentations ranging from a 1.7- to 3.4-fold increase, compared with similar cultures without methanol (Fig. 1). On the other hand, a slight increase in the C/N ratio during the methanol addition period was supported by the increase in methanol concentration, coinciding with growth slope observed changes after glucose depletion (Fig. 1A, B, C and D with methanol).

At 168 h, culture media A, B and C without methanol had very similar enzyme activity results. For the same culture media with methanol, an even greater increase was observed, with similar values among media (Table 2, Fig. 1). In relation to enzyme activity, medium D with and without methanol had very similar behaviour between 0 and 72 h; however, after 72 h, medium D with methanol showed a considerably higher increase in enzyme activity (Fig. 1). When comparing the tendency of the enzymatic activity (U L^{-1}) between the media with and without methanol at 168 h (Fig. 1), it was observed enzymatic activity was much higher in the cultures with methanol.

Biomass production only doubled at the end of culture (A, B, C and D with methanol), depending on culture media composition (Table 3). In contrast, depending on culture media composition, volumetric enzyme activity (U L^{-1}) increased during methanol supplementation, ranging between 3339.02 ± 64.36 and $14,868.06 \pm 461.58 \text{ U L}^{-1}$ at 192 h, suggesting methanol addition was less critical for cell growth (Table 3), as has been previously investigated [7]. However, its main importance is based on the fact that methanol metabolism generates formaldehyde, which is transferred to xylulose-5-phosphate (Xu5P), generating G3P and DHA. Xu5P is regenerated in the Xu5P cycle (located in the peroxisomes), involving reactions of the pentose phosphate pathway [46]. Collectively, methanol supply stimulates peroxisome biogenesis, activating the Mut pathway, Xu5P cycle and glycolytic and pentose phosphate pathways [46, 52], thus activating both native and putative *pGap* promoters, important for NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and in this case, rPOXA 1B production, respectively.

P. pastoris combined with use of *pGap* and *pAOX1* has been previously reported [71, 76]. As a case in point, the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) gene was inserted into the pPIC9 K and pGapZA vectors. Both vectors were transformed into GS115 host strain to constitutively produce hGM-CSF under the *pGap* promoter and induce hGM-CSF production by methanol addition after glucose depletion. Other authors have studied recombinant protein sequential expression and their separate recovery (intra- or extracellular) from a *Pichia pastoris* cultivation [72]. In the aforementioned study, β -galactosidase (β -gal) was constitutively and intracellularly expressed under the *pGap* promoter control, and hGM-CSF was secreted by *pAOX1*

methanol induction, after the medium with glucose (yeast extract, peptone, dextrose) was replaced with a medium with methanol (yeast extract, peptone, methanol), respectively. It is important to delineate that in our research when glucose was depleted, it was not necessary to replace the media to induce native *pAOX*; methanol addition followed immediately, although the medium had traces of glucose.

Azoun and Kallel [7] studied by a transcriptomic approach in *P. pastoris* the effect a carbon source would have on rabies virus glycoprotein (RABV-G) production. Their results demonstrated the transcription levels of genes involved in central metabolism were upregulated when glucose was used as a carbon source (*pGap*-RABV-G), while the transcription levels of anti-oxidative genes were lower. When methanol was used (*pAOX1*-RABV-G), the metabolism was redirected towards the dissimilar pathway by positive regulation of formaldehyde dehydrogenase (E.C. 1.2.1.1) and negative regulation of enzymes involved in central metabolism. These observations supported glucose use in *P. pastoris* to improve RABV-G expression [7]. Their results agree with the same effect of glucose had in our work.

Burgard et al. [11] evaluated the expression of porcine pro-carboxypeptidase B (CPB) under the control of *pGap* in *P. pastoris*. In their work, after glycerol depletion, the methanol pulse tests showed strong induction of gene regulation (significant up- and down-regulation) 1 h after the methanol feed was initiated [11]. These results correlated with the restructure of the yeast's metabolism towards methanol use. Their findings pointed out that the regulation of peroxisomal genes was positive during the addition of methanol, which agrees with our findings, however, using glucose instead of glycerol.

5 Conclusion

In the present study, once glucose was depleted, methanol addition directly stimulated native *pAOX1* and *pAOX2*, increasing the production of alcohol oxidase used by the cell to detoxify methanol in the peroxisomes [51, 52]. On the other hand, as a consequence of detoxification, the G3P generated stimulated native and putative *pGap*, where the putative promoter controlled rPOXA 1B expression.

Our proposal could be an interesting strategy, whose results were theoretically and biochemically expected and previously assayed by using glycerol instead of glucose as a primary carbon source on the expression of the CPB gene, under the *pGap* promoter. However, it is important to note that methanol addition is not an environmentally friendly option, since the enzyme used is impure (for

environmental purposes) because it may contain traces of methanol. Nonetheless, this strategy could be useful if the production of the pure enzyme is required for non-environmental applications, or if enzyme production is carried out at a small scale for research purposes. In addition, our proposal breaks the habit of strictly using glucose (or glycerol) for the expression of recombinant proteins under the control of the *pGap*, as is customary.

Acknowledgements This research was funded by Grant ID: 00006337 (*Optimización del medio de cultivo para producción de la lacasa recombinante POXA 1B de Pleurotus ostreatus en Pichia pastoris*) and Grant ID: 00007885 (*Estudio de la estabilidad a tiempo real del concentrado de la lacasa rPOXA 1B de Pleurotus ostreatus producida en Pichia pastoris*) from Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C. Colombia. The financing entity had no role in the study design, data collection or analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. The authors thank María Lucía Gutiérrez, Ph.D., for English editing, and Ángela J. Espejo-Mojica for laboratory support.

Author's contributions RAP-P: Conceived and designed the experiments, analysed the data and wrote the manuscript. LDA-L, EDM-Á and CMR-H: Performed the experiments and analysed the data. AMP-R, BEQ-H. AP-F: Analysed the data and critically reviewed the manuscript. LDA-L, EDM-Á: Wrote the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Admassu H, Zhao W, Yang R, Gasmalla MAA, Zhang W (2015) Recent advances on efficient methods for α -amylase production by solid state fermentation (SSF). *Int J Adv Res* 3(9):1485–1493
2. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:5301–5317. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>
3. Akşit A, van der Klei IJ (2018) Yeast peroxisomes: how are they formed and how do they grow? *Int J Biochem Cell Biol* 105:24–34. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.09.019>
4. Antosová Z, Sychrová H (2016) Yeast Hosts for the production of recombinant laccases: a review. *Mol Biotechnol* 58:93–116. <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9910-1>
5. Ardila-Leal LD, Albarracín-Pardo DA, Rivera-Hoyos CM, Morales ED, Poutou-Piñales RA, Cardozo-Bernal AM, Quevedo-Hidalgo BE, Pedroza-Rodríguez AM, Díaz-Rincón DJ, Rodríguez-Lopez A, Alméciga-Díaz CJ, Cuervo-Patiño CL (2019) Media improvement for 10 L bioreactor production of rPOXA 1B laccase by *P. pastoris*. *3 Biotech* 9(12):Article 447. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1979-y>
6. Ardila-Leal LD, Alvarado-Ramírez MF, Gutierrez-Rojas IS, Poutou-Piñales RA, Quevedo-Hidalgo BE, Pedroza-Rodríguez AM (2020) Low-cost media statistical design for production of rPOXA 1B laccase in *P. pastoris*. *Heliyon* 6(4):e03852. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03852>
7. Azoun SB, Kallel H (2017) Investigating the effect of carbon source on rabies virus glycoprotein production in *Pichia pastoris* by a transcriptomic approach. *Microbiol Open* 6:e489. <https://doi.org/10.1002/mbo3.489>
8. Bertrand B, Martínez-Morales F, Mir T-H (2017) Upgrading laccase production and biochemical properties: strategies and challenges. *Biotechnol Prog* 33(4):1015–1034. <https://doi.org/10.1002/btpr.248>
9. Boer H, Teeri TT, Koivula A (2000) Characterization of *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase Cel7A secreted from *Pichia pastoris* using two different promoters. *Biotechnol Bioeng* 69(5):486–494
10. Boettner M, Steffens C, von Mering C, Bork P, Stahl U, Langa C (2007) Sequence-based factors influencing the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris*—a comparative view on 79 human genes. *J Biotechnol* 130:1–10
11. Burgard J, Valli M, Graf AB, Gasser B, Mattanovich D (2017) Biomarkers allow detection of nutrient limitations and respective supplementation for elimination in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *Microb Cell Fact* 16:117. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0730-9>
12. Campos PA, Levin LN, Wirth SA (2016) Heterologous production, characterization and dye decolorization ability of a novel thermostable laccase isoenzyme from *Trametes trogii* BAFc. *Proc Biochem* 51:895–903. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.03.015>
13. Cereghino JL, Cregg JM (2000) Heterologous Protein Expression in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24:45–66. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>
14. Córdoba H, Algecira N, Poutou RA, Barrera LA (2003) *Pichia pastoris* una Alternativa para la Producción de Glicoproteínas Humanas de Uso Terapéutico. *Estrategias de Fermentación Rev Col Biotechnol* 5(2):73–84
15. Córdoba-Ruiz HA, Poutou-Piñales RA, Echeverri-Peña OY, Algecira-Enciso NA, Landázuri P, Sáenz H, Barrera-Avellaneda LA (2009) Laboratory scale production of the human recombinant iduronate 2-sulfate sulfatase-Like from *Pichia pastoris*. *Afr J Biotechnol* 8(9):1786–1792
16. Cos C, Ramón R, Montesinos JL, Valero F (2006) Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microb Cell Fact* 5:17p. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-17>
17. Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY, Madden KR (1985) *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol* 5(12):3376–3385
18. Demain AL, Davies JE (1996) *Manual of Industrial microbiology and biotechnology*, 2nd edn. American Society of Microbiology Press, Washington, D.C USA
19. Desjardins P, Hansen JB, Allen M (2009) Microvolume protein concentration determination using the NanoDrop

- 2000c spectrophotometer. *J Visual Exp* 33:3p. <https://doi.org/10.3791/1610>
20. Doran PM (2013) *Bioprocess Engineering Principles*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-22348-8>
21. Faraco V, Ercole C, Festa G, Giardina P, Piscitelli A, Sannia G (2008) Heterologous expression of heterodimeric laccase from *Pleurotus ostreatus* in *Kluyveromyces lactis*. *Appl Environ Microbiol* 77:1329–1335
22. Fugthong A, Boonyapakron K, Sornlek W, Tanapongpipat S, Eurwilaichitr L, Pootanakit K (2010) Biochemical characterization and in vitro digestibility assay of *Eupenicillium parvum* (BCC17694) phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Prot Exp Purif* 70:60–67
23. Guan J, Stromhaug PE, George MD, Habibzadegah P, Bevan A, Dunn WA, Klionsky DJ (2001) Cvt18/Gsa12 is required for cytoplasm-to-vacuole transport, pexophagy, and autophagy in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Mol Biol Cell* 12:3821–3838
24. Holzer H (1976) Catabolite inactivation in yeast. *Trends Biochem Sci* 1:176–181
25. Hong F, Meinander NQ, Jönsson LJ (2002) Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* 79(4):438–449
26. Invitrogen (1996a) Multi-copy pichia expression kit. For the isolation and expression of recombinant proteins from *Pichia pastoris* strains containing multiple copies of a particular gene. Invitrogen, California, USA
27. Invitrogen (1996b) Pichia expression kit. Protein expression. A manual of methods for expression of recombinant proteins in *P. pastoris*. Cat. No. K1710-01. Invitrogene, California, USA
28. Jacobs PP, Geysens S, Verweken W, Contreras R, Callewaert N (2008) Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. *Nat Protocols* 4(1):58–70. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.213>
29. Jacobs PP, Ryckaert S, Geysens S, Vusser KD, Callewaert N, Contreras R (2008) Pichia surface display: display of proteins on the surface of glycoengineered *Pichia pastoris* strains. *Biotechnol Lett* 30(12):2173–2181. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9807-1>
30. Jungo C, Marison I, von Stockar U (2007) Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: a quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures. *J Biotechnol* 128:824–837
31. Jungo C, Schenk J, Pasquier M, Marison IW, von Stockar U (2007) A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 131:57–66. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.05.019>
32. Juturu V, Wu JC (2018) Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: latest research progress and applications. *ChemBioChem* 19:7–21. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700460>
33. Kalyani D, Tiwari MK, Li J, Kim SC, Kalia VC, Kang YC, Lee J-K (2015) A highly efficient recombinant laccase from the yeast *Yarrowia lipolytica* and its application in the hydrolysis of biomass. *PLoS ONE* 10(3):e0120156
34. Landázuri P, Poutou-Piñales RA, Acero-Godoy J, Córdoba-Ruiz HA, Echeverri-Peña OY, Sáenz H, Delgado-Boada JM, Barrera-Avellaneda LA (2009) Cloning and shake flask expression of hrlDS-Like in *Pichia pastoris*. *Afr J Biotechnol* 8(12):2871–2877
35. Liu L, Zhang J, Tan Y, Jiang Y, Hua M, Li S, Zhai Q (2014) Rapid decolorization of anthraquinone and triphenylmethane dye using chloroperoxidase: catalytic mechanism, analysis of products and degradation route. *Chem Eng J* 244:9–18
36. Liu W-C, Inwood S, Gong T, Sharma A, Yu L-Y, Zhu P (2019) Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production. *Crit Rev Biotechnol* 39(2):258–271. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1554620>
37. Looser V, Bruhlmann B, Bumbak F, Stenger C, Costa M, Camattari A, Fotiadis D, Kovar K (2015) Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: a review. *Biotechnol Adv* 33(6):1177–1193. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.008>
38. Maeda Y, Kuroki R, Suzuki H, Reilander H (2000) High-level secretion of biologically active recombinant human macrophage inflammatory protein-1a by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Prot Exp Purif* 18(1):56–63
39. Miele A, Giardina P, Notomista E, Piscitelli A, Sannia G, Faraco V (2010) A semi-rational approach to engineering laccase enzymes. *Mol Biotechnol* 46:149–156. <https://doi.org/10.1007/s12033-010-9289-y>
40. Miller G (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31(3):426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
41. Morozova OV, Shumakovich GP, Gorbacheva MA, Shleev SV, Yaropolov AI (2007) “Blue” laccases. *Biochem* 72(10):1136–1150
42. Nelson DL, Cox MM (2017) *Lehninger, principles of biochemistry*, 7th edn. W.H. Freeman and Company, Macmillan Higher Education, New York
43. Patel H, Gupte A, Gupte S (2009) Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a Basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. *BioRes* 4(1):268–284
44. Paulová L, Hyka P, Branská B, Melzoch K, Kovar K (2012) Use of a mixture of glucose and methanol as substrates for the production of recombinant trypsinogen in continuous cultures with *Pichia pastoris* Mut+. *J Biotechnol* 157:180–188. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.10.010>
45. Pedroza-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R (2013) Optimization of C/N ratio and inducers for wastewater paper industry treatment using *Trametes versicolor* immobilized in bubble column reactor. *J Mycol*. <https://doi.org/10.1155/2013/536721>
46. Peña DA, Gasser B, Zanghellini J, Steiger MG, Mattanovich D (2018) Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metabol Eng* 50:2–15. <https://doi.org/10.1016/j.mben.2018.04.017>
47. Pezzella C, Giacobelli VG, Lettera V, Olivieri G, Cicatiello P, Sannia G, Piscitelli A (2017) A step forward in laccase exploitation: recombinant production and evaluation of techno-economic feasibility of the process. *J Biotechnol* 259:175–181. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.022>
48. Pimentel N, Rodríguez-López A, Díaz S, Losada JC, Díaz D, Espejo-Mojica AJ, Ramírez AM, Cardona C, Ruiz F, Poutou-Piñales RA, Córdoba-Ruiz HA, Alméciga-Díaz CJ, Barrera-Avellaneda LA (2018) Production and characterization of a human lysosomal recombinant iduronate-2-sulfatase produced in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Appl Biochem* 65(5):655–664. <https://doi.org/10.1002/bab.1660>
49. Postemsky PD, Bidegain MA, González-Matute R, Figlas ND, Cubitto MA (2017) Pilot-scale bioconversion of rice and sunflower agro-residues into medicinal mushrooms and laccase enzymes through solid-state fermentation with *Ganoderma lucidum*. *Biores Technol* 231:85–93. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.064>
50. Poutou RA, Amador E, Candelario M (1994) Banco de células primario (BCP): Caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes. *Biotecnol Aplic* 11(1):55–59
51. Poutou RA, Quevedo BE, Córdoba H, Sáenz H, Barrera LA (2005) Influencia de la Fuente de Carbono Sobre la Expresión de Proteínas AOX1-reguladas en *Pichia pastoris*. *NOVA* 3(3):75–87
52. Poutou-Piñales RA, Córdoba-Ruiz HA, Barrera-Avellaneda LA, Delgado-Boada JM (2010) Carbon source feeding strategies for

- recombinant protein expression in *Pichia pastoris* and *Pichia methanolica*. Afr J Biotechnol 9(15):2173–2184
53. Ramón R, Ferrer P, Valero F (2007) Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. J Biotechnol 130:39–46. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.02.025>
54. Rice EW (2017) Standard methods for the examination of water and wastewater 2540 A. 23rd edn. Water Environment Federation
55. Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R, Delgado-Boada JM (2013) Fungal laccases. Fung Biol Rev 27(3–4):67–82. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2013.07.001>
56. Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poveda-Cuevas SA, Reyes-Guzmán EA, Poutou-Piñales RA, Reyes-Montaño EA, Pedroza-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R, Cardozo-Bernal AM (2015) Computational analysis and low-scale constitutive expression of laccases synthetic genes *GllCC1* from *Ganoderma lucidum* and *POXA 1B* from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris*. PLoS ONE 10(1):e0116524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116524.g002>
57. Sears IB, O'connor J, Rossanese OW, Glick BS (1998) A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. Yeast 14:783–790
58. Shiraishi K, Oku M, Uchida D, Yurimoto H, Sakai Y (2015) Regulation of nitrate and methylamine metabolism by multiple nitrogen sources in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. FEMS Yeast Res 15(7):fov084. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov084>
59. Siverio JM (2002) Assimilation of nitrate by yeasts. FEMS Microbiol Rev 26(3):277–284. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00615.x>
60. Stasyk OG, Denega IO, Padhorny D, Dmytruk KV, Kozakov D, Abbas C, Stasyk OV (2018) Glucose regulation in the methylotrophic yeast *Hansenula* (Ogataea) *polymorpha* is mediated by a putative transceptor Gcr1. Int J Biochem Cell Biol 103:25–34. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.08.002>
61. Subramani S (1993) Protein import into peroxisomes and biogenesis of the oganelle. Ann Rev Cell Biol 9:445–478
62. Tinoco R, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R (2001) Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. Lett Appl Microbiol 32(5):331–335. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00913.x>
63. Tschopp JF, Brust PF, Cregg JM, Stillman CA, Gingeras TR (1987) Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastons*. Nucl Acid Res 15(9):3859–3876
64. van der Klei IJ, Sulter GJ, Harder W, Veenhuis M (1991) Assembly of alcohol oxidase in the cytosol of a peroxisome-deficient mutant of *Hansenula polymorpha*-properties of the protein and architecture of the crystals. Yeast 7:195–209
65. van der Klei IJ, Yurimoto H, Sakai Y, Veenhuis M (2006) The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. Biochim Biophys Acta 1763:1453–1462
66. Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, Khanna N (2001) Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. J Biotechnol 88:21–35
67. Vedvick TS (1991) Gene expression in yeast: *Pichia pastoris*. Curr Opin Biotechnol 2:742–745
68. Veenhuis M, Zwart K, Harder W (1978) Degradation of peroxisomes after transfer of methanol-grown *Hansenula polymorpha* into glucose-containing media. FEMS Microbiol Lett 3:21–28
69. Waterham HR, Digan MH, Koutz PJ, Lair SV, Cregg JM (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. Gene 186:37–44. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00675-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00675-0)
70. Wriessnegger T, Gübitz G, Leitner E, Ingolic E, Cregg J, de la Cruz BJ, Daum G (2007) Lipid composition of peroxisomes from the yeast *Pichia pastoris* grown on different carbon sources. Biochim Biophys Acta 1771:455–461
71. Wu J, Lin J, Chieng L, Lee C, Hsu T (2003) Combined use of GAP and AOX1 promoter to enhance the expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in *Pichia pastoris*. Enz Microb Technol 33:453–459. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00147-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00147-9)
72. Wu J-M, Chieng L-L, Hsub T-A, Lee C-K (2003) Sequential expression of recombinant proteins and their separate recovery from a *Pichia pastoris* cultivation. Biochem Eng J 3715:1–8. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00017-2](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00017-2)
73. Xie J, Zhang L, Ye Q, Zhou Q, Xin L, Du P, Gan R (2003) Angiostatin production in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* fed with mixed carbon sources. Biotechnol Lett 25:173–177
74. Yang J, Ng TB, Lina J, Ye X (2015) A novel laccase from basidiomycete *Cerrena* sp.: cloning, heterologous expression, and characterization. Int J Biol Macromol 77:344–349
75. Yuan W, Tuttle DL, Shi Y-J, Ralph GS, Dunn WA (1997) Glucose-induced Microautophagy in *Pichia pastoris* Requires the α -subunit of phosphofructokinase. J Cell Sci 110:1935–1945
76. Zhang A-L, Luo J-X, Zhang T-Y, Pan Y-W, Tan Y-H, Fu C-Y, Tu F-z (2009) Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. Mol Biol Rep 36:1611–1619. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9359-4>
77. Zwart KB, Veenhuis M, Harder W (1983) Significance of yeast peroxisomes in the metabolism of choline and ethanolamine. Antonie Van Leeuwenhoek 49(4–5):369–385. <https://doi.org/10.1007/BF00399317>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Capítulo 6. Estudio de estabilidad a tiempo real y acelerada del
concentrado de la lacasa rPOXA 1B correlacionado con
dinámica molecular

Abreviaturas

ABTS:	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico))
AS:	Estabilidad acelerada. <i>Abreviatura en inglés</i> (Accelerate stability)
MCOs:	Oxidasas multicobres azules. <i>Abreviatura en inglés</i> (Multicopper oxidases)
POXA 1B:	Lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i>
rPOXA 1B:	Lacasa recombinante de <i>P. ostreatus</i> expresada en <i>P. pastoris</i>
TNC:	Centro de cobre trinuclear. <i>Abreviatura en inglés</i> (Trinuclear copper enter)
SD:	Desviación estándar. <i>Abreviatura en inglés</i> (standard deviation)
t_{1/2}:	Vida media
k_a:	Constante de desactivación
E_a:	Energía de desactivación
ΔH*:	Cambio en la entalpía de desactivación
ΔG*:	Change in Gibb's free energy of inactivation
ΔS*:	Cambio en la entropía de inactivación
MCPB.py	Generador de parámetros con centros de metal basado en Python <i>Abr. en inglés</i> (Metal center parameter builder based in Python)
MD:	Dinámica molecular. <i>Abreviatura en inglés</i> (Molecular Dynamics)
N:	Tamaño de población
n:	Tamaño de la muestra
NVT:	Conjunto canónico
NPT:	Conjunto isotérmico-isobárico
PCA:	Análisis de componentes principales. <i>Abreviatura en inglés</i> (<i>Principal Component Analysis</i>)
PC:	Componente principal. <i>Abreviatura en inglés</i> (<i>Principal Component</i>)
RTS:	Estabilidad en tiempo real. <i>Abreviatura en inglés</i> Real-time stability
RMS:	Media cuadrática. <i>Abreviatura en inglés</i> (Root mean square)
RMSF:	Fluctuación cuadrática media. <i>Abreviatura en inglés</i> (Root mean square fluctuation)
RMSD:	Desviación cuadrática media. <i>Abreviatura en inglés</i> (Root mean square deviation)
VMD:	Visualizador de dinámica molecular. <i>Abreviatura en inglés</i> (Visual Molecular Dynamics)
V_{max}:	Velocidad máxima
K_M:	Constante de Michaelis-Menten
ps:	Picosegundos
fs:	Femtosegundos
ns:	Nanosegundos

6.1 Introducción

Debido a las múltiples aplicaciones de las lacasas y a la generación de H₂O en lugar de H₂O₂ durante su acción catalítica, se ha convertido en una “herramienta verde”; siendo una enzima promisorio para aplicaciones industriales y ambientales; razón por la cual se requiere aumentar la producción y la disponibilidad comercial (Stanzione *et al.*, 2020). Conocer la estabilidad térmica y las condiciones de almacenamiento de cualquier enzima es de gran importancia para determinar las posibles aplicaciones industriales (Mostafa and Abd El Aty, 2018; Filatova *et al.*, 2019). Sin embargo, debido a que cada enzima tiene estructura propia y que su estabilidad depende en gran medida del entorno químico (pH, fuerza iónica, entre otros), la temperatura y las modificaciones post-traduccionales, el uso como biocatalizador puede ser extendido o limitado (Huynh-Ba, 2009; Christensen and Kepp, 2013); siendo de gran importancia determinar y establecer las condiciones más favorables para su almacenamiento en función de la vida útil de la enzima (Huynh-Ba, 2009), así como la inclusión o no, de preservantes en la formulación final.

Para estudiar las condiciones que favorecen la estabilidad de enzimas y proteínas durante la conservación se ensayan diferentes condiciones (pH, temperatura, concentración de NaCl, presencia de aditivos, preservantes y la concentración de la enzima, entre otros), (Filatova *et al.*, 2019). Evaluar las condiciones de conservación a diferentes temperaturas es importante, ya que al aumentar la temperatura se incrementa la energía cinética, lo que podría ocasionar interrupción de la actividad enzimática y la desnaturalización irreversible de la enzima (Poonkuzhali and Palvannan, 2011); así como, generar cambios dinámicos en la estructura 3D. Estos cambios pueden ser más o menos agresivos con la enzima dependiendo de la termoestabilidad de la misma (Elias *et al.*, 2014).

Los productos biológicos son típicamente inestables, por lo que es habitual conservarlos en frío, pero estas condiciones de almacenamiento no siempre son pertinentes, ya que implican un costo elevado, debido al mantenimiento de la cadena

de frío (Chen *et al.*, 2017). No obstante, la desnaturalización de las enzimas puede ocurrir también en condiciones de frío (Sanfelice and Temussi, 2016). Por esta razón, se sugiere que las recomendaciones de caducidad se basen en los datos de estabilidad, recopilados en tiempo real; sin embargo, las pruebas de estabilidad acelerada son una herramienta complementaria que puede ser aplicada a proteínas o enzimas con diferentes usos (Huynh-Ba, 2009).

Los estudios de estabilidad acelerada de proteínas son normalmente realizados a temperaturas elevadas 40 °C (313.15 K), (Huynh-Ba, 2009) y se utilizan como herramienta para conocer la estabilidad bajo condiciones adversas (Rauk *et al.*, 2014). Una vez estudiado el comportamiento cinético isotérmico de la actividad enzimática, empleando las fórmulas de Arrhenius (Zhang *et al.*, 2020), se puede calcular la energía de activación (E_a) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$); parámetro que ha sido de gran utilidad para estimar la estabilidad de proteínas y enzimas de uso farmacéutico (Huynh-Ba, 2009).

Las predicciones precisas de la estabilidad térmica de las enzimas y proteínas son complejas (Pucci and Rومان, 2017); no obstante, la combinación de los resultados experimentales con análisis computacionales son en conjunto, efectivos para estudiar la estabilidad de una proteína, pues permiten mayor racionalización e interpretación de los resultados experimentales (Papaleo *et al.*, 2006). Las simulaciones de dinámica molecular (MD) se han usado para comprender la estabilidad de las proteínas (Quezada *et al.*, 2017), debido a que explican la relación entre la dinámica y los mecanismos moleculares que las estabilizan (Childers and Daggett, 2017), a través de herramientas que miden la flexibilidad y la correlacionan con la función (Pikkemaat *et al.*, 2002; Papaleo *et al.*, 2006; Quezada *et al.*, 2017) al ser la flexibilidad una propiedad clave en la actividad y la estabilidad proteica (Mohtashami *et al.*, 2019).

Algunos de los análisis de MD hechos en lacasas se han enfocado en evaluar la influencia de las condiciones ambientales y del grado de glicosilación, sobre la estructura, función y dinámica de la enzima (Christensen and Kepp, 2013; Maestre-Reyna *et al.*, 2015) o en

evaluar lacasas modificadas por los investigadores utilizando técnicas de mutagénesis dirigida (Festa *et al.*, 2008; Christensen and Kepp, 2013; Monza *et al.*, 2015).

Los objetivos de este capítulo fueron, *i*) proponer el diseño de un estudio de estabilidad con mayor fundamentación estadística, que permitiera estimar en cada momento de muestreo con la misma precisión y nivel de confianza el promedio de la actividad enzimática ($U L^{-1}$) de la lacasa rPOXA 1B empleando los lotes producidos en biorreactor de 10 L (L1, L3 y L4) en el [Capítulo 4](#) y de esta forma aportar una herramienta para los estudios de estabilidad de otras enzimas y proteínas de uso no farmacéutico (Hartmann and Asch, 2019), *ii*) utilizar esta fundamentación estadística para determinar la estabilidad a tiempo real y acelerada de la enzima recombinante rPOXA 1B de *P. ostreatus*, producida en *P. pastoris* y *iii*) correlacionar la estabilidad a tiempo real con el comportamiento “*in Silico*” de la enzima durante las simulaciones de dinámica molecular.

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Ensayo piloto de estabilidad

Se realizó un ensayo piloto para estimar la variabilidad de la actividad enzimática ($U L^{-1}$) de rPOXA 1B a diferentes temperaturas, para lo cual prepararon 15 viales (tapa de rosca, capacidad de 2 mL, Microtubos BIOLOGIX – polipropileno) con 1 mL de un concentrado de rPOXA 1B con actividad enzimática de $5,877.31 \pm 278.11 U L^{-1}$ ($\sim 164.62 U mg^{-1}$) y se colocaron a temperaturas de -30, 4, 30, 40 y 50 °C, equivalentes a temperaturas absolutas teóricas de 243.15, 277.15, 303.15, 313.15 y 323.15 K, respectivamente. Las temperaturas fueron seleccionadas en función de un estudio previo de estabilidad térmica realizado durante 1 hora de exposición de la enzima (Ardila-Leal *et al.*, 2019). La actividad enzimática ($U L^{-1}$), (Pezzella *et al.*, 2017), fue medida a los 0, 15 y 30 días (cada uno fue considerado un momento de muestreo), para cada una de las temperaturas, el muestreo se realizó de forma aleatoria, utilizando el generador de números aleatorios de Stata V.14. Los resultados del ensayo piloto se utilizaron para definir el tamaño de la población de viales (N) y a partir de ésta se calculó el tamaño de las muestras (n) para cada uno de los momentos de muestreo. Las varianzas estimadas en el estudio piloto fueron utilizadas para estimar la variabilidad del proceso y suponiendo su homogeneidad, se estimó la varianza combinada mediante un estadístico semejante al utilizado para estimar la varianza en el caso de la prueba t para varianzas iguales.

6.2.2 Concentración del sobrenadante de rPOXA 1B producido en biorreactor de 10 L

Se utilizaron los sobrenadantes con rPOXA 1B de los lotes L1, L3 y L4 producido en bioreactor de 10 L (Capítulo 4). El sobrenadante de los cultivos fue centrifugado a 8000 $\times g$ y filtrado con papel Whatman No. 3, luego se filtró a través de una cápsula de membrana doble heterogénea Sartopore 2 de $0.45 \mu m + 0.2 \mu m$ (Sartorius). El filtrado fue ultrafiltrado, utilizando casetes de flujo cruzado de 100,000 y 10,000 mwco (Sartorius) y el concentrado conservado a 4 °C. Antes y después de cada paso de concentración se midió, el volumen (mL), el pH, la actividad enzimática ($U L^{-1}$), la

concentración de proteínas (mg mL^{-1}) y se calculó la actividad específica (U mg^{-1}). (Ardila-Leal et al., 2019). La concentración final de cada lote concentrado (libre de preservantes) fue L1: $27,222.2 \text{ U L}^{-1}$; L3: $37,222.2 \text{ U L}^{-1}$ and L4: $34,236.1 \text{ U L}^{-1}$. Cada lote fue diluido con agua destilada estéril para igualar la actividad enzimática inicial del estudio de estabilidad que fue $16,575.50 \pm 268.92 \text{ U L}^{-1}$ ($758.71 \pm 180.18 \text{ U mg}^{-1}$), (momento cero del estudio).

6.2.3 Diseño y condiciones del estudio de estabilidad de rPOXA 1B

En función de los resultados del ensayo piloto de estabilidad, fueron consideradas cinco temperaturas teóricas ($-30, 4, 25, 30, 35$ y $40 \text{ }^\circ\text{C}$), [243.15 K (almacenado en freezer), 277.15 K (almacenado en nevera), $298.15, 303.15, 308.15$ y 313.15 K (almacenados en incubadoras independientes)]. En cada uno de los equipos de incubación se dispuso de un termohigrómetro y se realizó el seguimiento diario de la temperatura y la humedad, excepto para $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ (243.15 K) y $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (277.15 K), donde la humedad no fue monitoreada. Los valores de temperatura obtenidos $^\circ\text{C}$ a lo largo del estudio fueron transformados a K y promediados al final del estudio para calcular la desviación estándar (SD) de cada temperatura durante el tiempo de estudio (1 año), la humedad relativa promedio fue calculada al final del estudio como el promedio \pm SD de las mediciones diarias. El tiempo y la frecuencia de muestreo proyectado fue de un año con periodicidad mensual (30 días calendario) hasta completar los primeros 6 meses y luego cada dos meses (60 días calendario) hasta completar los 12 meses proyectados. Sin embargo, el número de muestreos por temperatura fue manejado según la pérdida de actividad enzimática; se estableció como límite de muestreo la pérdida de $\sim 75 \%$ de la actividad enzimática relativa. No obstante, cuando la pérdida de actividad límite fue superada antes de culminar el tiempo de estudio, se estableció un mínimo de 5 momentos de muestreo (siempre que fue posible).

Para la estimación del promedio de la actividad enzimática (U L^{-1}), en los diferentes momentos de muestreo para cada una de las temperaturas, se diseñó un esquema de muestreo estratificado. Para cada temperatura se construyó una población inicial (momento 0) constituida por 3 lotes (L1, L3 y L4) con la misma cantidad de viales. Los

viales de cada lote se organizaron en dos cajas de crioconservación cuadradas (10 x10 viales). Cada lote (L1, L3, L4) fue distribuido a razón de 1 mL de concentrado en viales con tapa de rosca y capacidad de 2 mL (BIOLOGIX- polipropileno). Cada uno de los tres lotes construidos constituyeron estratos de selección en cada uno de los momentos de muestreo.

Para la determinación del tamaño de la población (N) se programó una hoja de cálculo de Excel en la que se prorrataron los posibles tamaños de población para la estimación del valor medio en el muestreo estratificado con afijación proporcional, utilizando diferentes niveles de precisión y de confiabilidad y considerando los costos de los diseños a los que ellos conducirían (Lohr, 2019). Como resultado se obtuvo una estructura de población en la que su tamaño, dividido por igual entre los tres estratos, permitió estimar, en cada uno de los momentos de muestreo (tiempo), el valor medio de la actividad enzimática ($U L^{-1}$) de rPOXA 1B con una precisión de 21.8 ($U L^{-1}$) y una confiabilidad del 95 %.

En correspondencia con el diseño de muestreo estratificado, en cada uno de los intervalos de tiempo de muestreo, se tomó una muestra aleatoria simple en cada uno de los lotes con la que se estimó el valor promedio de la actividad enzimática ($U L^{-1}$) de rPOXA 1B y su correspondiente intervalo de confianza (CI). Para las estimaciones, se utilizaron los fundamentos del muestreo probabilístico estratificado con afijación proporcional (Lohr, 2019).

Los viales muestreados en cada momento del estudio de estabilidad fueron utilizados para determinar (individualmente) la actividad enzimática ($U L^{-1}$) y luego las muestras del mismo momento y la misma temperatura, se mezclaron para determinar por triplicado la V_{max} y la K_M aparentes, con su respectivo análisis de varianza (ANOVA), empleando el software SPSS 19. Se utilizó un nivel de significancia de 0.05 para conocer las diferencias significativas entre los valores de V_{max} y K_M en el rango de temperatura ensayado.

6.2.4 Estabilidad a tiempo real del concentrado de rPOXA 1B

La estabilidad a tiempo real se determinó, graficando las isotermas de las actividades enzimáticas promedio \pm CI, de las mediciones reportadas en cada momento de muestreo, para lo cual se utilizó el software SigmaPlot V11.0. La actividad enzimática relativa se calculó como el porcentaje de actividad recuperada en cada momento de muestreo en comparación con el 100 % de la actividad enzimática volumétrica inicial

6.2.5 Análisis de estabilidad acelerada y parámetros termodinámicos de rPOXA 1B

La constante de desactivación (k_d) fue calculada a partir de la pendiente del gráfico $\ln(E/E_o)$ en función del tiempo (meses), basados en el análisis de la cinética de orden 1 de la actividad enzimática ($U L^{-1}$) para cada una de las isotermas (243.15, 277.15, 298.15, 303.15, 308.15 y 313.15 K), donde, (E_o) es la actividad enzimática inicial ($U L^{-1}$) y (E) la actividad enzimática promedió en cada momento de muestreo ($U L^{-1}$). La energía de desactivación (E_d) fue calculada graficando el $\ln(k_d)$ obtenido para cada isoterma versus el inverso de la temperatura ($1/T$) en K, usando la ecuación de Arrhenius [Ecuación 1].

La vida media ($t_{1/2}$) de la enzima está definida como el tiempo requerido para que la enzima pierda la mitad de su actividad inicial (Zhang et al., 2020) y fue calculada a partir de la [Ecuación 2].

Los parámetros termodinámicos ΔH^* (cambio en la entalpia de desactivación), [Ecuación 3], ΔG^* (cambio de la energía libre Gibbs de inactivación), [Ecuación 4] y ΔS^* (cambio en la entropía de desactivación), [Ecuación 5] para la inactivación irreversible fueron calculados con las ecuaciones correspondientes.

$$\ln(K_d) = \ln(A) - \frac{E_d}{RT} \quad \text{[Ecuación 1]}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad \text{[Ecuación 2]}$$

$$\Delta H^* = E_d - RT \text{ [Ecuación 3]}$$

$$\Delta G^* = -RT \ln\left(\frac{k_d h}{k_b T}\right) \text{ [Ecuación 4]}$$

$$\Delta S^* = \frac{(\Delta H - \Delta G)}{T} \text{ [Ecuación 5]}$$

Donde: k_d es la constante de velocidad de desactivación, A es el factor de frecuencia, E_d es la energía de desactivación, R es la constante de los gases ideales ($8.314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) y T es la temperatura absoluta (Kelvin), (Melikoglu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2020), h es la constante de Plank ($6.626 \times 10^{-34} \text{ J s}$) y k_b es la constante de Boltzmann ($1.38 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$), (Melikoglu *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2014).

6.2.6 Determinación de la actividad lacasa

La medición de la actividad lacasa se realizó utilizando el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) como sustrato. En una cubeta de espectrofotómetro se agregaron 100 μL de ABTS 20 mM, de 2 a 20 μL de sobrenadante centrifugado a temperatura ambiente (este volumen varió dependiendo de la actividad de la enzima en la muestra) y se completó el volumen hasta 1 mL con tampón citrato de sodio 0.1 M (pH 3.0 ± 0.2). El cambio de absorbancia fue monitoreado durante 1 min a 420 nm como resultado de la oxidación del ABTS (Capítulo 3). La unidad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima capaz de transformar 1 μmol de sustrato (ABTS) por minuto, por litro y fue calculado por la siguiente ecuación [Ecuación 6].

$$UL^{-1} = \frac{(\Delta E \times V_t)}{(\varepsilon \times d \times V_s)} \text{ [Ecuación 6]}$$

Donde: ΔE corresponde a la diferencia entre la absorbancia final e inicial después de 1 minuto de reacción, V_t se refiere al volumen total de la reacción (mL), ε corresponde al

coeficiente de extinción molar del ABTS ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 420 nm, d es la longitud de la cubeta en cm y V_s es el volumen de la muestra contenida en la reacción (mL).

6.2.7 Constantes cinéticas enzimáticas aparentes

El concentrado enzimático usado en la cinética enzimática se obtuvo a partir del pool de los concentrados de los viales seleccionados (n) de cada temperatura, lote (L1, L3 y L4) y momento de muestreo. Las constantes cinéticas enzimáticas aparentes del concentrado fueron evaluadas usando ABTS como sustrato en un rango de concentración de 0.1-3 mM, en tampón citrato 0.1 M, pH 3.0 ± 0.2 . En todos los ensayos fue usado concentrado enzimático a una actividad de 10 U L^{-1} a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (Morales-Álvarez *et al.*, 2017). Después de ajustar la hipérbola con Michaelis-Menten [Ecuación 7], fue calculada la K_M y V_{max} aparentes siguiendo el método de linealización de Hane-Wolf [Ecuación 8], (Nelson and Cox, 2017) con la ayuda del software SIMFIT (V7.6.8) (Burquillo *et al.*, 2003). Todos los ensayos cinéticos fueron realizados por duplicado.

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{[Ecuación 7]}$$

$$\frac{[S]}{V_0} = \frac{[S]}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \quad \text{[Ecuación 8]}$$

Donde: V_0 es la velocidad inicial, V_{max} es la tasa máxima de reacción, K_M es la constante de Michaelis y $[S]$ es la concentración del sustrato.

6.2.8 Simulaciones de Dinámica Molecular de POXA 1B a diferentes temperaturas

Para las simulaciones de MD se empleó el modelo de POXA 1B y la parametrización de los cobres del centro activo obtenidos en el Capítulo 3, los archivos de topología y las coordenadas del sistema fueron preparados usando el programa tleap. El sistema fue inmerso en una caja de aguas rectangular TIP3P y fue usado el campo de fuerza ff14SB para modelar todos los residuos de aminoácidos (Maier *et al.*, 2015). Con el objetivo de comparar la estabilidad de la enzima a diferentes temperaturas se definieron 4 temperaturas de estudio muy cercanas a las temperaturas evaluadas en la estabilidad

a tiempo real [241 K (-32 °C); 278 K (5 °C); 298 K (25 °C) y 314 K (41°C)]. Se realizó una minimización inicial de energía, utilizando 50000 pasos del algoritmo de descenso más pronunciado seguido de 10000 pasos de gradientes conjugados. El sistema minimizado se calentó gradualmente en cuatro etapas de 0 a 241 K (etapa 1), de 241 a 278 K (etapa 2), de 278 a 298 K (etapa 3) y de 298 a 314 K (etapa 4); utilizando un conjunto canónico (NVT) y el termostato Langevin con una frecuencia de colisión de 2.0 ps^{-1} y un tamaño de paso de 2 fs para la integración de las ecuaciones de Newton.

Con los resultados obtenidos en cada una de las etapas de calentamiento se evaluaron varias etapas de la MD; simulación de densidad, equilibrio y producción de 400 ps, 4 ns y 200 ns, respectivamente, utilizando para ello un ensamblaje isotérmico-isobárico (NPT), con restricciones en la longitud de los enlaces de hidrógeno (SHAKE). Finalmente, durante la producción se tomaron instantáneas cada 0.2 ns, para un total de 1000 fotos. Las trayectorias obtenidas de cada temperatura se utilizaron para el análisis de fluctuaciones en CPPTRAJ ([Roe and Cheatham III, 2013](#); [Acosta-Tapia *et al.*, 2020](#)).

6.2.9 Análisis de Componentes Principales

El análisis de componentes principales (PCA) se realizó según metodología previamente propuesta ([Galindo-Murillo *et al.*, 2014](#)) para evaluar los movimientos de la cadena principal del sistema en las cuatro temperaturas estudiadas. A partir de los archivos de topología y trayectoria obtenidos en MD se construyó la matriz de covarianza. La raíz cuadrada media (RMS) se ajustó para eliminar el movimiento rotacional/traslacional y preservar la dinámica interna, a excepción de los átomos de hidrógeno. Se tomaron los cinco primeros componentes principales correspondientes a los primeros vectores propios de la matriz de covarianza. Las representaciones estructurales de los diferentes modos se construyeron en CPPTRAJ y se visualizaron en Visual Molecular Dynamics (VMD). Adicionalmente, para el PCA se construyó como una superposición de los átomos de C α en las trayectorias MD utilizando el paquete Bio3D de R ([Grant *et al.*, 2006](#)). A partir del cual se evaluó la contribución de cada residuo a los cinco primeros componentes principales ([Acosta-Tapia *et al.*, 2020](#)).

6.3 Resultados

6.3.1 Ensayo Piloto De Estabilidad

El ensayo piloto de estabilidad mostró que a medida que aumentó la temperatura, la actividad enzimática relativa disminuyó. Entre 243.15 K (-30 °C) y 277.15 K (4 °C) hubo variaciones leves de la actividad enzimática a los 30 días y a 303.15 K (30 °C) la actividad enzimática relativa se mantuvo (~85 %); mientras que 313.15 K (40 °C) y 323.15 K (50 °C) fueron temperaturas desestabilizantes para el sistema, disminuyendo considerablemente la actividad enzimática (Tabla 6.1).

Tabla 6.1 Porcentaje de actividad relativa de rPOXA 1B conservadas durante 30 días en las cinco temperaturas teóricas de estudio.

Temperatura °C	Temperatura K	Tiempo (días)	
		15	30
		Actividad relativa %	
-30	243.15	95.38	96.74
4	277.15	88.50	95.36
30	303.15	84.76	85.59
40	313.15	74.05	61.30
50	323.15	25.96	13.39

Suponiendo que las varianzas en cada temperatura son iguales, se utilizó el estimador combinado de la varianza (estimador que se utiliza habitualmente en las pruebas paramétricas), para obtener una estimación de la variabilidad de la actividad enzimática; obteniéndose una estimación de 96.6 para la desviación estándar de las U L⁻¹ de rPOXA 1B.

6.3.2 Concentración del sobrenadante de rPOXA 1B producido en biorreactor de 10 L

La Figura 6.1 muestra los resultados promedio del proceso de concentración de L1, L3 y L4 de rPOXA 1B producidos en Biorreactor de 10 L (Ardila-Leal et al., 2019).

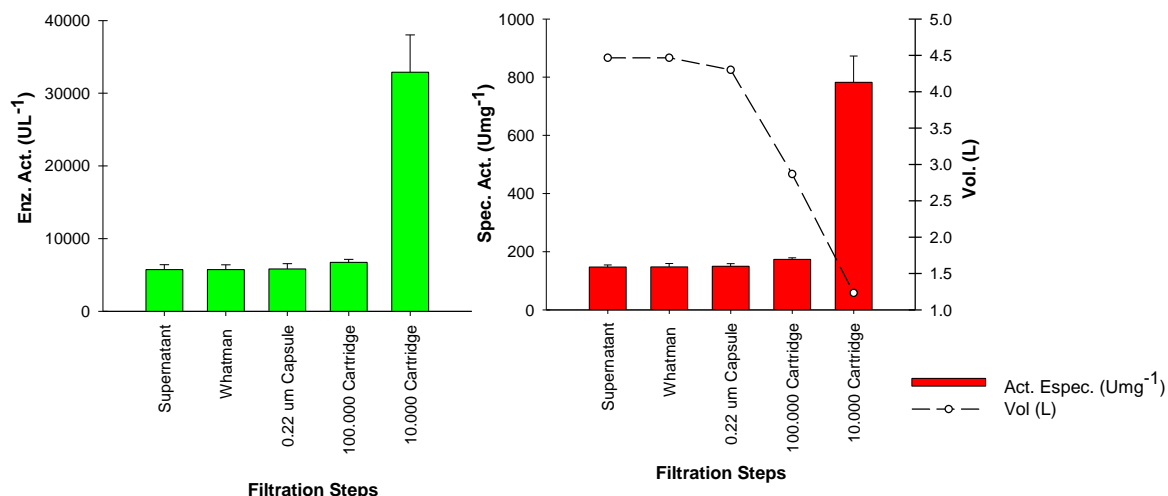


Figura 6.1 Concentración de los lotes L1, L3 y L4 de rPOXA 1B, actividad enzimática promedio ($UL^{-1} \pm SD$), actividad específica promedio ($Umg^{-1} \pm SD$) y variación de volumen (L) durante los pasos de concentración.

6.3.3 Estabilidad a tiempo real del concentrado de rPOXA 1B

La [Tabla 6.2](#) muestra el tamaño de la población (N) y los tamaños de muestra (n), al inicio del estudio (mes 0) y en cada uno de los momentos de muestreo (meses). Para las temperaturas teóricas de -30 y 4 °C se obtuvieron promedios de 240.98 ± 5.38 K (-32.55 ± 4.12 °C) y 277.40 ± 1.32 K (4.32 ± 1.22 °C) y se completaron los 12 meses de muestreo. Para las temperaturas teóricas de 25 , 30 , 35 y 40 °C se obtuvieron promedios de 297.53 ± 3.88 K (24.99 ± 0.25 °C), 303.27 ± 1.11 K (30.12 ± 1.11 °C), 309.58 ± 0.23 K (36.43 ± 0.23 °C) y 314.79 ± 0.52 K (41.64 ± 0.52 °C).

Tabla 6.2 Distribución del muestreo realizado para cada lote y momento de muestreo.

Mes	Momento de muestreo	<i>N</i>	<i>n</i>
1	1	200	16
2	2	184	16
3	3	168	16
4	4	152	16
5	5	136	16
6	6	120	15
8	7	105	15
10	8	90	15
12	9	75	14

N: tamaño de la población, *n*: tamaño de muestra

En la Figura 6.2, se observa la actividad enzimática relativa \pm el intervalo de confianza y en la Tabla 6.3 la actividad específica (U mg^{-1}) \pm el intervalo de confianza (CI), de rPOXA 1B en función del tiempo de exposición a las diferentes temperaturas de estudio. A 240.98 ± 5.38 K se observó que la actividad se mantuvo constante durante los 12 meses de estudio. La temperatura de 277.40 ± 1.32 K mostró un ligero aumento en los porcentajes de actividad enzimática después del sexto mes de muestreo. Las temperaturas de 297.53 ± 3.88 , 303.27 ± 1.11 y 309.58 ± 0.23 K mostraron una disminución gradual de la actividad enzimática a medida que aumentó la temperatura, manteniendo una actividad residual hasta el último momento de muestreo de 75.23, 46.09 y 5.81 %, respectivamente. A 314.79 ± 0.52 K se observó una pérdida alta de la actividad enzimática relativa en el primer mes de muestreo, con una actividad enzimática residual de 4.83 % (Figura 6.2, Tabla 3).

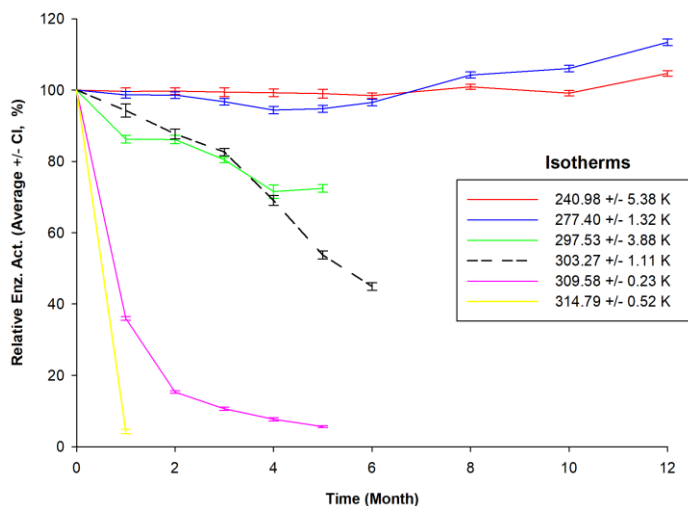


Figura 6.2 Estudio de estabilidad a tiempo real de rPOXA 1B. Se presentan las isothermas de la actividad enzimática relativa % \pm CI (intervalo de confianza) promedio de los lotes L1, L3 y L4 vs., tiempo en meses de cada temperatura ensayada.

Tabla 6.3. Actividad específica ($U\ mg^{-1} \pm CI$) durante los meses de muestreo.

Temperatura K	240.98 \pm 5.38	277.40 \pm 1.32	297.53 \pm 3.88	303.27 \pm 1.11	309.58 \pm 0.23
Temperatura $^{\circ}C$	-32.55 \pm 4.12	4.32 \pm 1.22	24.99 \pm 0.25	30.12 \pm 1.11	36.43 \pm 0.23
Tiempo (meses)	Actividad específica $U\ mg^{-1} \pm CI$				
1	758.92 \pm 8.90	857.23 \pm 10.09	745.57 \pm 12.32	759.46 \pm 16.71	236.74 \pm 4.07
2	763.62 \pm 7.75	872.88 \pm 9.77	737.70 \pm 12.11	679.41 \pm 11.49	116.74 \pm 2.71
3	752.30 \pm 9.54	863.89 \pm 9.64	663.10 \pm 11.70	627.46 \pm 10.27	76.87 \pm 3.09
4	758.06 \pm 9.03	860.29 \pm 10.13	587.68 \pm 14.01	520.02 \pm 10.29	54.15 \pm 2.86
5	754.66 \pm 9.95	878.27 \pm 9.78	567.65 \pm 13.30	395.92 \pm 9.83	37.65 \pm 1.99
6	763.25 \pm 6.38	884.82 \pm 10.15	563.05 \pm 0.0		
8	787.08 \pm 6.27	959.30 \pm 10.84			
10	759.43 \pm 6.30	997.01 \pm 13.22			
12	934.81 \pm 9.70	1045.58 \pm 15.31			

6.3.4 Análisis de estabilidad acelerada y parámetros termodinámicos de rPOXA 1B

Los cálculos de estabilidad acelerada fueron obtenidos en función del tiempo y de la desactivación de rPOXA1B utilizando las diferentes temperaturas de exposición. La cinética de desactivación de primer orden arrojó la constante de desactivación

enzimática (k_d), (Figura 6.3, Table 6.4) con R^2 entre 0.9710 y 0.8810. La vida media ($t_{1/2}$) y la energía de desactivación (E_d), (Figura 6.3, Table 6.4) se calcularon a partir del k_d obtenido en las diferentes temperaturas.

En la Table 6.4, se observan los parámetros termodinámicos para identificar la estabilidad de rPOXA 1B. ΔH^* disminuyó a medida que aumentó la temperatura, ΔG^* mostró valores altos y positivos, mientras que ΔS^* mostró valores negativos.

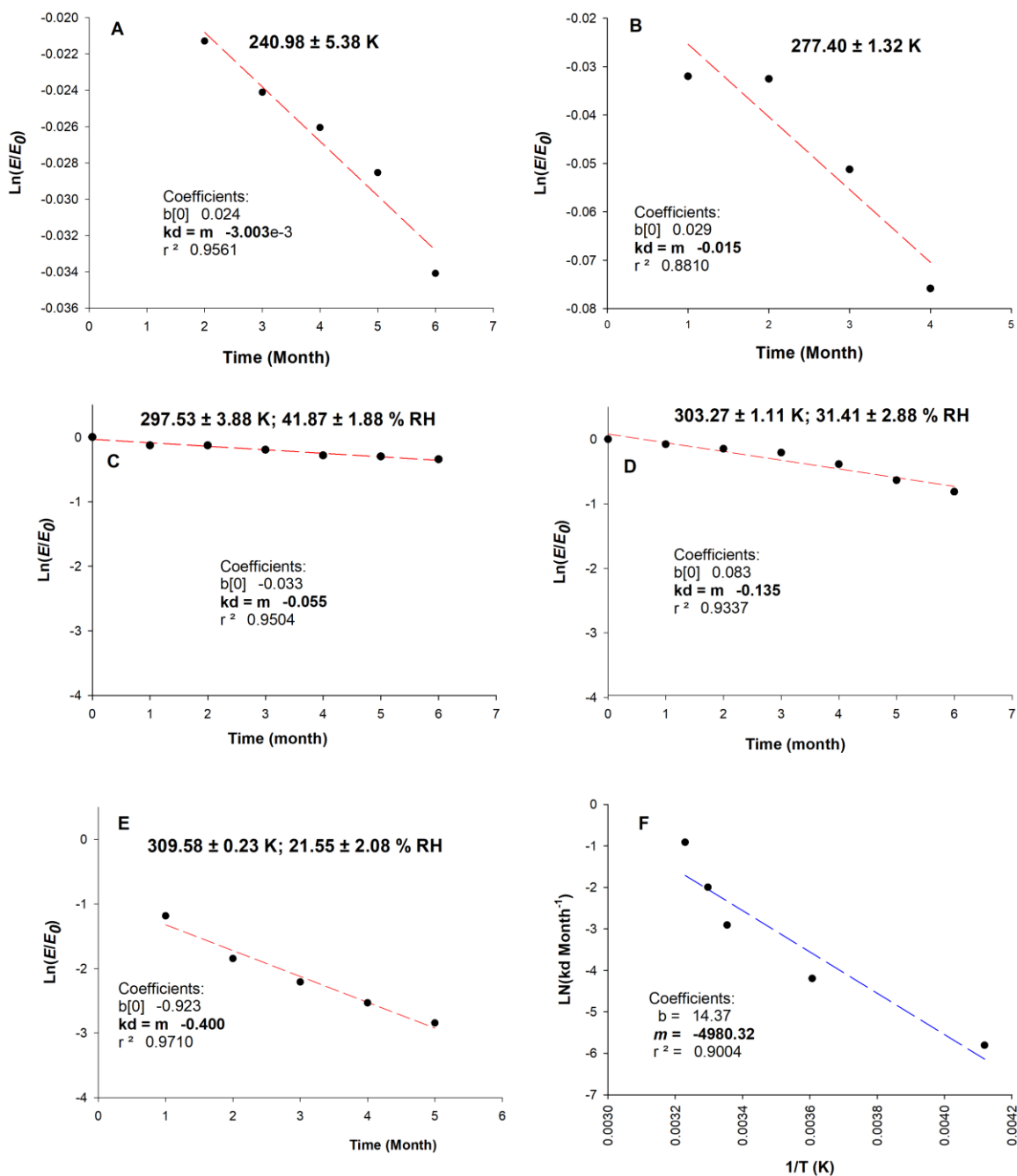


Figura 6.3 Cálculo gráfico de la energía de desactivación (K_d) y la E_d . Cinética de desactivación de primer orden de la rPOXA 1B a diferentes temperaturas **A**: $240.98 \pm 5.38 \text{ K}$ ($-32.55 \pm 4.12 \text{ }^\circ\text{C}$), **B**: $277.40 \pm 1.32 \text{ K}$ ($4.32 \pm 1.22 \text{ }^\circ\text{C}$), **C**: $297.53 \pm 3.88 \text{ K}$ ($24.99 \pm 0.25 \text{ }^\circ\text{C}$), **D**: $303.27 \pm 1.11 \text{ K}$ ($30.12 \pm 1.11 \text{ }^\circ\text{C}$), **E**: $309.58 \pm 0.23 \text{ K}$ ($36.43 \pm 0.23 \text{ }^\circ\text{C}$) y **F**: gráfico de Arrhenius para determinar la energía de activación.

Tabla 6.4 Parámetros termodinámicos para el concentrado de rPOXA 1B (enzima sin purificar), calculados durante la desactivación térmica en las temperaturas de estudio

Parámetro termodinámico	Temperatura K				
	240.98 ± 5.38	277.40 ± 1.32	297.53 ± 3.88	303.27 ± 1.11	309.58 ± 0.23
	Temperatura °C				
	-32.55 ± 4.12	4.32 ± 1.22	24.99 ± 0.25	30.12 ± 1.11	36.43 ± 0.23
K_d (meses ⁻¹)	3 x 10 ⁻³	0.015	0.055	0.135	0.400
$t_{1/2}$ (meses)	230.8	46.2	12.6	5.1	1.7
E_a (kJ mol ⁻¹)	41.40				
ΔH^* (kJ mol ⁻¹)	39.40	39.10	38.93	38.88	38.83
ΔG^* (kJ mol ⁻¹)	70.23	77.46	80.04	79.37	78.28
ΔS^* (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	-127.94	-138.30	-138.17	-133.50	-127.42

6.3.5 Efecto de la exposición a diferentes temperaturas sobre V_{max} y K_M (Aparentes)

En la [Table 6.5](#), se observan las variaciones de V_{max} y K_M (aparentes). La V_{max} para las enzimas en las diferentes temperaturas demostró que entre 240.98 ± 5.38 y 297.53 ± 3.88 K no hubo variación, mientras que en las temperaturas más elevadas disminuyó (309.58 ± 0.23 y 314.79 ± 0.52 K). La variación de K_M estuvo asociada con la temperatura de exposición; generando un aumento a medida que aumentó la temperatura de exposición. En ambos análisis las diferencias entre las temperaturas fueron significativas ([Table 6.5](#)).

Tabla 6.5 Variación promedio de V_{max} y K_M (aparentes) durante el estudio a las diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Temperatura (K)	Tiempo (meses)	Número total de mezclas	$V_{max} \pm SD$ (mM min ⁻¹)	p -valor V_{max}	$K_M \pm SD$ (mM)	p -valor K_M
-32.55 ± 4.12	240.98 ± 5.38	12	27	0.011 ± 0.001 ^b	0.0010	0.047 ± 0.011	0.0150
4.32 ± 1.22	277.40 ± 1.32	12	27	0.011 ± 0.001 ^b		0.050 ± 0.015	
24.99 ± 0.25	297.53 ± 3.88	5	15	0.011 ± 0.001 ^b		0.051 ± 0.014	
30.12 ± 1.11	303.27 ± 1.11	6	18	0.012 ± 0.003 ^b		0.054 ± 0.015	
36.43 ± 0.23	309.58 ± 0.23	5	15	0.009 ± 0.001 ^a		0.077 ± 0.061	
41.64 ± 0.52	314.79 ± 0.52	1	3	0.009 ± 0.001 ^a		0.085 ± 0.074	

^{a, b}: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas en la comparación de medias. Como la prueba de homogeneidad de varianzas para los valores de K_M fue significativo, no se realizó la comparación de media.

6.3.6 Simulaciones de dinámica molecular y análisis de PCA

Las simulaciones MD se realizaron para evaluar el efecto de las temperaturas (241 K [-32 °C], 278 K [5 °C], 298 [25 °C] K y 314 K [41 °C]) sobre la enzima. La estabilidad del sistema simulado a las diferentes temperaturas se evaluó calculando la desviación cuadrática media (RMSD) durante el tiempo de simulación y se encontró que la estabilidad conformacional de los sistemas se mantuvo durante la simulación, ya que en ninguna de las temperaturas evaluadas la desviación superó los 2 Å ([Material suplementario MS 6.1](#)). Se observó que las desviaciones aumentaron en la medida que se incrementó la temperatura de la simulación, por lo que las desviaciones más altas correspondieron a la simulación a 314 K (40.85 °C), ([Material suplementario MS 6.1](#)).

Los cambios estructurales responsables de la desestabilización del sistema se determinaron calculando el promedio de las fluctuaciones cuadráticas media (RMSF) en cada una de las temperaturas de simulación. Durante la simulación de MD se analizó la fluctuación de cada residuo (RMSF), ([Material suplementario MS 6.2](#)) y la comparación por residuo entre las diferentes temperaturas (278-241 K, 298-241 K y 314-241 K), ([Figura 6.4 A](#)) para obtener el Δ RMSF; lo que facilitó la identificación para conocer la contribución de las regiones y/o residuos en las fluctuaciones, en función de la temperatura de simulación. En la [Figure 6.4 A](#) para los Δ RMSF a 278, 298 y 314 K se observan dos picos negativos correspondientes a los aminoácidos LYS³⁰⁹ y ALA³⁶³ ([esferas violetas - Figure 6.4C](#)) que indican que la fluctuación fue menor en comparación con la temperatura de 241 K. Adicionalmente, en Δ RMSF 298 K se observó un pico negativo adicional correspondiente al residuo SER⁴¹². Por otra parte, se observó que el número de residuos con mayores fluctuaciones aumentó con el incremento de la temperatura.

En las [Figures 6.4A y C](#) para el Δ RMSF 278 K se observó que los residuos LEU¹⁵⁹, ALA³⁹¹ y ASP⁴²⁹ ([esfera amarilla - Figure 6.4 C](#)) presentaron las mayores fluctuaciones; los residuos próximos a LEU¹⁵⁹ y ASP⁴²⁹ generaron regiones fluctuantes. En las [Figuras 6.4 A y C](#) para el Δ RMSF 298 K los residuos con fluctuaciones altas fueron THR¹⁶⁰, ASP²⁶⁶,

GLU²⁹³, ALA³³⁴, ASP³⁴¹ y LEU⁴⁵⁹ (esfera amarilla – Figura 6.4C) y sólo los aminoácidos próximos a la ALA³³⁴ conformaron una región fluctuante (región amarilla - Figura 6.4C). En las Figuras 6.4 A y C para el Δ RMSF 314 K los residuos con fluctuación alta aumentaron; siendo ASP¹⁰¹, THR¹⁶⁰, GLY²⁶⁵, ASN²⁹⁷, ALA³³⁴, GLY³⁷⁰, ALA³⁹¹, PRO³⁹³ y ASP⁴³³ los de mayor fluctuación (esfera amarilla – Figure 6.4 C), así mismo, los residuos cercanos a la THR¹⁶⁰, ASN²⁹⁷, ALA³³⁴ y ASP⁴³³ generaron regiones fluctuantes (esfera amarilla - Figure 6.4 C).

Los residuos y las regiones con Δ RMSF que aumentaron la fluctuación en forma progresiva conforme al aumento de la temperatura, fueron identificados como ASP²⁶⁶ con su región próxima entre SER²⁶⁴ - PHE²⁶⁹ y ASN²⁹⁷ con su región próxima entre GLN²⁹³ - PRO²⁹⁸. El cálculo de la desviación estándar entre los Δ RMSF mostró que los residuos con desviaciones estándar mayores a 0.5 Å (punto de corte) correspondían a los mismos residuos previamente identificados e incluía adicionalmente los residuos ALA³⁹¹ y PRO³⁹³.

El RMSF y el análisis de componentes principales (PCA) soportan la contribución de los residuos a la variación de las fluctuaciones atómicas del sistema. El PCA se realizó utilizando la covarianza de posición de C α para describir los movimientos globales de rPOXA 1B en las diferentes temperaturas empleando los primeros componentes principales (PC).

En la Figura 6.4 B se observan los Δ PC1 para 278-241 K, 298-241 K y 314-241 K (Material suplementario MS 6.3); el cual incluyó residuos y regiones observadas previamente en el Δ RMSF. Los residuos incluidos fueron, para Δ PC1 278 K, el residuo ALA³⁹¹ y las regiones PRO¹⁵⁵ - THR¹⁶⁰ y THR³⁶⁰ - ASP³⁶⁵; para Δ PC1 298 K, el residuo ASP²⁶⁶ y las regiones ALA³³⁰ - ALA³³⁴, THR³⁶⁰ - ASP³⁶⁵ y ASP⁴⁵⁸ - GLY⁴⁶⁰ y para Δ PC1 314 K los residuos GLU¹⁰¹, THR¹⁶⁰, PRO³⁹³, ASP⁴³³ y las regiones ASN²⁶³ - PRO²⁶⁷, GLN²⁹³ - PRO²⁹⁸, THR³⁶⁰ - ASP³⁶⁵. El PC1 representó 15.4, 15.9, 11.8 y 18.6 % de proporción de varianza para 241 K (-32 °C), 278 K (5 °C), 298 K (25 °C) y 314 K (41 °C), respectivamente.

Δ PC2 y Δ PC3 (Material suplementario MS 6.4) incluyeron los residuos faltantes que mostraron fluctuación en el Δ RMSF y que no estaban representados en el PC1. Los primeros 5 componentes representaron aproximadamente el 41 % de las variaciones a 241 K (-32.15 °C), 278 K (4.85 °C) y 314 K (40.85 °C) y ~ 36 % de las variaciones a 298 K (24.85 °C) (Material suplementario MS 6.5).

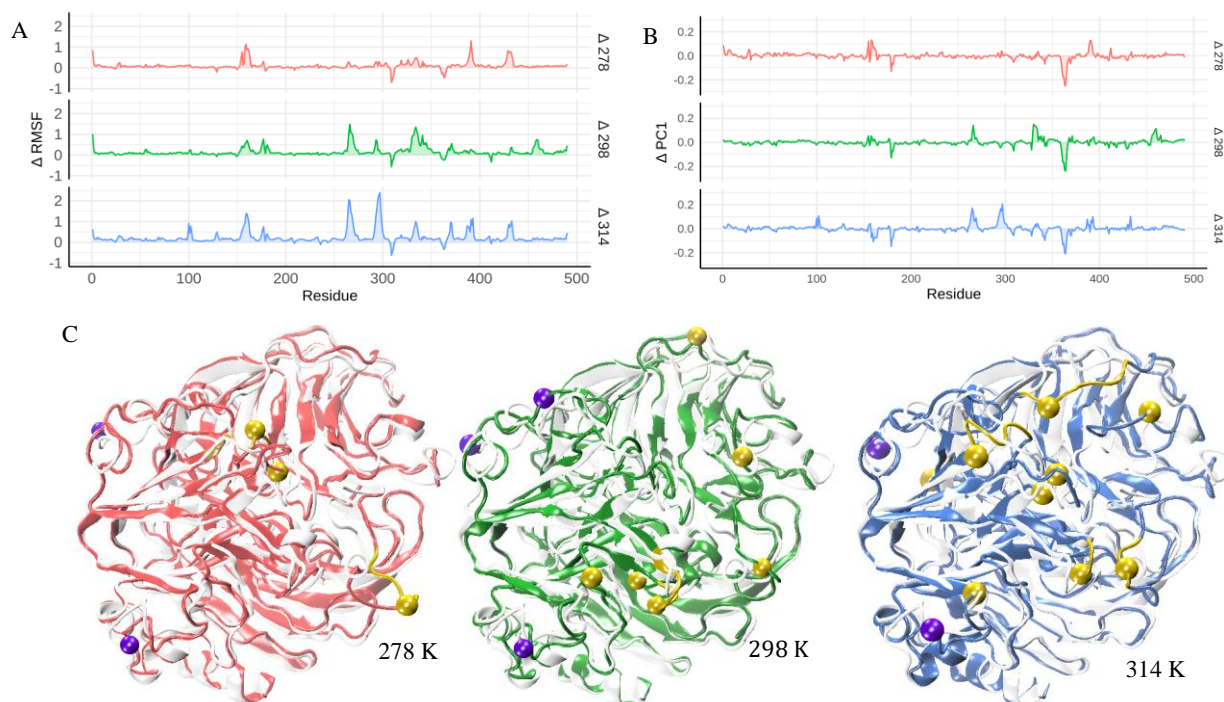


Figura 6.4 Efecto de la temperatura en la simulación de MD de POXA 1B obtenida con la diferencia del promedio de la simulación. **A.** Δ RMSF (278-241 K rojo; 278-241 K verde y 314-241 K azul). **B.** Δ PC1 (278-241 K rojo; 278-241 K verde y 314-241 K azul). **C.** Estructura 3D de POXA 1B con la localización de residuos o regiones con las mayores fluctuaciones, 278 K (rojo), 298 K (verde) y 314 K (azul); la estructura correspondiente a 241 K (blanco) se encuentra alineada con las temperaturas de análisis. Las esferas y regiones amarillas corresponden a residuos con las fluctuaciones más altas, las esferas violetas corresponden a residuos con las fluctuaciones más bajas.

6.4 Discusión

6.4.1 Ensayo piloto de estabilidad

La prueba piloto mostró que las temperaturas entre -30 °C (243.15 K) y 40 °C (313.15 K), eran apropiadas para realizar los estudios de estabilidad ya que a 40°C (313.15 K) la actividad residual fue 61.30 % (Tabla 6.1). En estudios previos (Ardila-Leal et al., 2019) rPOXA 1B había mostrado una estabilidad térmica alta entre 10 °C (283.15 K) y 50 °C (323.15 K); temperatura a partir de la cual la actividad enzimática relativa residual comenzó a disminuir; sin embargo, en dicho estudio la exposición fue sólo de 1 h. La prueba piloto demostró el efecto negativo del tiempo de exposición a temperaturas elevadas, ya que la mayor pérdida de actividad ocurrió en los primeros 15 días, donde sólo se detectó el 25.9 % de la actividad enzimática relativa residual y luego a los 30 días se detectó el 13.2 % de la actividad enzimática relativa residual (Tabla 6.1).

La exposición prolongada a temperaturas elevadas induce cambios conformacionales que afectan la estructura 3D de las enzimas (Lahmar et al., 2018); sin embargo, esto no es común, es más frecuente la exposición durante tiempos cortos. Li et al., (2017) evaluaron la estabilidad térmica a 35 y 55 °C usando una lacasa comercial (Lac), (Sigma, China). En el estudio detectaron 20 % de pérdida de la actividad enzimática relativa, cuando la enzima fue expuesta durante 9 h a 35 °C y de 60 y 100 % cuando la enzima fue expuesta durante 1 y 9 h respectivamente a 55 °C, (323.15 K), (Li et al., 2017), pero los autores no especificaron el origen de la enzima, el cual es un factor importante, ya que la estabilidad de las enzimas varía dependiendo de origen y de la estructura.

El diseño de muestreo propuesto permitió construir una población de origen de la que se fueron extrayendo al azar muestras en cada uno de los meses (momentos de muestreo) de forma tal que en cada caso se pudo estimar siempre el valor medio de la actividad enzimática con la misma confiabilidad y precisión. El uso de una estrategia de muestreo estratificado permitió controlar variaciones en los datos que pudieron ser

introducidas por el uso de lotes diferentes; de esta forma se logró disminuir el error de muestreo en las estimaciones del valor medio de la actividad enzimática.

6.4.2 Concentración del sobrenadante de rPOXA 1B producido en biorreactor de 10 L

Los pasos de concentración entre la obtención de sobrenadante, la filtración por Whatman No. 3 y la filtración a través de la cápsula de 0.22 μm no mostraron cambios en la actividad enzimática ni en la actividad específica de rPOXA 1B, tal y como se esperaba (Figura 6.1), (Ardila-Leal et al., 2019). La concentración a través de los cartuchos de flujo cruzado (100.000 y 10.000 mwco) mostró una reducción de volumen de 3.62 veces (Figura 6.1) y un incremento de 5.75 y 5.32 veces en la actividad enzimática y en la actividad específica del concentrado de rPOXA 1B; pasando de $5,724.50 \pm 694.15$ a $32,893.50 \pm 5,133.41$ y de 147.11 ± 7.24 U mg^{-1} a 782.48 ± 90.20 U mg^{-1} , respectivamente.

6.4.3 Análisis de estabilidad a tiempo real del concentrado de rPOXA 1B

Las proteínas por lo general son más estables a temperaturas de congelación o refrigeración (Huynh-Ba, 2009). Sin embargo, la estabilidad depende de que no se altere la estructura de la enzima y por tanto la función biológica, para ello, son importantes las interacciones no covalentes, como los enlaces hidrofóbicos, los enlaces electrostáticos, las interacciones de van der Waals y los puentes de hidrógeno (Suplatov et al., 2014; Kulshreshtha et al., 2016).

En este trabajo a -32.55 ± 4.12 °C (240.98 ± 5.38 K) se observó que la actividad enzimática relativa residual se mantuvo durante los 12 meses del estudio (101.16 %), (Figura 6.2, Tabla 6.3). Eichlerová et al., (2015) encontraron que la congelación del sobrenadante con lacasas de *Trametes versicolor* en nitrógeno líquido (-198 °C, 75.15 K), previo al almacenamiento a -80 °C (353.15 K), genera mayor pérdida de actividad enzimática, en comparación con el almacenamiento directo a -80 °C (353.15 K), (Eichlerova et al., 2015). La congelación lenta genera cristales de hielo grandes, mientras que la congelación rápida forma cristales pequeños y delgados en el área

interfacial de la proteína, facilitando la desnaturalización de la misma (Roy and Gupta, 2004).

En diferentes investigaciones se ha analizado la estabilidad de lacasas a temperatura de congelación, pero en muy pocas (a saber) se han evaluado tiempos de exposición superiores a 12 meses. Zhang et al., (2014) evaluaron la actividad residual de la lacasa liofilizada de *T. versicolor* (Sigma-Aldrich) durante 2 años de almacenamiento a -20 °C (253.15 K), encontrando una actividad enzimática residual de 14.6 % (Zhang et al., 2014).

La temperatura de refrigeración es frecuentemente utilizada para evaluar la estabilidad de enzimas (Bou-Mitri and Kermasha, 2018; Zhang et al., 2020). A 4.32 ± 1.22 °C (277.40 ± 1.32 K) rPOXA1B mostró una actividad enzimática relativa residual de 115.81 % y una actividad específica residual de 1045.58 ± 15.31 Umg⁻¹; lo que implica que fue estable durante los 12 meses del estudio (Figura 6.2). El aumento de la actividad enzimática relativa residual no es frecuente; sin embargo, Has-Schön et al., (2005) estudiaron la estabilidad de peroxidasas (E.C. 1.11.1.) de un extracto crudo de *Picea abies* a 4 °C (277.15 K) durante 30 días y encontraron una actividad enzimática relativa residual de ~190 %, estas variaciones fueron atribuidas a posibles cambios en el entorno nativo de la enzima o a la presencia de sustancias que pudieron actuar como activadores (Has-Schön et al., 2005).

A diferencia Zhang et al., (2020) obtuvieron una actividad enzimática residual de sólo el 10 ± 1.1 % después de 30 días de almacenamiento a 4 °C (277.15 K), usando la lacasa comercial de *Trametes versicolor* (Sigma-Aldrich), (Zhang et al., 2020). Bagewadi et al., (2017) monitorearon la lacasa de *Trichoderma harzianum* HZN10, encontrando que perdió 45 % de la actividad enzimática en sólo 8 días de almacenamiento a 4 °C (277.15 K), (Bagewadi et al., 2017). Bou-Mitri and Kermasha, (2018) evaluaron la estabilidad del extracto liofilizado con la lacasa de *Coriolus hirsutus*, encontrando que después de 4 semanas de almacenamiento a 4 °C (273.15 K) la actividad enzimática residual fue de 8.5 % (Bou-Mitri and Kermasha, 2018). Los resultados de estabilidad relativa residual

de la rPOXA1B en este estudio muestran que es una enzima con alta estabilidad, superando la estabilidad de algunas otras lacasas; lo que la convierte en una enzima promisorio para el uso a gran escala.

En el presente estudio se encontró que a 24.99 ± 0.25 °C (240.98 ± 5.38 K), 30.12 ± 1.11 °C (303.27 ± 1.11 K) y 36.43 ± 0.23 °C (309.58 ± 0.23 K) se observó menor actividad residual con el aumento de la temperatura y el tiempo de exposición, obteniendo al final del estudio una actividad enzimática relativa de 76.43, 46.09 y 5.81 %, respectivamente para cada temperatura (Figure 6.2).

La desnaturalización de las enzimas a temperaturas elevadas está asociada al incremento de la energía cinética del sistema, lo cual genera fluctuaciones conformacionales, pese a que entre 25 °C (298.15 K) y 100 °C (373.15 K) la hidrofobicidad parece permanecer constante en comparación con otras propiedades (Pucci and Roman, 2017). A 24.99 ± 0.25 °C (297.53 ± 3.88 K) y 30.12 ± 1.11 °C (303.27 ± 1.11 K) las actividades enzimáticas residuales fueron similares hasta el tercer mes de exposición (Figure 6.2), pero en muestreos posteriores se observó que a 30.12 ± 1.11 °C (303.27 ± 1.11 K) la actividad enzimática disminuyó rápidamente; efecto que pudo deberse a desnaturalización térmica irreversible (Agbo et al., 2017). No obstante, la estabilidad de rPOXA 1B fue mayor que la reportada para otras lacasas. Ahn et al., (2007) evaluaron la lacasa comercial de *T. villosa* (Novo Nordisk - Danbury, CT), encontrando que el almacenamiento por 30 días a 25 °C (298.15 K) generaba una desactivación exponencial de la enzima, con una pérdida de la actividad enzimática relativa residual del 93 % (Ahn et al., 2007). Por otra parte Nadar et al., (2019) evaluaron la lacasa comercial de *T. versicolor* (Sigma-Aldrich), encontrando que después 18 días a 30 °C (303.15 K) sólo se obtuvo una actividad residual del 30 % (Nadar and Rathod, 2019).

En el presente estudio se encontró que a 41.64 ± 0.52 °C (314.79 ± 0.52 K) se observó una disminución considerable de la actividad enzimática relativa, con una recuperación de sólo 4.83 % durante el mes de exposición, mientras que la actividad enzimática

relativa residual a la misma temperatura en el ensayo piloto fue de 61.30 % (Tabla 6.1, Figure 6.3). En los estudios de estabilidad de medicamentos las concentraciones más bajas generalmente soportan tiempos de almacenamiento más prolongados (Huynh-Ba, 2009), este efecto de la concentración también aplica para biomoléculas, ya que a concentraciones y temperaturas altas, las enzimas son termodinámicamente inestables y propensas a formar agregados, debido a la exposición de los grupos hidrofóbicos (Vendruscolo *et al.*, 2011). La diferencia de actividad específica entre los concentrados utilizados en la prueba piloto ($\sim 164.62 \text{ Umg}^{-1}$) y en el estudio de estabilidad ($758.71 \pm 8.90 \text{ Umg}^{-1}$) demuestra que el número de unidades de enzima por miligramo de proteína fue mayor en el estudio de estabilidad. Tung *et al.*, (2018) evaluaron la estabilidad de la proteína FIP-fve obtenida de extracto de *Flammulina velutipes* a concentraciones altas y bajas durante 1 minuto a 100 °C, recuperando 16.4 y 85.0 % de la proteína, respectivamente; sin embargo, a 4 °C (277.15 K) no hubo cambios, recuperando el 100 % de la proteína independientemente de la concentración utilizada, pero a -30 °C (303.15 K) la pérdida de la proteína fue ligeramente menor cuando la concentración fue alta (Tung *et al.*, 2018).

6.4.4 Análisis de estabilidad acelerada y parámetros termodinámicos de rPOXA 1B

El K_d de las temperaturas evaluadas osciló entre 3×10^{-3} y 0.400 meses^{-1} , aumentando con el incremento de la temperatura de exposición (Tabla 6.4); tendencia que ha sido reportada como consecuencia de la inactivación de las enzimas y proteínas (Tavares *et al.*, 2015; Nadar and Rathod, 2019). K_d fue utilizada para calcular la vida media ($t_{1/2}$); encontrando que rPOXA1B a $-32.55 \pm 4.12 \text{ °C}$ ($240.98 \pm 5.38 \text{ K}$) y $4.32 \pm 1.22 \text{ °C}$ ($277.40 \pm 1.32 \text{ K}$) es estable al menos por 230.7 y 46.2 meses respectivamente (Tabla 6.4).

La vida media ($t_{1/2}$) es un parámetro económicamente importante porque permite establecer (dependiendo de las condiciones) los tiempos de caducidad y de conservación para las aplicaciones industriales o ambientales, debido a que a mayor $t_{1/2}$, mayor termoestabilidad (Ahmed *et al.*, 2019). Algunos valores de $t_{1/2}$ reportados para otras lacasas han sido inferiores. Yadav *et al.*, (2018) evaluó la lacasa pequeña

rSLAC de *Streptomyces coelicolor* A3(2) producida en *P. pastoris* y obtuvieron una $t_{1/2}$ de 60, 32 y 10 h a 60 °C (333.15 K), 70 °C (343.15 K) y 80 °C (353.15 K), respectivamente (Yadav et al., 2018), mientras que Zhang et al., (2020) usando la lacasa comercial de *T. versicolor* (Sigma-Aldrich) obtuvo una $t_{1/2}$ de 7.04, 5.63 y 5.38 h a 30 °C (303.15 K), 35 °C (308.15 K) y 45 °C (318.15 K), respectivamente (Zhang et al., 2020).

E_d , expresa la estabilidad térmica (Nadar and Rathod, 2019). Para rPOXA 1B se obtuvo una E_d de 41 kJ mol⁻¹ (Figura 6.3F, Tabla 6.4), valor que está dentro de los rangos de energía de desactivación reportados por otros autores. Nadar and Rathod, (2019) obtuvieron 38.25 kJ mol⁻¹ usando la lacasa comercial de *Trametes versicolor* (Sigma-Aldrich), Maurya et al., (2020) obtuvieron 34.97 kJ mol⁻¹ usando la lacasa comercial de *Trametes versicolor* (Sigma-Aldrich), (Maurya et al., 2020) y Ahn et al., (2007) obtuvieron 25 kJ mol⁻¹ usando la lacasa comercial de *Trametes villosa* (Novo Nordisk - Danbury, CT), (Ahn et al., 2007).

La E_d de POXA1B de *P. ostreutus* a saber no ha sido reportada hasta el momento en alguna otra investigación. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo (E_d = 41 kJ mol⁻¹) confirman la alta estabilidad de rPOXA 1B ya que se requiere de mayor energía para sobrepasar la barrera de inactivación de la enzima. Sabiendo que los cambios en el folding de las proteínas generan moléculas menos organizadas e inestables, debido a la ruptura de enlaces no-covalentes relativamente débiles (Sant'Anna et al., 2012).

La E_d está directamente relacionado con la entalpía (ΔH^*) (Tabla 6.4), ya que ΔH^* es la cantidad total de energía requerida para llevar la enzima del estado fundamental al intermedio activado (Agbo et al., 2017). Valores ΔH^* positivos indican que la desactivación térmica es una reacción endotérmica (Miłek, 2020), en donde, a mayor valor de ΔH^* será mayor la energía requerida para romper los enlaces estabilizadores en la inactivación térmica de la enzima (Yadav et al., 2018). Tendencias similares han sido reportadas para lacasas y otras enzimas (Agbo et al., 2017; Yadav et al., 2018; Filatova et al., 2019). ΔG^* es considerado un indicador de estabilidad más confiable, un

valor ΔG^* muy bajo o negativo es indicativo de reacciones espontáneas y estabilidad baja (Mišek, 2020). Agbo et al. (2017) demostró el aumento del ΔG^* con el incremento de la temperatura, considerando dicha tendencia como indicador de la estabilidad térmica a temperaturas altas (Agbo et al., 2017). No obstante, dicha tendencia al parecer no es común. En la lacasa rSLAC de *S. coelicolor* se obtuvo un ΔG^* positivo sin ninguna tendencia en particular (Yadav et al., 2018); resultados similares obtuvieron Filatova et al., (2019) usando enzimas estafilolíticas (Ply187AN-KSH3b and 2638aR), (Filatova et al., 2019), lo que demuestra que los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con otras investigaciones. Finalmente, los valores negativos (Tabla 6.4) de la entropía (ΔS^*) indican que el sistema tiene una estabilidad alta, mayor compacidad y resistencia alta a la inactivación térmica (Gupta et al., 2014).

6.4.5 Efecto de la exposición a diferentes temperaturas sobre V_{max} y K_M (aparentes)

La Tabla 6.5 muestra que la V_{max} fue constante entre 240.98 K (-32.55 °C) y 303.27 K (30.12 °C), indicando que la tasa de reacción de la enzima no fue afectada, aunque a 303.27 K (30.12 °C) se observó mayor amplitud en la desviación estándar. A 309.58 K (36.43 °C) y 314.79 K (41.64 °C) la ligera disminución de la V_{max} , pudo deberse al efecto de la temperatura sobre la enzima. La constante de Michaelis-Menten (K_M) explica la afinidad de la enzima por un sustrato y a mayor K_M , habrá menor afinidad de la enzima por el sustrato, en este caso ABTS (Kutcherlapati et al., 2016; Maurya et al., 2020). En el presente estudio los valores promedio de K_M y las SD fueron aumentando a medida que se incrementó la temperatura [240.98 K (-32.55 °C) y 314.79 K (41.64 °C)]. En otro estudio se demostró que K_M permanece constante entre 0 y 25 °C, pero presenta un umbral diferenciado con un aumento que puede ser significativo a temperaturas superiores a 30°C (Razavi et al., 2015).

Los *p*-valor de V_{max} y K_M mostraron que el incremento de la temperatura generó diferencias significativas en ambos parámetros cinéticos. No obstante, el análisis de V_{max} mostró la formación de dos grupos (Table 6.5), confirmando que no hubo diferencias significativas entre las temperaturas de 240.98 K (-32.55 °C) y 303.27 K

(30.12 °C) y entre 309.58 K (36.43 °C) y 314.79 K (41.64 °C) y que la conservación a temperaturas superiores a 30 °C afectó a la enzima.

6.4.6 Simulaciones de dinámica y análisis de componentes principales

El RMSD determina la diferencia entre las cadenas principales de una proteína desde su conformación estructural inicial hasta su conformación final, mediante el análisis de las desviaciones producidas durante la simulación (a menor desviación mayor estabilidad del sistema), (Aier *et al.*, 2016). El cálculo del RMSD demostró que la estabilidad del sistema en las diferentes temperaturas se mantuvo durante la simulación. Aunque la desviación del RMSD fue mayor con el aumento de la temperatura, continuó siendo baja, estabilizándose en un promedio de 0.96, 1.06, 1.26 y 1.20 Å para las temperaturas de 241 K (-32.15 °C), 278 K (4.85 °C), 298 (24.85 °C) K y 314 K (40.85 °C), respectivamente.

Los cambios de flexibilidad de una proteína a causa de la fluctuación de los residuos pueden causar desestabilización del sistema (Acosta-Tapia *et al.*, 2020), donde fluctuaciones altas del C α se deben a cambios estructurales o movimientos libres en la cadena principal de la proteína (Singh and Gupta, 2015). Con los resultados de MD se implementó el análisis de RMSF y de PCA para conocer los efectos del incremento de la temperatura sobre la enzima.

Los resultados de los análisis de RMSF y de PCA se complementan, ya que los PCA representan los residuos y las regiones identificadas en el análisis de RMSF. Sin embargo, para identificar las diferencias en las fluctuaciones entre temperaturas se evaluó el Δ RMSF utilizando las fluctuaciones de 241 K (-32.15 °C) como temperatura base. Los picos negativos que se observaron en los análisis Δ RMSF (Figuras 6.4 A y B) para LYS³⁰⁹ y ALA³⁶³ permanecieron constantes durante la exposición a diferentes temperaturas, indicando la rigidez del sistema en esos residuos. El residuo LYS³⁰⁹ se encuentra en un bucle superficial, lejos del sitio activo, en una región interdominio (D2-D3) y el residuo ALA³⁶³ se encuentra en D3, donde la rigidez puede estar asociada a interacciones fuertes, generadas por los residuos circundantes (Karshikoff *et al.*, 2015).

A diferencia de los residuos rígidos, se observó que los residuos y las regiones flexibles aumentaron a medida que se incrementó la temperatura (Figuras 6.4 A y C). Las regiones flexibles indican los movimientos de los átomos de la estructura proteica, así como, de puntos o regiones débiles de la enzima (Yu and Huang, 2014), por otra parte, el aumento de las regiones flexibles demuestra la pérdida de las interacciones o enlaces que mantienen la rigidez de la estructura.

ASP²⁶⁶, ASN²⁹⁷ y las regiones próximas aumentaron progresivamente la fluctuación con el incremento de la temperatura (Figuras 6.4 A y C), pasando de una región de fluctuación baja a una región de fluctuación alta entre 278 y 314 K. Ambos residuos (ASP²⁶⁶, ASN²⁹⁷) se caracterizan por ser hidrofílicos y las regiones próximas están compuesta por residuos hidrofílicos y de polaridad intermedia. Los residuos hidrofílicos son más fluctuantes que los hidrofóbicos (Zhang *et al.*, 2010) y el aumento de la flexibilidad en las regiones hidrofílicas durante la simulación MD es habitual. Por otra parte, los residuos ASP²⁶⁶ y ASN²⁹⁷ están ubicados en regiones sin estructura secundaria definida (such as loops or coils); siendo estas las regiones con fluctuaciones más altas en cualquier proteína (Avelar *et al.*, 2018; Herrera-Zúñiga *et al.*, 2019); tal y como fue observado durante los análisis (Figura 6.4 C).

La región comprendida entre los residuos LEU¹⁵⁹ y VAL¹⁶² (Figura 6.4 A y C) presentó fluctuaciones en los tres análisis Δ RMSF (278-241, 298-241 y 314-241 K); no obstante, al interior de la región los residuos con mayor fluctuación fueron LEU¹⁵⁹ y THR¹⁶⁰ que mostraron mayor fluctuación a 278 y 314 K; demostrando que la temperatura aumenta o disminuye las fluctuaciones de los residuos. El residuo 162 (que no siempre es VAL) ha sido estudiado computacionalmente en las lacasas de *Aspergillus oryzae* (PM1 and 7D5), (de Salas *et al.*, 2019) y de *Corioloropsis trogii* (Mateljak *et al.*, 2019), encontrando que el residuo es de gran importancia porque delimita el bolsillo de unión al sustrato y se caracteriza por tener una red amplia de interacciones hidrofóbicas cerca del CuT1.

La estabilidad cinética de una enzima depende de un equilibrio sutil entre la flexibilidad y la rigidez de su sitio activo, donde, a mayor rigidez del sitio activo, mayor estabilidad

cinética (Xie *et al.*, 2014). Los residuos conservados que coordinan con los iones de cobre obtuvieron valores de RMSF muy bajos y tampoco fueron reportados en los PCA. No obstante, la fluctuación del residuo PRO³⁹³ continuo a la HIS³⁹⁴-(CuT1), pudo causar desestabilización del sistema a 314 K (40.85 °C), ya que el debilitamiento de la coordinación del cobre o los reordenamientos sutiles en la esfera de coordinación de CuT1 generan alteraciones en las interconexiones de los residuos que podrían desestabilizar desde el centro activo toda la estructura, ocasionando la perdida de función de la enzima (Duraó *et al.*, 2006).

Los resultados demostraron que hay una correlación entre los resultados experimentales (estudios de estabilidad a tiempo real) y computacionales (dinámica molecular), ya que las temperaturas simuladas en MD tienen regiones con alta fluctuación que pueden influir en la estabilidad del sistema, ocasionado por la exposición a temperaturas altas como 314 K (40.8 °C).

6.5 Conclusiones

Con la estrategia de muestreo estratificado se construyó una población de origen de la cual se extrajeron muestras (al azar), en cada momento de muestreo (meses); lo que permitió estimar siempre el valor medio de la actividad enzimática (UL^{-1}) con la misma confiabilidad (95 %) y precisión ($21.8 UL^{-1}$), así como controlar variaciones en los datos, debido al uso de lotes diferentes, disminuyendo el error de muestreo. Esta aproximación estadística es extrapolable a estudios de estabilidad de otras enzimas.

El concentrado (impuro y sin preservantes) de rPOXA 1B demostró que puede ser conservado a -32.55 ± 4.12 °C (240.98 ± 5.38 K), 4.32 ± 1.22 °C (277.40 ± 1.32 K) o 24.99 ± 0.25 °C (297.53 ± 3.88 K), con alta estabilidad y $t_{1/2}$ de 230.8, 46.2 y 12.6 meses, respectivamente, superando a saber el tiempo de conservación reportado para otras lacasas. Los parámetros cinéticos y termodinámicos demostraron la estabilidad de rPOXA 1B, basado en la E_d (41.40 KJ mol^{-1}) y las bajas variaciones de K_M y V_{max} entre -32.55 ± 4.12 °C (240.98 ± 5.38 K) y 24.99 ± 0.25 °C (297.53 ± 3.88 K); así como por los valores de ΔH , ΔG y ΔS ; indicando que el concentrado de la enzima es estable a diferentes temperaturas, lo que la hace aún más atractiva para la explotación industrial y/o ambiental.

En general, todas las regiones y residuos reportados como fluctuantes a temperaturas entre 278 (4.85 °C) y 314 K (40.85 °C) en la MD, los cuales fueron observados a través del Δ RMSF se encontraban ubicados en regiones sin estructura secundaria definida (such as loops or coils). Así mismo, el número de residuos con fluctuaciones altas se incrementó con la temperatura, pasando de 3 residuos (LEU¹⁵⁹, ALA³⁹¹ y ASP⁴²⁹) a 278 K (4.85 °C) a 6 residuos (THR¹⁶⁰, ASP²⁶⁶, GLU²⁹³, ALA³³⁴, ASP³⁴¹ y LEU⁴⁵⁹) a 298 K (24.85 °C) y a 9 residuos (ASP¹⁰¹, THR¹⁶⁰, GLY²⁶⁵, ASN²⁹⁷, ALA³³⁴, GLY³⁷⁰, ALA³⁹¹, PRO³⁹³ y ASP⁴³³) a 314 K (40.85 °C). Los análisis de estabilidad a tiempo real y MD, confirmaron que el incremento en la temperatura afecta fuertemente la actividad de POXA 1B, incrementando la fluctuación del sistema en regiones de bucle, coils or loops que contienen principalmente aminoácidos hidrofílicos o de polaridad intermedia (ASP²⁶⁶

y ASN²⁹⁷); lo que propicia la exposición de los aminoácidos o de las regiones hidrofóbicas que mantienen la rigidez de la estructura, causando la inactivación irreversible de POXA 1B. El residuo PRO³⁹³ próximo a HIS³⁹⁴ (distancia de 3.91 Å) aumentó la fluctuación a 314 K (40.85 °C) y podría ser uno de los causantes de la desestabilización del centro activo al alterar la coordinación HIS³⁹⁴-CuT1.

El estudio identificaron las temperaturas óptimas de conservación del concentrado de rPOXA 1B (bajo las condiciones de ensayo) a largo plazo; permitiendo la construcción de un modelo basado en las temperaturas ensayadas experimentalmente y que utilizando la ecuación de Arrhenius permite predecir la vida media ($t_{1/2}$) de la enzima a temperaturas entre 240.98 K (-32.55) y 309.58 K (36.43 °C), el cual es de utilidad para la transferencia tecnológica relacionada con la producción del concentrado de rPOXA 1B a grandes productores y/o a las empresas que decidan la comercialización del mismo, basados en su innumerables aplicaciones. Finalmente, nuestro grupo de investigación continuará con los estudios, empleando la enzima pura y la adición de preservantes no tóxicos que prolonguen aún más la $t_{1/2}$.

6.6 Referencias

- Acosta-Tapia, N., J.F. Galindo and R. Baldiris, (2020). Insights into the effect of lowe syndrome-causing mutation p.Asn591Lys of OCRL-1 through protein–protein interaction networks and molecular dynamics simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 60: 1019-1027. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.9b01077>
- Agbo, K.U., P.C. Okwuenu, A.L. Ezugwu, S.O.O. Eze and F.C. Chilaka, (2017). Thermostability and thermodynamic characterization of sprouted pearl millet alpha-amylases for its biotechnological applications. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, 52 (3): 159-166.
- Ahmed, S.A., S.A.A. Saleh, S.A.M. Abdel-Hameed and A.M. Fayad, (2019). Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of free and immobilized caseinase on mica glass-ceramics. **Heliyon**, 5: e01674. <http://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01674>
- Ahn, M.-Y., A.R. Zimmerman, C.E. Martínez, D.D. Archibald, J.-M. Bollag, *et al.*, (2007). Characteristics of *Trametes villosa* laccase adsorbed on aluminum hydroxide. **Enzyme and Microbial Technology**, 41: 141-148. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.12.014>
- Aier, I., P.K. Varadwaj and U. Raj, (2016). Structural insights into conformational stability of both wild-type and mutant EZH2 receptor. **Scientific Report**, 6: 34984. <http://dx.doi.org/10.1038/srep34984>
- Ardila-Leal, L.D., D.A. Albarracín-Pardo, C.M. Rivera-Hoyos, E.D. Morales, R.A. Poutou-Piñales, *et al.*, (2019). Media improvement for 10 L bioreactor production of rPOXA 1B laccase by *P. pastoris*. **3Biotech**, 9 (12): Article 447. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-019-1979-y>
- Avelar, M., N. Pastor, J. Ramirez-Ramirez and M. Ayala, (2018). Replacement of oxidizable residues predicted by QM-MM simulation of a fungal laccase generates variants with higher operational stability. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 178: 125-133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.10.007>
- Bagewadi, Z.K., S.I. Mulla and H.Z. Ninnekar, (2017). Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye decolorization. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 15: 139-150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.01.007>
- Bou-Mitri, C. and S. Kermasha, (2018). Lyoprotection and stabilization of laccase extract from *Coriolus hirsutus*, using selected additives. **AMB Express**, 8: 152. <http://doi.org/10.1186/s13568-018-0683-3>
- Burquillo, F.J., M. Holgado and W.G. Bardsley, (2003). Uso del paquete estadístico SIMFIT en la enseñanza del análisis de datos en ciencias experimentales. **Journal of Science Education**, 4 (1): 8-14.
- Chen, Y.-C., T. Smith, R.H. Hicks, A. Doekhie, F. Koumanov, *et al.*, (2017). Thermal stability, storage and release of proteins with tailored fit in silica. **Scientific Report**, 7: 46568. <http://doi.org/10.1038/srep46568>
- Childers, M.C. and V. Daggett, (2017). Insights from molecular dynamics simulations for computational protein design. **Molecular Systems Design & Engineering**, 2 (1): 9-33. <http://doi.org/10.1039/C6ME00083E>

- Christensen, N.J. and K.P. Kepp, (2013). Stability Mechanisms of a Thermophilic Laccase Probed by Molecular Dynamics. **Plos One**, 8 (4): e61985. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061985>
- de Salas, F., R. Cañadas, G. Santiago, A. Virseda-Jerez, J. Vind, *et al.*, (2019). Structural and biochemical insights into an engineered high-redox potential laccase overproduced in *Aspergillus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 141: 855-867. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.052>
- Durao, P., I. Bento, A.T. Fernandes, E.P. Melo, P.F. Lindley, *et al.*, (2006). Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis* : structural, biochemical, enzymatic and stability studies. **Journal of Biological and Inorganic Chemistry**, 11: 514-526. <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-006-0102-0>
- Eichlerova, I., L. Homolka, M. Tomsovsky and L. Lisa, (2015). Long term storage of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* isolates using different cryopreservation techniques and its impact on laccase activity. **Fungal Biology**, 119: 1345-1353. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2015.10.004>
- Elias, M., G. Wiczorek, S. Rosenne and D.S. Tawfik, (2014). The universality of enzymatic rate-temperature dependency. **Trends in Biochemical Sciences**, 39 (1): 1-7. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.11.001>
- Festa, G., F. Autore, F. Fraternali, P. Giardina and G. Sannia, (2008). Development of new laccases by directed evolution: Functional and computational analyses. **Proteins** 72 (1): 25-34. <http://doi.org/10.1002/prot.21889>
- Filatova, L., D. Donovan, S. Swift, V. Pugachev, G. Emelianov, *et al.*, (2019). Kinetics of inactivation of staphylolytic enzymes: Qualitative and quantitative description. **Biochimie**, 162: 77-87. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.04.005>
- Galindo-Murillo, R., D.R. Roe and T.E. Cheatham III, (2014). On the absence of intrahelical DNA dynamics on the ms to ms timescale. **Nature Communications**, 5: 5152. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms6152>
- Grant, B.J., A.P.C. Rodrigues, K.M. ElSawy, J.A. McCammon, S.Leo, *et al.*, (2006). Bio3d: An R Package for the comparative analysis of protein structures. **Bioinformatics**, 22 (21): 2695-2696.
- Gupta, G., V. Sahai and R.K. Gupta, (2014). Thermal stability and thermodynamics of xylanase from *Melanocarpus albomyces* in presence of polyols and Salts. **bioresources.com**, 9 (4): 5801-5816.
- Hartmann, J. and F. Asch, (2019). Extraction, Storage Duration, and Storage Temperature Affect the Activity of Ascorbate Peroxidase, Glutathione Reductase, and Superoxide Dismutase in Rice Tissue. **biology**, 8: 70. <http://dx.doi.org/10.3390/biology8040070>
- Has-Schön, E., H. Lepeduš, L. Jerabek and V. Cesar, (2005). Influence of storage temperature on total peroxidase activity in crude extracts from *Picea abies* L. Karst. Needles. **Croatica Chemica Acta**, 78 (3): 349-353.
- Herrera-Zúñiga, L.D., C. Millán-Pacheco, G. Viniestra-González, E. Villegas, L. Arregui, *et al.*, (2019). Molecular dynamics on laccase from *Trametes versicolor* to examine thermal stability induced by salt bridges. **Chemical Physics**: <http://doi.org/10.1016/j.chemphys.2018.10.019>

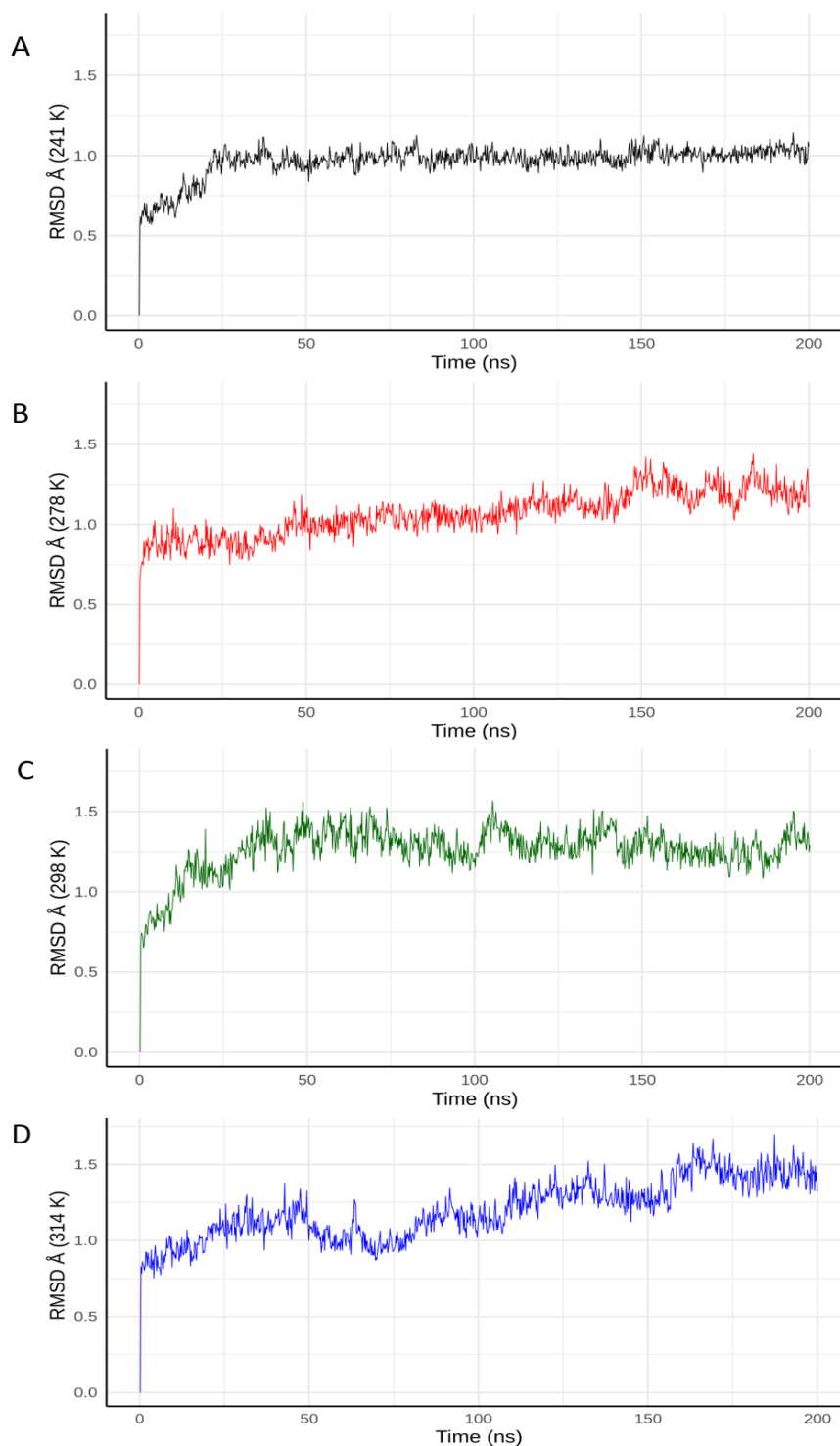
- Huynh-Ba, K., (2009) Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development. Springer Science+Business Media, Newark, Delaware.
- Karshikoff, A., L. Nilsson and R. Ladenstein, (2015). Rigidity versus flexibility: the dilemma of understanding protein thermal stability. **The FEBS Journal**, 282: 3899-3917. <http://doi.org/10.1111/febs.13343>
- Kulshreshtha, S., V. Chaudhary, G.K. Goswami and N. Mathur, (2016). Computational approaches for predicting mutant protein stability. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, 30: 401-412. <http://dx.doi.org/10.1007/s10822-016-9914-3>
- Kutcherlapati, S.N.R., N. Yeole and T. Jana, (2016). Urease immobilized polymer hydrogel: Long-term stability and enhancement of enzymatic activity. **Journal of Colloid and Interface Science**, 463: 164-172. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2015.10.051>
- Lahmar, I., G. Radeva, D. Marinkova, M. Velitchkova, H. Belghith, *et al.*, (2018). Immobilization and topochemical mechanism of a new β -amylase extracted from *Pergularia tomentosa*. **Process Biochemistry**, 64: 143-151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.09.007>
- Li, G., A.G. Nandgaonkar, Q. Wang, J. Zhang, W.E. Krause, *et al.*, (2017). Laccase-immobilized bacterial cellulose/TiO₂ functionalized composite membranes: Evaluation for photo- and bio-catalytic dye degradation. **Journal of Membrane Science**, 525: 89-98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2016.10.033>
- Lohr, S.L., (2019) Sampling, Design and Analysis, 2nd Edition ed. Chapman and Hall/CRC New York, USA.
- Maestre-Reyna, M., W.-C. Liu, W.-Y. Jeng, C.-C. Lee, C.-A. Hsu, *et al.*, (2015). Structural and Functional Roles of Glycosylation in Fungal Laccase from *Lentinus* sp. **PLoS One**, 10 (4): e0120601. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0120601>
- Maier, J.A., C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K. Hauser, *et al.*, (2015). ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 11 (8): 3696-3713. <http://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>
- Mateljask, I., E. Monza, M.F. Lucas, V. Guallar, O. Aleksejeva, *et al.*, (2019). Increasing Redox Potential, Redox Mediator Activity, and Stability in a Fungal Laccase by Computer-Guided Mutagenesis and Directed Evolution. **ACS Catalysis**, 9: 4561-4572. <http://doi.org/10.1021/acscatal.9b00531>
- Maurya, S.S., S.S. Nadar and V.K. Rathod, (2020). Dual activity of laccase-lysine hybrid organic-inorganic nanoflowers for dye decolourization. **Environmental Technology & Innovation**, 19: 100798. <http://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100798>
- Melikoglu, M., C.S. Ki Lin and C. Webb, (2013). Kinetic studies on the multi-enzyme solution produced via solid state fermentation of waste bread by *Aspergillus awamori*. **Biochemical Engineering Journal**, 80 (15): 76-82. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2013.09.016>
- Miłek, J., (2020). Thermodynamics and kinetics of thermal deactivation of catalase *Aspergillus niger*. **Polish Journal of Chemical Technology**, 22 (2): <http://doi.org/10.2478/pjct-2020-0018>

- Mohtashami, M., J. Fooladi, A. Haddad-Mashadrizeh, M.R. Housaindokht and H. Monhemi, (2019). Molecular mechanism of enzyme tolerance against organic solvents: Insights from molecular dynamics simulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, 122: 914-923. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.172>
- Monza, E., M.F. Lucas, S. Camarero, L.C. Alejaldre, A.T. Martínez, *et al.*, (2015). Insights into Laccase Engineering from Molecular Simulations: Toward a Binding-Focused Strategy. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, 6: 1447-1453. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcclett.5b00225>
- Morales-Álvarez, E.D., C.M. Rivera-Hoyos, Á.M. Cardozo-Bernal, R.A. Poutou-Piñales, A.M. Pedroza-Rodríguez, *et al.*, (2017). Plackett-Burman Design for rGILCC1 laccase activity enhancement in *Pichia pastoris*: Concentrated enzyme kinetic characterization. **Enzyme Research**, 2017: Article ID 5947581. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/5947581>
- Mostafa, F.A. and A.A. Abd El Aty, (2018). Thermodynamics enhancement of *Alternaria tenuissima* KM651985 laccase by covalent coupling to polysaccharides and its applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, 120: 222-229. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.081>
- Nadar, S.S. and V.K. Rathod, (2019). Amino acid induced hyper activation of laccase and its application in dye degradation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 18: 101064. <http://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101064>
- Nelson, D.L. and M.M. Cox, (2017) Lehninger, principles of biochemistry, 7th ed. W.H. Freeman and Company, Macmillan Higher Education, New York, USA.
- Papaleo, E., L. Riccardi, C. Villa, P. Fantucci and L. De Gioia, (2006). Flexibility and enzymatic cold-adaptation: A comparative molecular dynamics investigation of the elastase family. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1764: 1397-1406. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.06.005>
- Pezzella, C., V.G. Giacobelli, V. Lettera, G. Olivieri, P. Cicatiello, *et al.*, (2017). A step forward in laccase exploitation: recombinant production and evaluation of techno-economic feasibility of the process. **Journal of Biotechnology**, 259: 175-181. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jbiotec.2017.07.022>
- Pikkemaat, M.G., A.B.M. Linssen, H.J.C. Berendsen and D.B. Janssen, (2002). Molecular dynamics simulations as a tool for improving protein stability. **Protein Engineering**, 15 (3): 185-192.
- Poonkuzhali, K. and T. Palvannan, (2011). Thermostabilization of laccase by polysaccharide additives: Enhancement using central composite design of RSM. **Carbohydrate Polymers**, 86: 860-864. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.05.028>
- Pucci, F. and M. Rooman, (2017). Physical and molecular bases of protein thermal stability and cold adaptation. **Current Opinion in Structural Biology**, 42: 117-128. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2016.12.007>
- Quezada, A.G., A.J. Díaz-Salazar, N. Cabrera, R. Pérez-Montfort, Á. Piñeiro, *et al.*, (2017). Interplay between Protein Thermal Flexibility and Kinetic Stability. **Structure**, 25: 167-179. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2016.11.018>

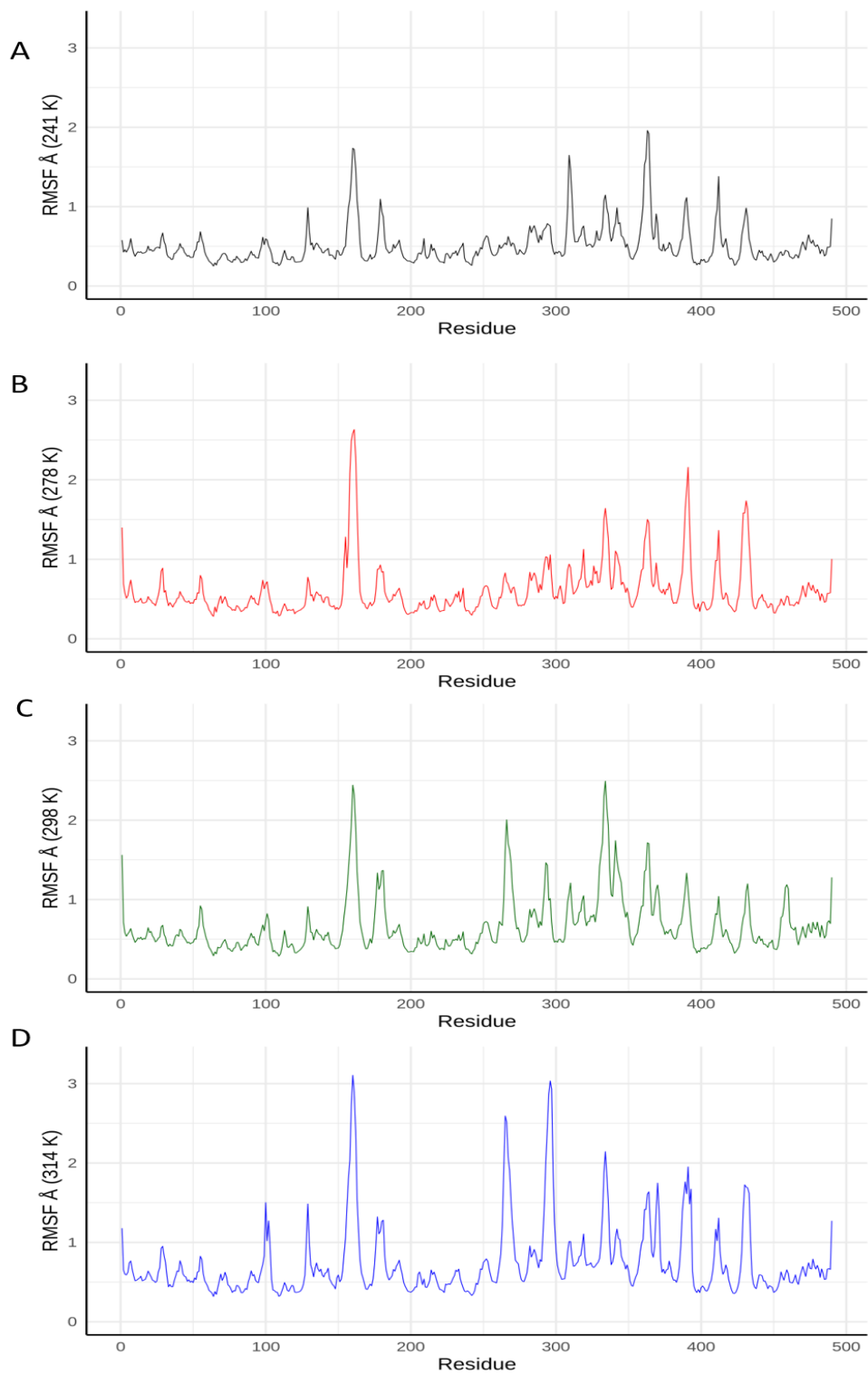
- Rauk, a.p., k. Guo, Y. hU, S. Cahya and W.F. Weiss IV, (2014). Arrhenius Time-Scaled Least Squares: A Simple, Robust Approach to Accelerated Stability Data Analysis for Bioproducts. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 103: 2278-2286.
- Razavi, B.S., E. Blagodatskaya and Y. Kuzyakov, (2015). Non linear temperature sensitivity of enzyme kinetics explains canceling effect—a case study on loamy haplic Luvisol. **Frontiers in Microbiology**, 6: 1126. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01126>
- Roe, D.R. and T.E. Cheatham III, (2013). PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 9: 3084–3095. <http://doi.org/10.1021/ct400341p>
- Roy, I. and M.N. Gupta, (2004). Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 39: 165-177.
- Sanfelice, D. and P.A. Temussi, (2016). Cold denaturation as a tool to measure protein stability. **Biophysical Chemistry**, 208: 4-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2015.05.007>
- Sant'Anna, V., F. Cladera-Olivera and A. Brandelli, (2012). Kinetic and thermodynamic study of thermal inactivation of the antimicrobial peptide P34 in milk. **Food Chemistry**, 130: 84-89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.001>
- Singh, S.P. and D.K. Gupta, (2015). A comparative study of structural and conformational properties of casein kinase-1 isoforms: Insights from molecular dynamics and principal component analysis. **Journal of Theoretical Biology**, 371: 59-68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.01.032>
- Stanzione, I., C. Pezzella, P. Giardina, G. Sannia and A. Piscitelli, (2020). Beyond natural laccases: extension of their potential applications by protein engineering. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 104: 915-924. <http://doi.org/10.1007/s00253-019-10147-z>
- Suplatov, D., N. Panin, E. Kirilin, T. Shcherbakova, P. Kudryavtsev, *et al.*, (2014). Computational design of a pH stable enzyme: Understanding molecular mechanism of penicillin acylase's adaptation to alkaline conditions. **Plos One**, 9 (6): e100643. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0100643>
- Tavares, A.P.M., C.G. Silva, G. Drazic, A.M.T. Silva, J.M. Loureiro, *et al.*, (2015). Laccase immobilization over multi-walled carbon nanotubes: Kinetic, thermodynamic and stability studies. **Journal of Colloid and Interface Science**, 454: 52-60. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.04.054>
- Tung, C.-H., C.-C. Lin, H.-J. Wang, S.-F. Chen, F. Sheu, *et al.*, (2018). Application of thermal stability difference to remove flammutoxin in fungal immunomodulatory protein, FIP-fve, extract from *Flammulina velutipes*. **Journal of Food and Drug Analysis**, 26: 1005-1014. <http://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.12.010>
- Vendruscolo, M., T.P.J. Knowles and C.M. Dobson, (2011). Protein solubility and protein homeostasis: A generic view of protein misfolding disorders. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 3 (12): a010454. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a010454>
- Xie, Y., J. An, G. Yang, G. Wu, Y. Zhang, *et al.*, (2014). Enhanced Enzyme Kinetic Stability by Increasing Rigidity within the Active Site. **The Journal of Biological Chemistry**, 289 (11): 7994-8006. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.536045>

- Yadav, D., B. Ranjan, N. Mchunu, M. Le Roes-Hill and T. Kudanga, (2018). Secretory expression of recombinant small laccase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) in *Pichia pastoris*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 108: 642-649. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.169>
- Yu, H. and H. Huang, (2014). Engineering proteins for thermostability through rigidifying flexible sites. **Biotechnology Advances**, 32: 308-315. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.012>
- Zhang, R., L. Wang, J. Han, J. Wu, C. Li, *et al.*, (2020). Improving laccase activity and stability by HKUST-1 with cofactor via onepot encapsulation and its application for degradation of bisphenol A. **Journal of Hazardous Materials**, 383: 121130. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121130>
- Zhang, T., E. Faraggi and Y. Zhou, (2010). Fluctuations of backbone torsion angles obtained from NMR-determined structures and their prediction. **Proteins**, 78: 3353-3362. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.22842>
- Zhang, X., B. Pan, B. Wu, W. Zhang and L. Lu, (2014). A new polymer-based laccase for decolorization of A07: Long-term storage and mediator reuse. **Bioresource Technology**, 164: 248-253. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.105>

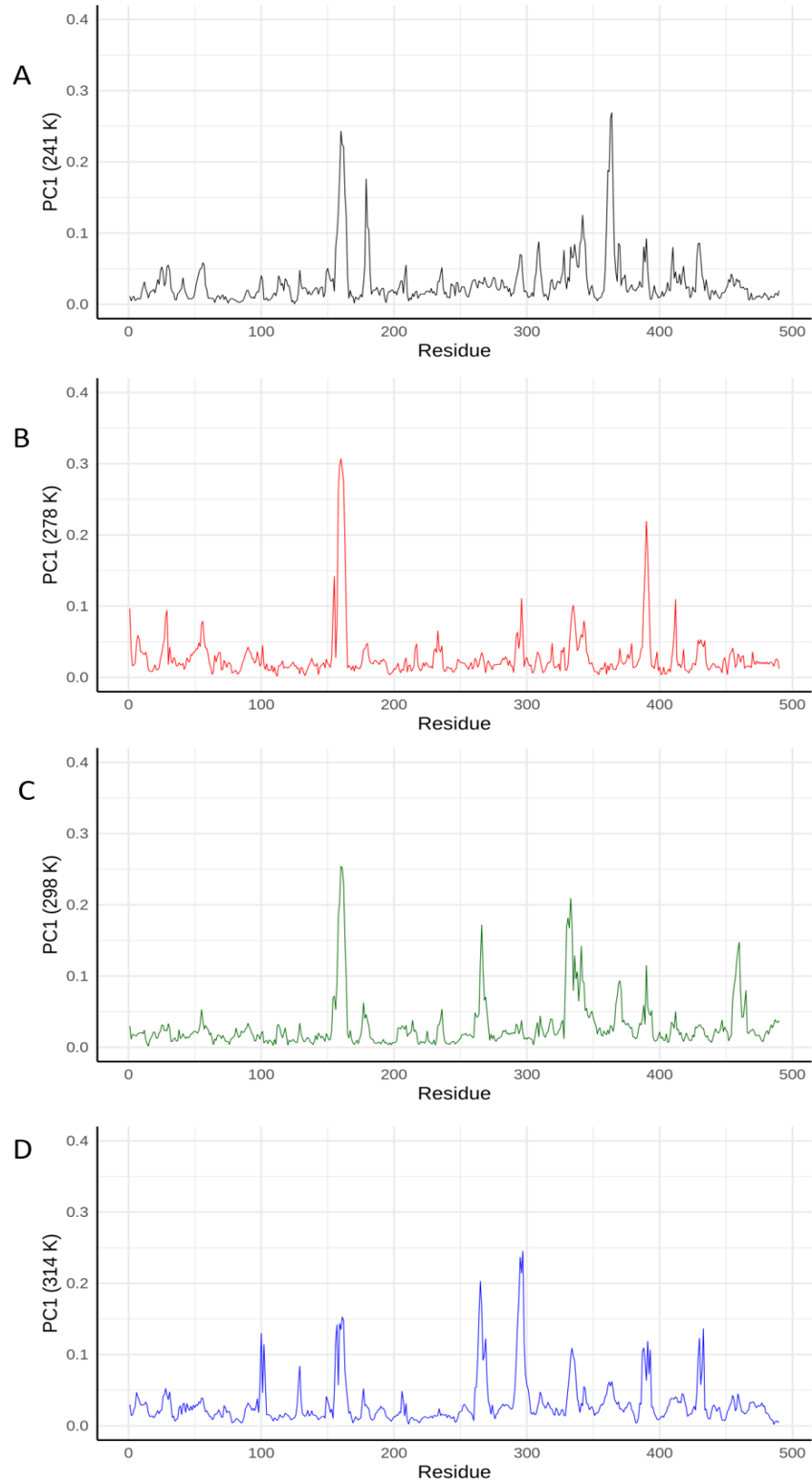
6.7 Material Suplementario



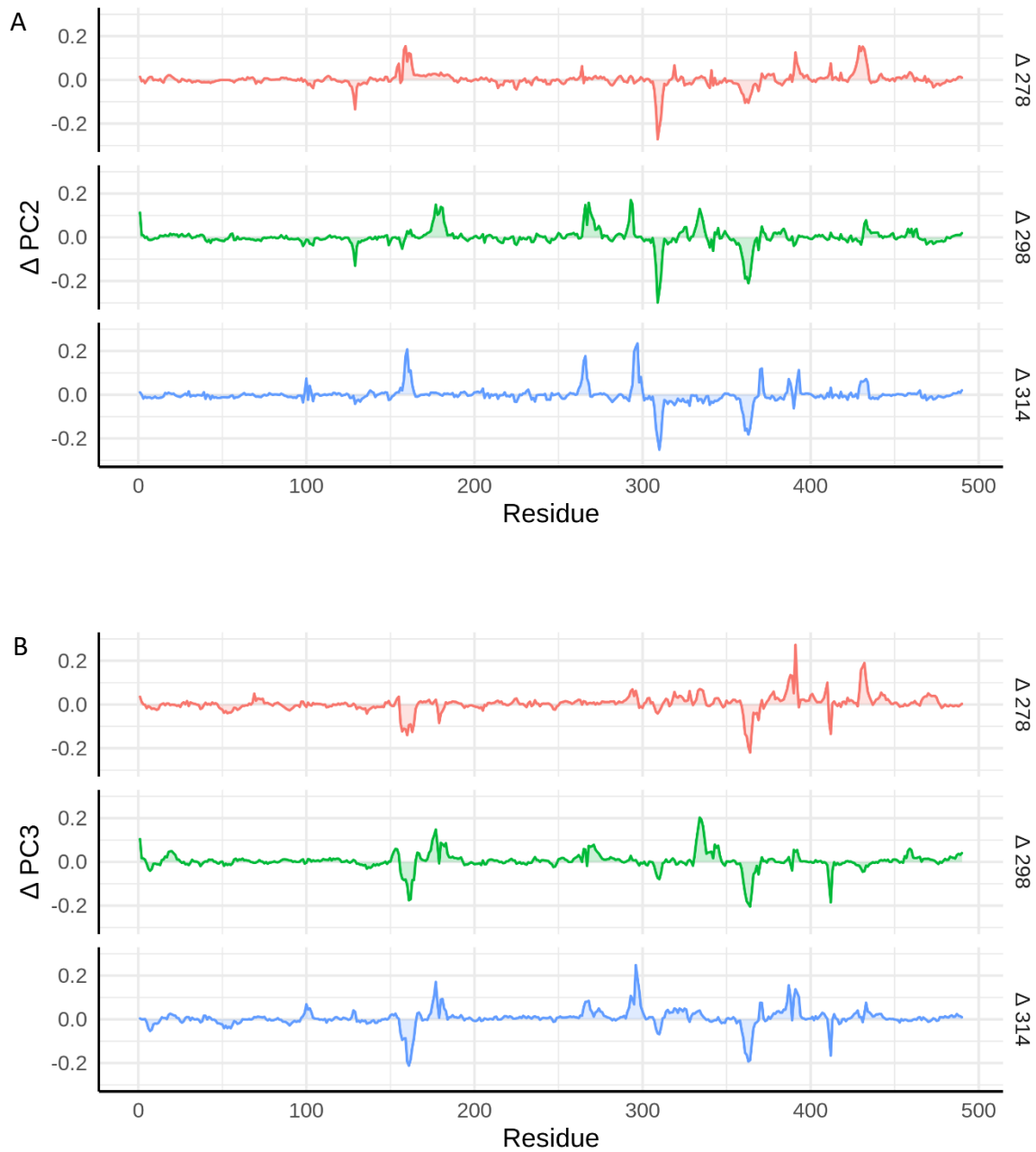
MS 6.1. Gráfico de la desviación cuadrática media (RMSD) de POXA 1B en función del tiempo de los sistemas con respecto a simulación de MD **A.** 241 K (-32.15 °C), **B.** 278 K (4.85 °C), **C.** 298 K (24.85 °C) y **D.** 314 K (40.85 °C).



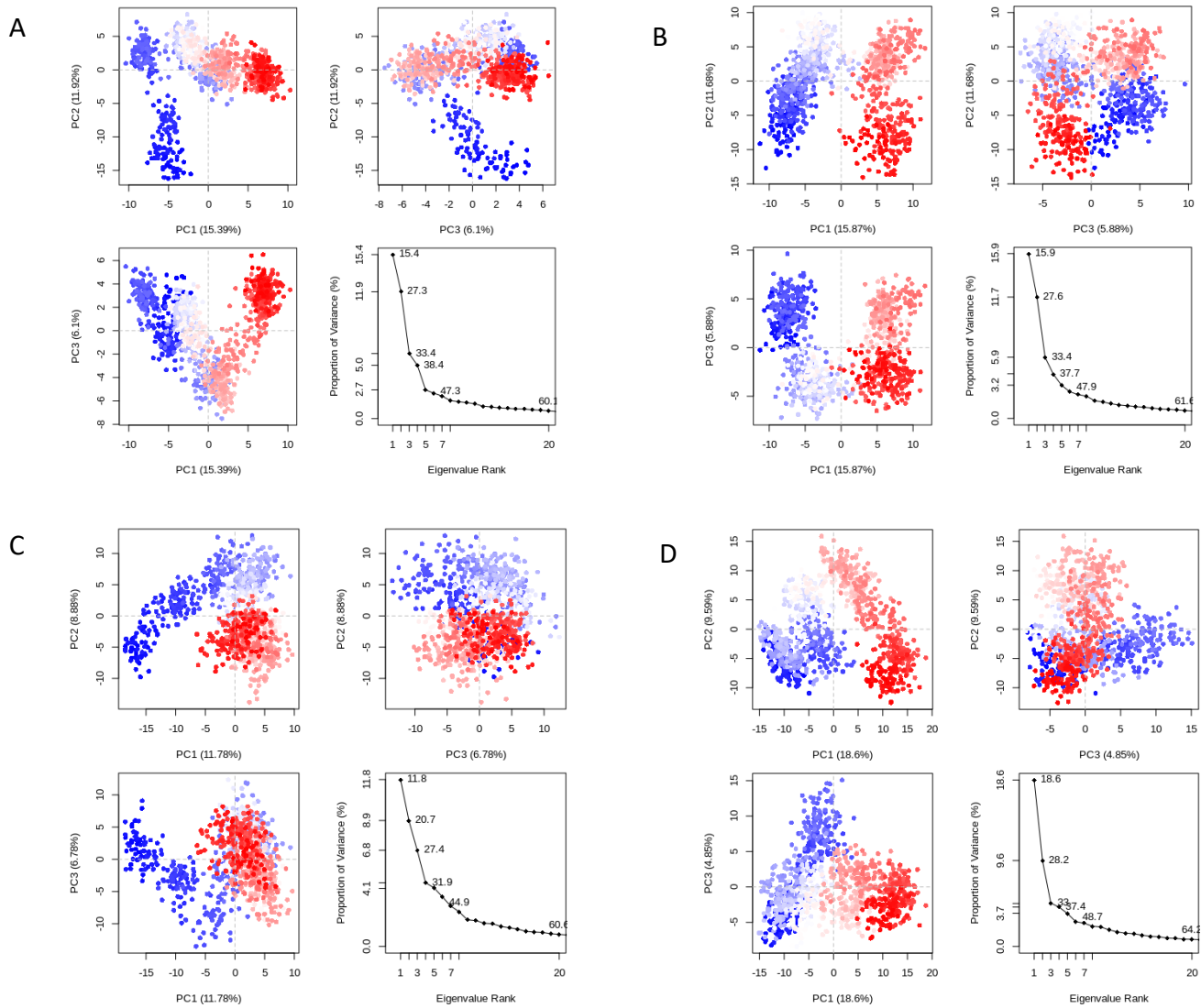
MS 6.2. Análisis de la fluctuación cuadrática media (RMSF) (Å). A. 214 K, B. 278 K, C. 298 K, D. 314 K y E.



MS 6.3 Movimientos colectivos de PC1 en todas las temperaturas evaluadas. A. 214 K, B. 278 K, C. 298 K, D. 314 K



MS 6.4. ΔPC obtenida con la diferencia del promedio del análisis de componentes principales de la simulación entre las temperaturas 278, 298 y 314 K con 241 K (278-241 K rojo; 278-241 K verde y 314-241 K azul). **A.** $\Delta PC2$ y **B.** $\Delta PC3$



MS 6.5. Análisis de componentes principales (PCA) of POXA 1B a diferentes temperaturas. **A.** 241 K (-32.15 °C), **B.** 278 K (4.85 °C), **C.** 298 K (24.85 °C) y **D.** 314 K (40.85 °C).

Capítulo 7. Tratabilidad de agua residual coloreada de laboratorio (CLWW) usando concentrado de rPOXA 1B producido en medio mejorado

Abreviaturas

ABTS:	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
CI:	Carbono Inorgánico
COT:	Carbono Orgánico Total
CT:	Carbono Total
DQO:	Demanda Química de Oxígeno
CLWW:	Agua residual no domestica de laboratorio. <i>Abreviatura en inglés (Coloured Laboratory Wastewater)</i>
MO:	Materia orgánica
NT:	Nitrógeno Total
P1:	Procesos del tratamiento secundario número 1
P2:	Procesos del tratamiento secundario número 2
P3:	Procesos del tratamiento secundario número 3
rPOXA 1B:	Enzima recombinante de <i>Pleurotus ostreatus</i> producida en <i>Pichia pastoris</i>
UC:	Unidades de color
VET:	Volumen efectivo de trabajo

7.1 Introducción

Debido al desarrollo industrial, la contaminación antropogénica se ha incrementado con el tiempo, generando impactos ambientales negativos, los cuales han incentivado a la comunidad científica para desarrollar nuevos procesos de biorremediación. El tratamiento de aguas residuales por medio de procesos biotecnológicos es uno de los mayores retos, debido a que las fuentes hídricas han sido contaminadas con hidrocarburos (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006), metales pesados (mercurio, arsénico, plomo), contaminantes emergentes (compuestos orgánicos persistentes, disruptores endocrinos, antibióticos), materia orgánica y compuestos como colorantes y pigmentos (Deblonde *et al.*, 2011; Barrios-Ziolo *et al.*, 2015).

Los hospitales, universidades, centros de investigación, entre otros, utilizan diferentes colorantes como fucsina básica, fucsina fenicada, cristal violeta, azul de lactofenol, azul de metileno, rojo congo, eosina y verde malaquita, entre otros, para desarrollar tinciones biológicas. Anualmente estas instituciones producen volúmenes de aguas residuales (CLWW), que en algunos casos no cumplen las normas establecidas para su vertimiento a cuerpos de agua superficiales o sistemas de alcantarillado público (Pedroza-Camacho *et al.*, 2018).

Existen varios tipos de tratamientos para disminuir el efecto de la carga contaminante de estas CLWW. Procesos físicos como sistemas de filtración, resinas de intercambio iónico, químicos como la ozonización, proceso Fenton, procesos de floculación-coagulación (Barrios-Ziolo *et al.*, 2015) y biológicos; estos últimos se basan en la capacidad de diferentes microorganismos o de sus enzimas para degradar la materia orgánica presente en el agua residual para su propio crecimiento (Ferrer Polo *et al.*, 2018).

Algunos microorganismos son productores de lacasas (E.C. 1.10.3.2), que pueden catalizar la degradación de compuestos aromáticos, alifáticos, colorantes y contaminantes tóxicos por medio de la reducción de oxígeno molecular a agua (Rivera-

Hoyos *et al.*, 2013; Rivera-Hoyos *et al.*, 2015; Rivera-Hoyos *et al.*, 2018), estas enzimas son producidas generalmente por hongos de podredumbre blanca como *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum*, entre otros (Quevedo-Hidalgo *et al.*, 2015; Morales-Álvarez *et al.*, 2016; Morales-Álvarez *et al.*, 2017). La producción de lacasas heterólogas en *Pichia pastoris* constituye una opción importante como tratamiento secundario de aguas residuales (Piscitelli *et al.*, 2005; Rivera-Hoyos *et al.*, 2015).

Los tratamientos secundarios convencionales son eficientes para la remoción de contaminantes en aguas residuales; sin embargo, cuando finaliza el tratamiento se generan lodos secundarios. Los cuales se componen de agua, compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos (fase continua) y biomasa microbiana rica en sustancias poliméricas extracelulares (fase dispersa), (Ratkovich *et al.*, 2013). Parte de ellos se utilizan como cultivos iniciadores para mantener en operación continua los reactores biológicos (10-20 %) y el lodo restante se dispone como residuo sólido en rellenos sanitarios. Si este ha pasado por procesos de estabilización, es utilizado con fines agrícolas siempre y cuando cumpla con los criterios de calidad física, química y microbiológica (Environmental Protection Agency (EPA), 2005; Baily, 2009).

Por esta razón, se buscan alternativas de tratamiento biológico, como el uso de enzimas concentradas para disminuir y/o eliminar la producción de lodos secundarios. Las enzimas se emplean libres o inmovilizadas en diferentes soportes, para garantizar su estabilidad y actividad por largos períodos de tiempo (Ji *et al.*, 2017; Bilal *et al.*, 2019).

A partir del sobrenadante con la enzima obtenida en biorreactor de 10 L (Capítulo 4) se obtuvo el concentrado (Capítulo 6) para realizar la tratabilidad del CLWW. El objetivo de este capítulo fue la tratabilidad CLWW en biorreactor de 15 L (10 L Volumen efectivo de trabajo - VET) usando el concentrado de la enzima rPOXA 1B de *P. ostreatus* producida en *P. pastoris*.

7.2 Materiales y Métodos

7.2.1. Agua residual coloreada de laboratorio (CLWW) coloreada

Se utilizó CLWW a 1,500.00 unidades de color (UC) proveniente de un lote (Nº. 1810) de agua residual de los laboratorios de docencia e investigación de Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia ([Material Suplementario MS-7.1](#)). El CLWW a 1,500.00 UC y sus componentes teóricos (1,500.00 UC) fueron caracterizados en relación con el espectro UV/VIS para determinar la longitud de onda a la cual se obtenía la absorbancia máxima.

7.2.2. Concentrado de la enzima recombinante POXA 1B (rPOXA 1B)

Se utilizaron dos concentrados enzimáticos producidos con *P. pastoris* X33/pGAPZαA-*LaccPost-Stop* (Clon 1), producido en medio mejorado ([Ardila-Leal et al., 2019](#)). El concentrado 1 (11,713 UL⁻¹, pH 7.40 ± 0.20) fue utilizado en el proceso 1 (P1) y el concentrado 2 (41,273 UL⁻¹, pH 7.40 ± 0.20) fue utilizado en los procesos 2 y 3 (P2 y P3).

7.2.3 Tratamiento secundario del CLWW (1,500.00 UC) con el concentrado de la enzima libre rPOXA 1B (escala piloto)

La planta piloto de tratamiento consistió en un tanque de homogeneización, neutralización y mezcla de 20 L, seguido de un biorreactor de aireación prolongada (flujo turbulento y oxígeno disuelto > 1 mg L⁻¹) de 15 L con 10 L de volumen efectivo de trabajo (VET) a temperatura ambiente del laboratorio (~19 ± 3 °C) y con un tiempo de retención hidráulica de 72 h. Posteriormente el efluente fue filtrado por arena cuarcítica. La dosificación inicial de los lotes del concentrado de rPOXA 1B fue ~ 400 U L⁻¹. Se evaluaron 3 procesos (Batch, P1, P2 y P3) y se tomaron muestras cada 12 horas para determinar Demanda Química de Oxígeno (DQO) (mgL⁻¹), Sólidos Solubles Totales (SST) (mg L⁻¹), Carbono Orgánico Total (COT) (mg L⁻¹), Carbono Inorgánico (CI) (mg L⁻¹), Carbono Total (CT) (mg L⁻¹), Nitrógeno Total (NT) (mg L⁻¹), pH y los cambios en los espectros de absorción UV/VIS ([Pedroza-Camacho et al., 2018](#)).

7.2.4 Ensayos de germinación de *Lactuca sativa* L. y *Lolium perenne* L. “in vitro”

Se utilizaron cajas de Petri, cada una con un filtro Whatman N°. 3 saturados con 5 mL de efluente de cada uno de los procesos, así como soluciones control (agua destilada, CLWW y CLWW a 1,500 UC). Para los ensayos de germinación se depositaron 25 semillas de *Lactuca sativa* o *Lolium perenne* en cada caja; luego se colocaron sobre una servilleta húmeda y se cubrieron con papel aluminio para evitar la pérdida de humedad. Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente ($\sim 19 \pm 3$ °C) por 5 días, los ensayos fueron realizados por quintuplicado para cada especie (*Lactuca sativa* L. o *Lolium perenne*), (Bohórquez-Echeverry and Campos-Pinilla, 2007; Morales-Álvarez et al., 2016). Para cada organismo se calculó el porcentaje de germinación utilizando la Ecuación 7.1.

$$\% \text{ de germinación} = \frac{\text{Semillas germinadas}}{\text{Semillas totales}} \times 100 \quad [\text{Ec. 7.1}]$$

7.2.5 Técnicas analíticas

7.2.5.1. Espectrofotometría UV/VIS

Se determinaron los espectros UV/VIS para cada una de las muestras previas y posterior a los tratamientos, con el objetivo de evaluar los cambios en los espectros de absorción de compuestos coloreados en la muestra, utilizado un espectrofotómetro OPTIZEN Mecasys.

7.2.5.2. Determinación de unidades de color (UC)

Las UC se determinaron midiendo las soluciones a diferentes longitudes de onda, utilizando la Ecuación 7.2, (Livernoche et al., 1983):

$$UC = \frac{A_1 \times 500}{0.132} \quad [\text{Ecuación 7.2}]$$

Donde: A_1 es absorbancia a la longitud de onda a la cual la absorbancia fue máxima para el CLWW o para a solución de un colorante y 0.132 es la ABS_{465nm} de una solución estándar de platino-cobalto a 500.00 UC (Livernoche et al., 1983).

7.2.5.3. Determinación de SST

Se determinó la concentración (mgL^{-1}) de sólidos suspendidos totales (SST) empleando el método 2540 D de Standard Methods para el análisis de agua y agua residual (Rice, 2017).

7.2.5.4. Determinación de DQO

Se empleó un kit comercial HACH basado en el método 8000 de HACH y se leyó a una longitud de onda de 620 nm, en espectrofotómetro de la marca HACH usando como blanco el tubo de DQO con agua destilada en lugar de agua residual. El rango de detección de la técnica oscila entre 0 y 15,000 mgL^{-1} .

7.2.5.5. Determinación de COT, CI, CT y NT

Se midió la concentración de materia orgánica (MO) de los efluentes de cada ciclo y proceso a la hora 0 y postfiltración utilizando un analizador de TOC (Shimadzu TOC-L *total organic carbon analyzer*), este equipo desarrolla un método de oxidación catalítica de combustión y NDIR, de acuerdo con el Método Estándar 5310B (Rice, 2017).

7.2.5.6. Determinación de pH

Se midió el pH del efluente y el afluente utilizando un pHmetro JENWAY.

7.2.5.7. Determinación de la actividad lacasa

La actividad Lacasa (UL^{-1}) fue monitoreada por el cambio en la absorbancia a 420 nm ($\epsilon_{420}=36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), causado por la oxidación de ABTS en tampón citrato 0.1 M (pH 3.0 ± 0.2). 2 μL de muestra fueron adicionados a 898 μL de tampón citrato 0.1 M y 100 μL of ABTS 20 mM a temperatura ambiente (25 °C). La formación de un radical de color verde fue seguida espectroscópicamente durante 1 minuto. La solución blanco contenía 2 μL de agua destilada, 898 μL de tampón citrato 0.1 M y 100 μL de ABTS 20 mM, Ecuación 7.3.

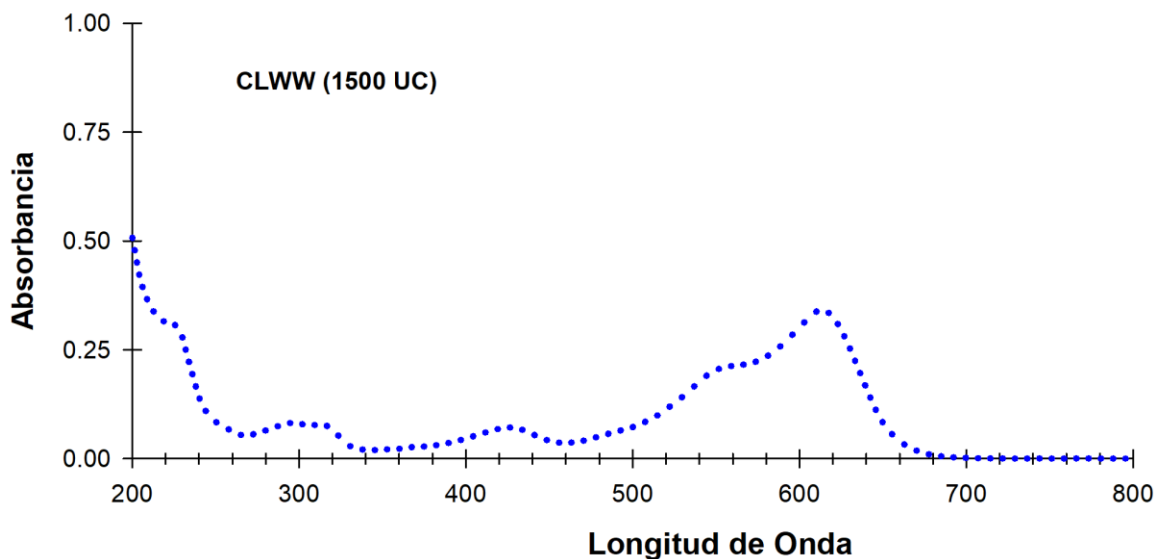
$$UL^{-1} = \frac{(\Delta E \times V_t)}{(\epsilon \times d \times V_s)} \quad \text{[Ecuación 7.3]}$$

Donde: ΔE corresponde a la diferencia entre la absorbancia final e inicial despues de 1 minute of reaction, V_t corresponde al volumen total de la reacción (mL), ϵ refiere al coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), d es la longitud de la cubeta in cm y V_s es el volumen de la muestra (mL) contenida en la reacción.

7.3 Resultados

7.3.1 Caracterización UV/VIS del CLWW y sus componentes teóricos

En la [Figura 7.1](#) se presenta los espectros UV/VIS del (1,500.00 UC); afluente utilizado para los tratamientos con *P. pastoris* X33/pGAPZ α A-LaccPost-Stop (Clon 1) inmovilizada en perlas de alginato de Ca²⁺ y con el concentrado de la enzima rPOXA 1B libre.



[Figura 7.1](#) Espectros de absorción UV/VIS CLWW. CLWW a 1500.00 UC.

7.3.2 Tratamiento secundario del CLWW (1,500.00 UC) con el concentrado de la enzima rPOXA 1B (reactor 15 L)

En la [Figuras 7.2 A, B y C](#), se presentan los espectros de absorción UV/VIS para los tres procesos de tratamiento de CLWW (1,500.00 UC, afluente) con la enzima rPOXA 1B, así como los porcentajes de remoción de algunos parámetros de vertimiento del CLWW después de tratada (efluente).

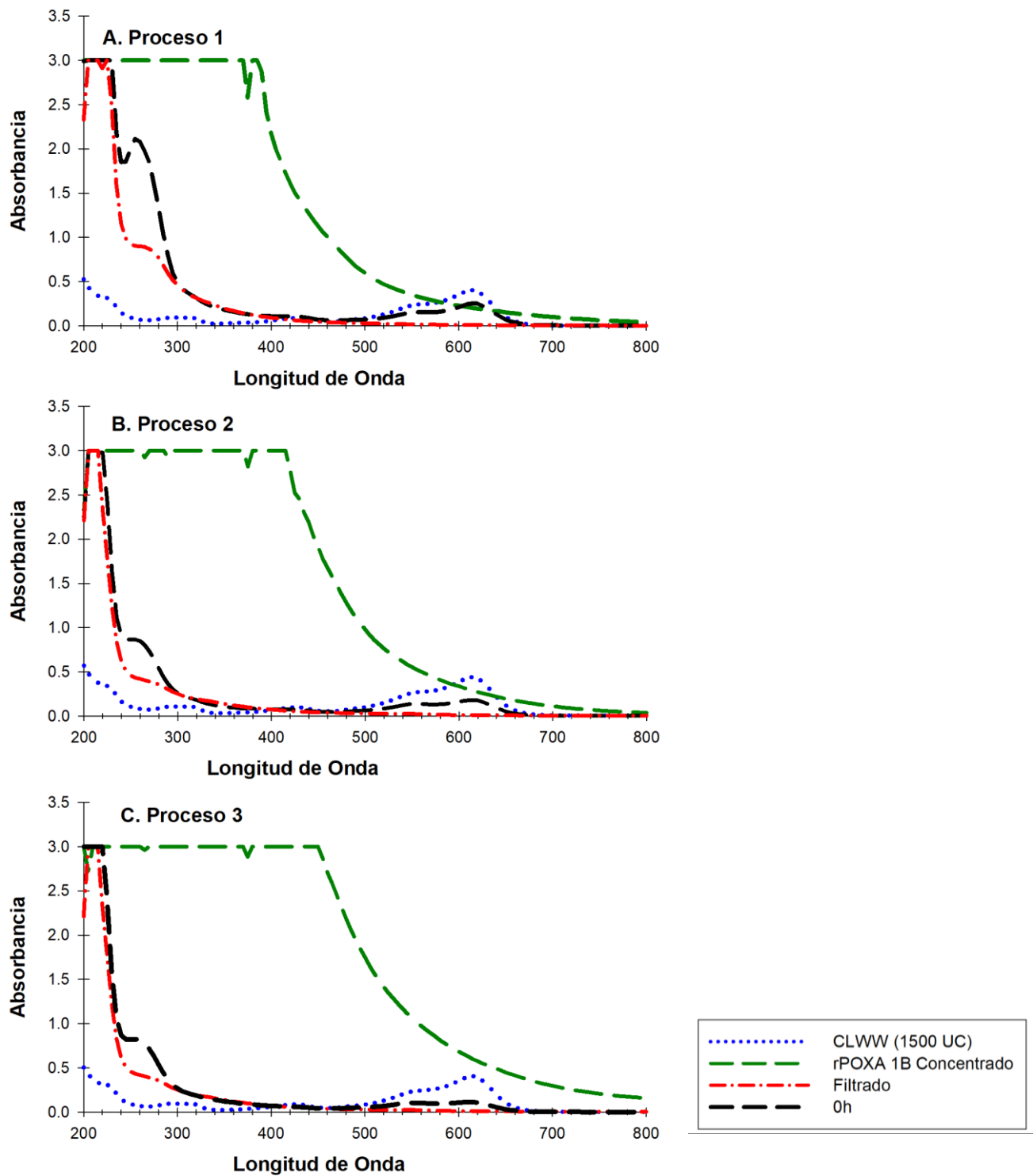


Figura 7.2 Comportamiento de los 3 procesos de tratamiento del CLWW (1,500.00 UC) con el concentrado de rPOXA 1B. A, B y C) Espectros de absorción UV/VIS de P1, P2 y P3, respectivamente.

En los tres procesos de tratamiento el espectro UV/VIS mostró la disminución de la señal de absorbancia (casi a 0) en la zona VIS (400 – 800 nm) como consecuencia de la presencia de la enzima rPOXA 1B (Figuras 7.2 A, B y C); también se observa en los tres procesos un incremento en la absorbancia en la zona UV (200 - 400 nm) a las 73 h de tratamiento con relación a la señal en la misma zona del CLWW (1,500.00 UC); sin embargo, la señal fue disminuyendo al cambiar del P1 a P2 (P1>P2=P3).

La actividad enzimática promedio entre los tres procesos al inicio del tratamiento fue $401.23 \pm 6.83 \text{ U L}^{-1}$ y después de las 73 horas de tratamiento fue de $296.60 \pm 12.29 \text{ U L}^{-1}$; sin embargo, hubo oscilaciones durante las horas de tratamiento. En la Tabla 7.1 se presentan los parámetros de calidad del CLWW (1,500.00 UC, afluente) y el efluente de los diferentes procesos de tratamiento.

Tabla 7.1 Comportamiento de los parámetros de vertimiento de los diferentes procesos de tratamiento de CLWW (1500.00 UC) con el concentrado de la enzima rPOXA 1B.

Procesos		Parámetros de descarga								
		COT (mg L ⁻¹)	CT (mg L ⁻¹)	CI (mg L ⁻¹)	NT (mg L ⁻¹)	UC	DQO (mg L ⁻¹)	COT/NT	DQO/COT	pH
P1	0 h	420.06 ± 9.53	481.20 ± 11.03	61.14 ± 1.50	205.37 ± 6.71	1,500.00 ± 0.00	1,865.00 ± 49.49	2.05	4.44	6.96 ± 0.20
	74 h	273.71 ± 5.08	332.80 ± 6.79	59.09 ± 1.71	198.53 ± 6.11	49.24 ± 3.79	840.00 ± 84.85	1.38	3.07	7.97 ± 0.20
	% Remoción	34.84 ± 0.27	30.84 ± 0.18	3.36 ± 0.43	3.32 ± 1.48	96.72 ± 0.25*	55.00 ± 3.36	N/A	N/A	N/A
P2	0 h	172.53 ± 2.81	210.70 ± 4.10	38.49 ± 1.07	112.94 ± 0.59	1,500.00 ± 0.00	885.00 ± 77.78	1.53	5.13	7.16 ± 0.20
	74 h	112.16 ± 0.68	134.64 ± 0.08	22.48 ± 0.76	104.25 ± 5.08	44.19 ± 35.36	345.00 ± 35.36	1.08	3.08	7.65 ± 0.20
	% Remoción	34.98 ± 1.45	36.09 ± 1.20	41.11 ± 0.02	8.85 ± 5.23	97.05 ± 0.15*	60.69 ± 7.45	N/A	N/A	N/A
P3	0 h	155.81 ± 0.41	191.70 ± 2.21	36.29 ± 1.45	105.12 ± 1.07	1,500.00 ± 0.00	785.00 ± 35.36	1.48	5.04	7.19 ± 0.20
	74 h	101.61 ± 2.70	129.64 ± 3.71	27.61 ± 1.69	103.35 ± 1.43	53.03 ± 0.00	360.00 ± 14.14	0.98	3.54	7.90 ± 0.20
	% Remoción	34.79 ± 1.56	32.89 ± 1.67	23.98 ± 1.69	1.77 ± 0.91	96.47 ± 0.00*	54.05 ± 3.87	N/A	N/A	N/A

N/A: no aplica, *porcentaje calculado a partir de las 1500.00 UC con que se inició el tratamiento.

7.3.3 Ensayos de germinación

En la [Figura 7.3](#) se presenta el promedio del porcentaje de germinación (cinco réplicas) de los efluentes y cada uno de los controles. En la figura se observa que el CLWW (25,750 UC) fue el único afluente que tuvo un porcentaje de germinación bajo (76.0 % para *Lolium perenne* y 68.6 % para *Lactuca sativa*); los demás ensayos realizados mostraron porcentajes de germinación entre 92 % y 100 %.

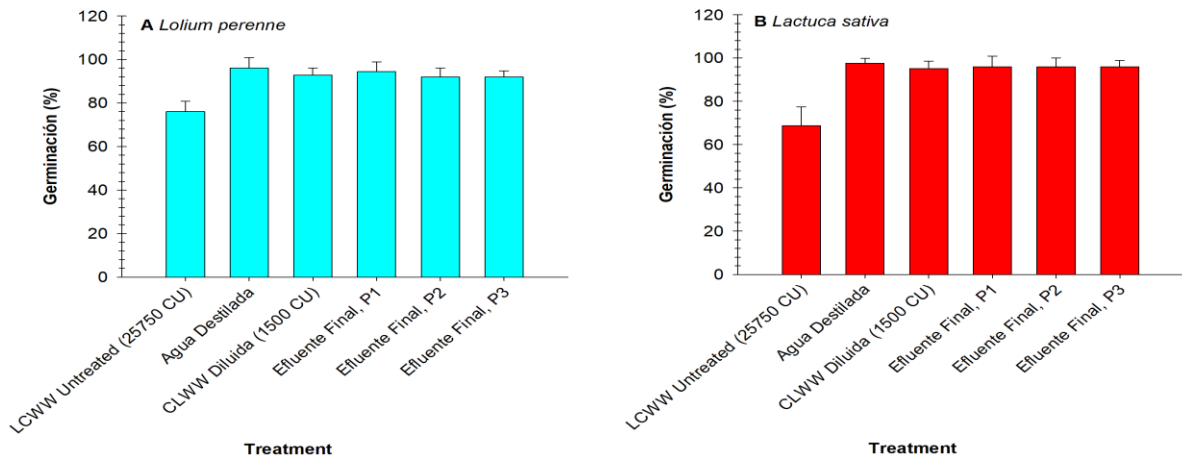


Figura 7.3 Porcentaje de germinación. A) *Lolium perenne* L. B) *Lactuca sativa* L.

7.4 Discusión

7.4.1. Tratamiento secundario del CLWW (1,500.00 UC) con el concentrado de la enzima rPOXA 1B (escala piloto)

En la Figuras 7.2 A, B y C, se observan las tendencias del espectro de absorción de los tres procesos de tratamiento. En la 0 h se observó el incremento en el patrón de absorción de la zona UV (200 – 400 nm), como consecuencia de la adición del concentrado enzimático. Este incremento, fue mayor en el proceso 1 ya que se utilizó el lote 1 de rPOXA 1B y se necesitó un volumen 330 mL para una actividad enzimática inicial de $\sim 400 \text{ U L}^{-1}$, en comparación con los procesos 2 y 3 donde se empleó el lote 2 de rPOXA 1B del cual se utilizaron 88 mL para lograr la misma actividad inicial ($\sim 400 \text{ U L}^{-1}$). En sentido general, el aumento de la absorbancia en la zona UV (0 h) puede deberse a la materia orgánica incorporada con la adición del concentrado enzimático.

Al final de cada proceso, la absorbancia y el perfil espectral en la zona UV (200 - 400 nm) fue mayor al del CLWW (1,500.00 UC); lo que puede estar relacionado con la transformación de compuestos complejos y/o aromáticos que absorbían en la zona VIS y que cambiaron su conformación a compuestos sencillos y alifáticos con absorbancias máximas en la zona UV (200 – 400 nm), (Langergraber *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2016; Morales-Álvarez *et al.*, 2016; Blanco-Vargas *et al.*, 2018; Pedroza-Camacho *et al.*, 2018), pero también pudo deberse a los residuos de materia orgánica en el biorreactor, ya que en 72 h de tratamiento no fue posible reducir al 100 % la carga orgánica incorporada con el concentrado de rPOXA 1B, causado probablemente por la baja carga microbiana que contenía el tratamiento.

En los tres procesos con rPOXA 1B, hubo un efecto instantáneo de decoloración a la 0 h, disminuyendo de 1,500.00 UC a 1041.66, 652.77 y 597.22 UC para los procesos 1, 2 y 3, respectivamente (Figuras 7.2 A, B, C). En todos los procesos de tratamientos (P1, P2 y P3) se observó que la absorbancia en la zona VIS disminuyó considerablemente después de las 72 h, con remociones de color de 96.71, 97.05 y 96.46 % respectivamente (Tabla 7.1).

Los parámetros de vertimiento de los diferentes procesos (DQO, COT, CT, CI y NT), (Tabla 7.1) muestran que la cantidad de concentrado enzimático aporta materia orgánica al medio (componentes residuales del concentrado), pues en todos los procesos presentaron valores mayores a la 0 h, en comparación a los obtenidos en el CLWW (1,500.00 UC), (Figuras 7.2 A, B y C); donde, también se observa que los porcentajes de remoción de COD y TOC fueron similares en los tres procesos.

En los procesos (P1, P2 y P3) la relación COT/NT (Tabla 7.1) disminuyó entre la 0 h y las 73 h. Por otra parte, la relación DQO/COT también disminuyó, pero con relaciones finales (73 h) superiores a 2.5 (Guedes *et al.*, 2003), lo que podría demostrar la disminución de subproductos complejos después del tratamiento (Bilinska *et al.*, 2016), causada por la mineralización de los colorantes y/o de los componentes residuales del concentrado enzimático. El pH en los tres procesos mantuvo un comportamiento relativamente neutro y debido a que no fue necesario realizar procedimientos de floculación no se observaron variaciones en el pH.

Durante los tres procesos (P1, P2 y P3) la actividad enzimática osciló entre 289.81 ± 3.21 y 415.33 ± 5.86 U L⁻¹, pero después de la filtración por arena cuarcítica, bajó en todos los procesos, oscilando entre 282.40 ± 3.21 y 303.70 ± 8.49 , causado por la adsorción de la enzima a la arena cuarcítica (Jada *et al.*, 2006).

En sentido general los resultados mostraron la capacidad de eliminar más del 90 % de las UC con ambos tratamientos. El tratamiento de CLWW con células inmovilizadas demostró que pueden ser reutilizadas (216 horas), sin perder la capacidad de remoción, lo cual representa una ventaja tecnológica al no requerirse la preparación de células inmovilizadas para cada tratamiento y abre las puertas hacia la posibilidad de implementar un sistema continuo para el tratamiento de este tipo de CLWW. Por otra parte, el tratamiento del CLWW (1,500.00 UC) con 400 U L⁻¹ de rPOXA 1B también fue

exitoso en la decoloración, obteniendo > 96 % de remoción sin importar el volumen de concentrado enzimático incorporado.

A pesar de que los procesos removieron > 96 % del color, la remoción de la materia orgánica sólo alcanzó entre el 54.05 y 60.69 % en los procesos, por lo que las aguas residuales obtenidas a partir de los tratamientos pueden contener los nutrientes (fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo) necesarios para un tratamiento terciario, como el uso de microalgas (Malvis *et al.*, 2019).

7.4.2 Ensayos de germinación “*in vitro*” de *Lactuca sativa* L., y *Lolium perenne* L.

Lactuca sativa L. es un organismo modelo para el desarrollo de bioensayos (Bohórquez-Echeverry and Campos-Pinilla, 2007) y *Lolium perenne* L., es un organismo modelo establecido en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos del Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia para el desarrollo de pruebas de irrigación (Pedroza-Camacho *et al.*, 2018).

Es importante resaltar que se realizó una prueba de germinación más no de toxicidad, pues, esta última depende en gran medida del indicador vegetal utilizado y del diseño del ensayo, demostrado por la variación de sensibilidad entre diferentes especies a causa de la toxicidad de los efluentes (Priac *et al.*, 2017). En la Figura 7.1, se observa que los efluentes tuvieron porcentajes de germinación altos debido a la disminución de la carga contaminante. No obstante, las CLWW (1,500 UC) presentaron porcentajes de germinación igualmente altos, sugiriendo que el efluente contiene iones, nanopartículas y microelementos que proporcionan a las semillas nutrientes para germinar (Bohórquez-Echeverry and Campos-Pinilla, 2007; Lin and Xing, 2007; Gharbia *et al.*, 2016; Tomacheski *et al.*, 2017; Pedroza-Camacho *et al.*, 2018). El alto porcentaje de germinación en los efluentes de los procesos P1, P2 y P3 demuestra que los mecanismos de biotransformación disminuyeron en alguna medida el efecto adverso ejercido por los contaminantes residuales sobre la semilla (Morales-Álvarez *et al.*, 2016; Pedroza-Camacho *et al.*, 2018).

Estos resultados indican preliminarmente que el efluente generado podría ser reutilizado como agua riego (jardín); no obstante, [Morales-Álvarez et al \(2016\)](#) proponen la reutilización de los efluentes en la elaboración de tinciones de Gram u otras tinciones especializadas, ya que los niveles de conductividad y sólidos disueltos no afectan la calidad de las tinturas. Sin embargo, también podría pensarse en el uso de los efluentes para diluir lote original de CLWW para ajustarlo a 1,500 UC antes de comenzar el tratamiento.

7.5 Conclusiones

En este capítulo se presentó el uso exitoso la enzima rPOXA 1B para el tratamiento secundario a escala piloto de CLWW. En el tratamiento secundario con el concentrado de la enzima libre rPOXA 1B, el porcentaje de decoloración fue > 96 %; demostrando que el sistema tiene la ventaja de incorporar niveles bajos de materia orgánica. Los resultados muestran una alternativa promisorio para el tratamiento de CLWW; proceso que puede reajustarse para tratar CLWW con características químicas iniciales diferentes a las utilizadas en este estudio. Además, los efluentes filtrados de todos los procesos lograron un porcentaje de germinación >95 % (*Lactuca sativa* y *Lolium perenne*); demostrando que pueden ser utilizados como agua de riego.

7.6 Referencias

- Ardila-Leal, L.D., D.A. Albarracín-Pardo, C.M. Rivera-Hoyos, E.D. Morales, R.A. Poutou-Piñales, *et al.*, (2019). Media improvement for 10 L bioreactor production of rPOXA 1B laccase by *P. pastoris*. **3Biotech**, 9 (12): Article 447. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-019-1979-y>
- Baily, R.E., (2009) Sludge: Types, treatment processes and disposal. Nova Science Publishers, Inc, Hauppauge, New York.
- Barrios-Ziolo, L.F., L.F. Gaviria-Restrepo, E.A. Agudelo and S.A. Cardona-Gallo, (2015). Technologies for the removal of dyes and pigments present in wastewater. A review. **Dyna**, 82 (191): 118-126. <http://dx.doi.org/10.15446/dyna.v82n191.42924>
- Bilal, M., S.S. Ashraf, D. Barceló and H.M.N. Iqbal, (2019). Biocatalytic degradation/redefining “removal” fate of pharmaceutically active compounds and antibiotics in the aquatic environment. **Science of the Total Environment**, 691: 1190-1211. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.224>
- Bilinska, L., M. Gmurek and S. Ledakowicz, (2016). Comparison between industrial and simulated textile wastewater treatment by AOPs – Biodegradability, toxicity and cost assessment. **Chemical Engineering Journal**, 306: 550-559. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.07.100>
- Blanco-Vargas, A., C.F. Ramírez-Sierra, M. Duarte-Castañeda, M. Beltrán-Villarraga, L.K. Medina, *et al.*, (2018). A novel textile wastewater treatment using ligninolytic co-culture and photocatalysis with TiO₂. **Universitas Scientiarum**, 23 (3): 437-464. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.SC23-3.antw>
- Bohórquez-Echeverry, P. and C. Campos-Pinilla, (2007). Evaluación de *Lactuca sativa* y *Selenastrum capricornutum* como indicadores de toxicidad en agua. **Universitas Scientiarum**, 12 (2): 83-98.
- Deblonde, T., C. Cossu-Leguille and P. Hartemann, (2011). Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. **Int J Hyg Environ Health.**, 214: 442-448. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002>
- Environmental Protection Agency (EPA), (2005) Biosolids generation, use, and disposal in the United States. EPA, United States, p. 74.
- Fernández, J.A., A. Suan, J.C. Ramírez, J. Robles, J.C. Salcedo, *et al.*, (2016). Treatment of real wastewater with TiO₂-films sensitized by a natural-dye obtained from *Picramnia sellowii*. **J. Environ. Chem. Eng.**, 4: 2848-2856. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2016.05.037>
- Ferrer Polo, J., A. Seco Torrecillas and A. Robles Martínez, (2018) Tratamientos biológicos de las aguas residuales, 3ra ed. Editorial UPV, Valencia, España.
- Ferrera-Cerrato, R., N.G. Rojas-Avelizapa, H.M. Poggi-Varaldo, A. Alarcón and R.O. Cañizares-Villanueva, (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, 48 (2): 179-187.
- Gharbia, S.S., A. Aish, T. Abushbak, G. Qishawi, I. Al- Shawa, *et al.*, (2016). Evaluation of wastewater post-treatment options for reuse purposes in the agricultural sector under rural development conditions. **Journal of Water Process Engineering**, 9: 111-122. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jwpe.2015.12.003>

- Guedes, A.M.F.M., L.M.P. Madeira, R.A.R. Boaventura and C.A.V. Costa, (2003). Fenton oxidation of cork cooking wastewater—overall kinetic analysis. **Water Research**, 37: 3061–3069. [http://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00178-7](http://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00178-7)
- Jada, A., R. Ait Akbour and J. Douch, (2006). Surface charge and adsorption from water onto quartz sand of humic acid. **Chemosphere**, 64: 1287–1295. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.12.063>
- Ji, C., L.N. Nguyen, J. Hou, F.I. Hai and V. Chen, (2017). Direct immobilization of laccase on titania nanoparticles from crude enzyme extracts of *P. ostreatus* culture for micro-pollutant degradation. **Separation and Purification Technology**, 178: 215-223. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.043>
- Langergraber, G., N. Fleischmann, F. Hofstaedter and A. Weingartner, (2004). Monitoring of a paper mill wastewater treatment plant using UV/VIS spectroscopy. **Water Science and Technology**, 49 (1): 9-14.
- Lin, D. and B. Xing, (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. **Environmental Pollution**, 150: 243-250. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.016>
- Livernoche, D., L. Jurasek, M. Desrochers and J. Dorica, (1983). Removal of color from Kraft mill wastewater with cultures of white rot fungi and with immobilized mycelium of *Coliorus versicolor*. **Biotechnology and Bioengineering** 24 (8): 2055-2065.
- Malvis, A., G. Hodaifa, M. Halioui, M. Seyedsalehi and S.a. Sanchez, (2019). Integrated process for olive oil mill wastewater treatment and its revalorization through the generation of high added value algal biomass. **Water Research**, 151: 332-342. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.026>
- Morales-Álvarez, E.D., C.M. Rivera-Hoyos, L.E. Chaparro-Núñez, C.E. Daza, R.A. Poutou-Piñales, *et al.*, (2017). Decolorization and detoxification of Malachite Green by *Ganoderma lucidum*: key operating parameters and adsorption studies. **Journal of Environmental Engineering**, 143 (4): 04016093. [http://dx.doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001180](http://dx.doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001180)
- Morales-Álvarez, E.D., C.M. Rivera-Hoyos, N. González-Ogliastri, R. Rodríguez-Vázquez, R.A. Poutou-Piñales, *et al.*, (2016). Partial removal and detoxification of Malachite Green and Crystal Violet from laboratory artificially contaminated water by *Pleurotus ostreatus*. **Universitas Scientiarum**, 21 (3): 259-285. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.SC21-3.prad>
- Pedroza-Camacho, L.D., J.C. Lores-Acosta, J.F. Rojas-Enríquez, J.F. Mateus-Maldonado, C.S. Puentes, *et al.*, (2018). Effect of domestic wastewater as co-substrate on biological stain wastewater treatment using fungal/Bacterial consortia in pilot plant and greenhouse reuse. **Journal of Water Resource and Protection**, 10: 369-393. <http://doi.org/10.4236/jwarp.2018.103020>
- Piscitelli, A., P. Giardina, C. Mazzoni and G. Sannia, (2005). Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**, 69: 428-439.
- Priac, A., P.-M. Badot and G. Crini, (2017). Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies**, 340: 188-194. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crvbi.2017.01.002>

- Quevedo-Hidalgo, B., P.C. Narváez-Rincón, A.M. Pedroza-Rodríguez and M.E. Velásquez-Lozano, (2015). Production of lignocellulolytic enzymes from floriculture residues using *Pleurotus ostreatus*. **Universitas Scientiarum**, 20 (1): 117-127. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-1.eple>
- Ratkovich, N., W. Horn, F.P. Helmus, S. Rosenberger, W. Naessens, *et al.*, (2013). Activated sludge rheology: A critical review on data collection and modelling. **Water Research**, 47: 463-482. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.021>
- Rice, E.W., (2017) Standard methods for the examination of water and wastewater 2540 A, 23rd ed. Water Environment Federation.
- Rivera-Hoyos, C.M., E.D. Morales-Álvarez, J. Abelló-Esparza, D.F. Buitrago-Pérez, N. Martínez-Aldana, *et al.*, (2018). Detoxification of pulping black liquor with *Pleurotus ostreatus* or recombinant *Pichia pastoris* followed by CuO/TiO₂/visible photocatalysis. **Scientific Report**, 8: 3503. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-21597-2>
- Rivera-Hoyos, C.M., E.D. Morales-Álvarez, R.A. Poutou-Piñales, A.M. Pedroza-Rodríguez, R. Rodríguez-Vázquez, *et al.*, (2013). Fungal laccases. **Fungal Biol Rev**, 27 (3-4): 67-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2013.07.001>
- Rivera-Hoyos, C.M., E.D. Morales-Álvarez, S.A. Poveda-Cuevas, E.A. Reyes-Guzmán, R.A. Poutou-Piñales, *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): e0116524. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116524.g002>
- Tomacheski, D., M. Pittol, D.N. Simões, V.F. Ribeiro and R.M.C. Santana, (2017). Impact of silver ions and silver nanoparticles on the plant growth and soil microorganisms. **Global Journal of Environmental Science and Management**, 3 (4): 341-350. <http://dx.doi.org/10.22034/gjesm.2017.03.04.001>

7.7 Material Suplementario

Ensayo de tratamiento de CLWW a diferentes Unidades de Color (UC) con células inmovilizadas de *P. pastoris* X33/pGAPZ α A-LaccPost-Stop (Clon 1) en alginato de Ca²⁺, antecedente para la selección de las UC.

Metodología material suplementario MS 7.1

Se realizaron ensayos a diferentes UC del CLWW para seleccionar la más favorable y utilizarla en los tratamientos a escala piloto. A partir del lote 1810 de agua residual del Departamento de Microbiología, se prepararon soluciones con 300.00, 1,200.00 y 2,300.00 UC. Las UC se determinaron midiendo las soluciones a una longitud de onda de 614 nm y utilizando la [Ecuación MS-7.1 \(Livernoche et al., 1983\)](#):

$$UC = \frac{A_1 \times 500}{0.132} \text{ [Ecuación MS-7.1]}$$

Donde: A1 es absorbancia del efluente a 614 nm y 0.132 es la ABS_{465nm} de una solución estándar de platino-cobalto a 500.00 UC ([Livernoche et al., 1983](#)).

Se tomaron 25 mL de cada una estas soluciones para cada uno de los ensayos a realizar en Erlenmeyer de 100 mL. Cada ensayo se realizó por triplicado, cada uno contó con un control 1 (sólo solución de CLWW [C1]), control 2 con perlas de Alginato de Ca²⁺ (CLWW más perlas de alginato Ca²⁺ [C2]) y por último, el tratamiento 1 (solución de colorantes más *Pichia pastoris* X33/pGAPZ α A-LaccPost-Stop (Clon 1) inmovilizada en perlas de alginato Ca²⁺ [T1]), los Erlenmeyer fueron incubados a 30 °C a 150 rpm, con monitoreo fotográfico cada 24 horas, el muestreo se realizó al principio (0 h) y al final del ensayo (144 h), para la medición de UC y de la actividad enzimática a la 144 h

Resultados

A continuación, se presentan los ensayos de selección de UC realizados a escala de Erlenmeyer (Figura MS-7.1) los cuales permitieron establecer las UC del CLWW a utilizar en el tratamiento en planta a escala piloto. En la Figura MS-7.1, se observa que los ensayos que disminuyeron notablemente el color después de las 144 h de tratamiento fueron los realizados a 300.00 y 1,200.00 UC, con porcentajes de decoloración del 60.53 y 73.16 % respectivamente (Tabla MS-7.1).

En todos los ensayos se realizó después de las 144 h la determinación de la actividad enzimática, sin embargo, no fue detectada en ninguno de los tratamientos evaluado.



Figura MS-7.1. Monitoreo fotográfico. Tiempos 0 y 144 h de los tratamientos de CLWW a 300.00, 1,200.00 y 2,300.00 UC, respectivamente.

Tabla MS-7.1 Porcentajes de decoloración del CLWW después de 144 h de tratamiento con perlas de alginato de Ca²⁺ y *P. pastoris* X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop (Clon 1) inmovilizadas en perlas de alginato de Ca²⁺.

CLWW, Unidades de Color (UC)	Tratamiento	% Decoloración (144 h)
~300.00	C1	0.00
	C2	7.89
	T1	60.53
~1,200.00	C1	0.00
	C2	14.38
	T1	73.16
~2,300.00	C1	0.00
	C2	7.97
	T1	1.95

C1: CLWW

C2: CLWW + Perlas de alginato de Ca²⁺,

T1: CLWW + Perlas de alginato de Ca²⁺ con *P. pastoris* X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop(Clon 1).

Discusión

La [Figura MS-7.1](#) y la [Tabla MS-7.1](#), muestran que hasta 1,200.00 UC se pudo obtener ~73 % remoción de color, y que la remoción disminuyó drásticamente a 2,300.00 UC. La remoción de color obtenida en estos ensayos está soportada por tres factores, i) el alto potencial redox de la rPOXA 1B ([Roman et al., 2010](#); [Mendoza et al., 2011](#); [Drumond Chequer et al., 2013](#); [Rivera-Hoyos et al., 2013](#); [El-Batal et al., 2015](#); [Morales-Álvarez et al., 2016](#)), ii) la adsorción generada por la presencia de perlas de alginato de calcio (Fig. S1) y las células planctónicas de *P. pastoris* X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop (Clon 1), ([Gouzy-Olmos et al., 2018](#)).

La baja remoción de color obtenida a 2,300.00 UC podría deberse a factores como, i) saturación de la matriz de alginato de calcio, ii) necesidad de más tiempo de tratamiento y iii) posible toxicidad del CLWW sobre las células de *P. pastoris* X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop (Clon 1) inmovilizadas. Experimentalmente se habría podido estudiar la influencia del tiempo sobre el porcentaje de decoloración, pero intentar exceder las 144 h del ensayo no es factible para la industria pues sería un proceso demasiado extenso, más costoso y por lo tanto, poco atractivo, sobre todo si se trata de un proceso batch en una industria con un caudal de desechos líquidos elevado.

Considerando que la brecha entre 1200,00 y 2,300.00 UC era amplia, así como el posible efecto tóxico sobre la cepa recombinante, se decidió realizar todo el estudio a escala piloto, empleando CLWW diluida a UC intermedia (1,500.00 UC), tanto en los ciclos de tratamiento con células inmovilizadas en alginato de calcio como en los procesos con el concentrado de la enzima rPOXA 1B libre. Esta decisión presupone que en la práctica se va a requerir la dilución del afluente y ajustar las unidades de color a 1500.00; sin embargo, también es clara la posibilidad de reutilizar el efluente en la dilución del afluente a tratar, lo cual disminuiría considerablemente el gasto de agua.

La limitación en la determinación de la actividad puede ser causada a una baja difusión de la enzima, efecto que puede ser atribuido a la concentración del alginato ([Tanaka et al., 1984](#); [Won et al., 2005](#)). Los porcentajes de decoloración se presumen causados por

la actividad enzimática, debido a la diferencia entre la adsorción del colorante (control C2) y el tratamiento (T1) para las diferentes UC.

Referencias

- Drumond Chequer, F.M., G.A. Rodrigues de Oliveira, E.R. Anastácio Ferraz, J. Carvalho Cardoso, M.V. Boldrin Zanoni, *et al.*, (2013) Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact. *Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing*. Intech, pp. 151-176.
- El-Batal, A.I., N.M. ElKenawy, A.S. Yassin and M.A. Amin, (2015). Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles. **Biotechnology Reports**, 5: 31-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2014.11.001>
- Gouzy-Olmos, M., L.M. Cháves-Tequia, M.F. Rojas-Fajardo, E.D. Morales-Álvarez, C.M. Rivera-Hoyos, *et al.*, (2018). Statistical improvement of batch culture with immobilized *Pichia pastoris* cells for rPOXA 1B laccase production. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, 14 (2): 88-107. <http://dx.doi.org/10.3844/ajbbsp.2018.88.107>
- Livernoche, D., L. Jurasek, M. Desrochers and J. Dorica, (1983). Removal of color from Kraft mill wastewater with cultures of white rot fungi and with immobilized mycelium of *Coliorus versicolor*. **Biotechnology and Bioengineering** 24 (8): 2055-2065.
- Mendoza, L., M. Jonstrup, R. Hatti-Kaul and B. Mattiasson, (2011). Azo dye decolorization by a laccase/mediator system in a membrane reactor: Enzyme and mediator reusability. **Enzyme and Microbial Technology**, 49: 478-484. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.08.006>
- Morales-Álvarez, E.D., C.M. Rivera-Hoyos, N. González-Ogliastri, R. Rodríguez-Vázquez, R.A. Poutou-Piñales, *et al.*, (2016). Partial removal and detoxification of Malachite Green and Crystal Violet from laboratory artificially contaminated water by *Pleurotus ostreatus*. **Universitas Scientiarum**, 21 (3): 259-285. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.SC21-3.prad>
- Rivera-Hoyos, C.M., E.D. Morales-Álvarez, R.A. Poutou-Piñales, A.M. Pedroza-Rodríguez, R. Rodríguez-Vázquez, *et al.*, (2013). Fungal laccases. **Fungal Biol Rev**, 27 (3-4): 67-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2013.07.001>
- Roman, R., C. Torres Duarte, M. Ayala and R. Vazquez Duhalt, (2010). Producción a escala piloto de lacasa de *Coriolopsis gállica*. **Revista Mexicana de Micología**, 32: 19-27.
- Tanaka, H., M. Matsumura and I.A. Veliky, (1984). Diffusion Characteristics of Substrates in Ca-Alginate Gel Beads. **Biotechnology and Bioengineering**, XXVI: 053-058.
- Won, K., S. Kim, K.-J. Kim, H.W. Park and S.-J. Moon, (2005). Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. **Process Biochemistry**, 40: 2149-2154. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.08.014>



Tertiary treatment (*Chlorella* sp.) of a mixed effluent from two secondary treatments (immobilized recombinant *P. pastoris* and rPOXA 1B concentrate) of coloured laboratory wastewater (CLWW)

Leidy D. Ardila-Leal¹ · Valentina Hernández-Rojas¹ · Diana N. Céspedes-Bernal² · Juan F. Mateus-Maldonado² · Claudia M. Rivera-Hoyos^{1,2} · Lucas D. Pedroza-Camacho² · Raúl A. Poutou-Piñales¹ · Aura M. Pedroza-Rodríguez² · Alejandro Pérez-Florez³ · Balkys E. Quevedo-Hidalgo⁴

Received: 21 March 2020 / Accepted: 26 April 2020
© King Abdulaziz City for Science and Technology 2020

Abstract

Industrial development has increased wastewater (WW) volume; generating contamination and disturbing ecosystems, because of breaching disposal parameters. In this work, Coloured Laboratory Wastewater (CLWW), (1500.00 colour units, CU) was separately submitted to two secondary treatments. For the first one CLWW was treated for three cycles C1, C2 and C3 with *P. pastoris* X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop producing rPOXA 1B laccase, immobilized in calcium alginate beads. For the second-one, rPOXA 1B enzyme concentrate was used (three processes: P1, P2, and P3). Both treatments were carried out in a 15 L reactor with 10 L effective work volume (EWV) with 72 h hydraulic retention time. C1, C2, and C3 effluents were flocculated and filtered through quartzite sand, while P1, P2, and P3 effluents were only filtered through quartzite sand. The mixture of secondary effluents was submitted to a tertiary treatment with *Chlorella* sp. For C1, C2, C3, P1, P2, and P3, CU removal was of 99.16, 99.58, 99.53, 96.72, 97.05 and 96.47%, respectively. Discharge parameters, total organic carbon (TOC), inorganic carbon (IC), chemical oxygen demand (COD) and biological oxygen demand (BOD₅) decreased, although they reached different final values. After the tertiary treatment (144 h) effluent discharge parameters were reduced to 34 ± 4 CU, TOC to 6.6 ± 0.9 mg L⁻¹ and COD to 155 ± 4 mg L⁻¹. It was demonstrated that secondary treatments (immobilized recombined cells or recombinant enzyme concentrate) combined with *Chlorella* sp., (tertiary treatment) attained a considerable removal of discharge parameters, demonstrating a promissory alternative for CLWW sequential treatment.

Keywords Discolouration · *Pichia pastoris* · rPOXA 1B · *Chlorella* sp. · Laboratory coloured wastewater · Secondary treatment · Tertiary treatment

Abbreviations

WW Wastewater
CLWW Coloured Laboratory Wastewater

Leidy D. Ardila-Leal, Valentina Hernández-Rojas and Diana N. Céspedes-Bernal contributed equally to this work.

✉ Raúl A. Poutou-Piñales
rpoutou@javeriana.edu.co

✉ Aura M. Pedroza-Rodríguez
apedroza@javeriana.edu.co

¹ Laboratorio de Biotecnología Molecular, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Carrera 7ma No 43-82, Edificio 50 Lab. 124, Bogotá, D.C. Código Postal: 110-23, Colombia

² Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad

de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Carrera 7ma No 43-82, Edificio 50 Lab. 106, Bogotá, D.C. Código Postal: 110-23, Colombia

³ Grupo de Fitoquímica de la PUJ (GIFUJ), Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), Bogotá, D.C., Colombia

CU	Colour units
C1	Cycle 1
C2	Cycle 2
C3	Cycle 3
P1	Process 1
P2	Process 2
P3	Process 3
EWV	Effective work volume
TOC	Total organic carbon
IC	Inorganic carbon
COD	Chemical oxygen demand
BOD ₅	Biological oxygen demand
POXA 1B	Laccase from <i>P. ostreatus</i>
rPOXA 1B	Recombinant laccase from <i>P. ostreatus</i>
TSS	Total suspended solids
TN	Total nitrogen
CFU	Colony forming units
OM	Organic matter
Y	Yield
ABTS	2, 2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
SEM	Scanning electron microscopy
EDS	Energy dispersive X-ray spectroscopy
TDN	Total dissolved nitrogen
MP	Micropollutants
AOP	Advanced oxidation processes
TVA	Titania supported over volcanic ashes

Introduction

Over the past years, anthropogenic contamination has increased due to industrial development, resulting in considerable environmental impact, which has prompted the scientific community to develop new bioremediation processes. Biotechnological processes to treat wastewater is a major challenge because water sources have been contaminated with hydrocarbons (Ferrera-Cerrato et al. 2006), heavy metals (mercury, arsenic, and lead), emergent pollutants (persistent organic compounds, endocrine disruptors, antibiotics), organic matter and compounds such as dyes and pigments (Deblonde et al. 2011; Barrios-Ziolo et al. 2015).

Hospitals, universities, research centers among others use different dyes, such as basic fuchsin, carbol fuchsin, crystal violet, lactophenol blue, methylene blue, Congo red, eosin, malachite green, among others for biological stains. Annually these institutions produce coloured laboratory wastewater (CLWW), which in some cases do not comply with established norms for their disposal in superficial bodies of water or public sewer system (Pedroza-Camacho et al. 2018).

Several types of treatments exist to reduce the effect of CLWW pollutant load. Among them physical treatments can reduce the pollutant load by filtering systems. Other

treatments include ionic exchange resins, chemical treatment, such as ozonation, Fenton process, flocculation, and coagulation processes (Barrios-Ziolo et al. 2015). Last, biological processes are based on the capacity of microorganisms or their enzymes to degrade organic matter present in wastewater for their growth (Ferrer Polo et al. 2018).

Some microorganisms can produce laccase (E.C. 1.10.3.2) and *p*-diphenyl oxidases, enzymes, which are multicopper oxidases that catalyze aromatic and aliphatic compound degradation, as well as dyes and toxic pollutants by reducing molecular oxygen into water (Rivera-Hoyos et al. 2013, 2015, 2018). White-rot fungi generally produce these enzymes, such as *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma lucidum*, among others (Morales-Álvarez et al. 2016, 2017). Laccase production by native sources is inadequate to comply with environmental requirements. Therefore, its heterologous expression in yeast, such as *Saccharomyces cerevisiae* or *Pichia pastoris* becomes an important option as secondary wastewater treatment (Piscitelli et al. 2005; Rivera-Hoyos et al. 2015, 2018).

For wastewater, pollutant removal conventional secondary treatments are efficient. However, at the end of secondary treatment sludge is generated, which is composed of water, organic compounds and dissolved inorganic compounds (continuous phase) and microbial biomass, rich in extracellular polymeric substances (Ratkovich et al. 2013). Part of secondary treatment sludge is used as a starter culture (10–20%) to maintain the continuous operation of biological reactors; the remaining sludge is disposed of as solid waste in sanitary landfills. If sludge has undergone stabilization processes, it is selected for agricultural purposes as long as it complies with physical, chemical, and microbiological quality criteria (Environmental Protection Agency (EPA) 2005; Baily 2009).

Therefore, biological treatment alternatives are sought, such as the use of enzyme concentrates to decrease and/or eliminate secondary sludge production. Enzymes are employed free or immobilized in different supports materials to guarantee stability and activity for long periods (Ji et al. 2017; Bilal et al. 2019). For wastewater treatment polyphenol oxidase (E.C. 1.10.3.1) is distinct among a group of commercial enzymes, as well as various peroxidases (E.C. 1.11.1). These enzymes catalyze the oxidation of phenolic and non-phenolic compounds, have low specificity and are stable under different physical and chemical conditions (Chang et al. 2015; Ji et al. 2017; Kashefi et al. 2019). However, oxidation processes undertaken by these proteins can produce intermediates with less degree of complexity, colour or ions dissolved as sulphates, nitrates, nitrites, and phosphates (Abdel-Kareem 2012; Rivera-Hoyos et al. 2018). An alternative to remove all of these constituents is to implement a tertiary treatment with microalgae (Arias et al. 2018; Li et al. 2019).

Microalgae use organic/inorganic carbon (mixotrophic culture conditions), inorganic nitrogen and phosphorous, for their growth. Moreover, they eliminate heavy metals and remove dyes (Khandare and Govindwar 2015; Ditta et al. 2016). The mechanisms by which microalgae perform these bioremediation processes take place in two stages: an initial physicochemical process independent of metabolic processes, where the algae adsorb pollutant by its cell wall. Following, processes of bioaccumulation and biotransformation take place mediated by an ample gamut of enzymes (Fazal et al. 2018). Once microalgae have performed this tertiary treatment its biomass can be employed as biofertilizer, for the extraction of bioproducts, and can be thermally transformed for biochar production (Yu et al. 2017; Santos and Pires 2018). Hence, they can integrate CLWW or industrial treatment systems into low circular economy models, such as biorefinery. Consequently, improving wastewater treatment and generating higher value-added bioproducts.

The objective of this work was to implement and compare two secondary treatments [*Pichia pastoris* X33/pGAPZαA-*LaccPost-Stop* (Clone 1), producing rPOXA 1B, immobilized in calcium alginate beads (Gouzy-Olmos et al. 2018) and free enzyme concentrate rPOXA 1B concentrate (Rivera-Hoyos et al. 2015; Ardila-Leal et al. 2019)] for CLWW (1500.00 CU) discoloration, followed by a tertiary treatment with *Chlorella* sp., to complete removal of TOC, IC, COD and BOD₅ produced in secondary treatments.

Materials and methods

Coloured laboratory wastewater (CLWW)

CLWW from lot No. 1810 from wastewater from the teaching and research laboratories at the “Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia” was used. CLWW were characterized with regard to UV/VIS spectra to determine the wavelength where maximum absorbance was obtained.

P. pastoris immobilized cells

Recombinant *P. pastoris*X33/pGAPZαA-*LaccPost-Stop* (Clone 1), (Rivera-Hoyos et al. 2015) was immobilized in calcium alginate beads according to previously described conditions (Gouzy-Olmos et al. 2018).

Recombinant POXA 1B (rPOXA 1B) enzyme concentrate

Two enzyme concentrates produced with *P. pastoris* X33/pGAPZαA-*LaccPost-Stop* (Clone 1) were used (Ardila-Leal

et al. 2019). Concentrate lot number 1 (11,713 UL⁻¹, pH 7.40±0.20) was used for process 1 (P1) and concentrate lot number 2 (41,273 UL⁻¹, pH 7.40±0.20) was used for processes 2 and 3 (P2 and P3).

Chlorella sp. cells

Chlorella sp., cells isolated from Winogradsky columns were used. Cells were cultured in Bold media [25 mg L⁻¹ CaCl₂, 25 mg L⁻¹ NaCl, 250 mg L⁻¹ NaNO₃, 75 mg L⁻¹ MgSO₄, 105 mg L⁻¹ KH₂PO₄, 75 mg L⁻¹ K₂HPO₄, 3 mL L⁻¹ trace element solution (0.194 mg L⁻¹ FeCl₃, 0.082 mg L⁻¹ MnCl₂, 0.16 mg L⁻¹ CoCl₂, 0.008 mg L⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O and 0.005 mg L⁻¹ ZnCl₂), (Blair et al. 2014) and incubated at 19.00±3.00 °C, 120 r.p.m, with artificial light cycles of 12 h.

Treatment of different CU of CLWW with *P. pastoris* X33/pGAPZαA-*LaccPost-Stop* (Clone 1) immobilized cells in calcium alginate

Assays were carried out with CLWW containing different CU to select the most favourable concentration for use in pilot-scale treatments. Solutions were prepared with 300.00, 1200.00 and 2300.00 CU from wastewater lot No. 1810. Colour units were determined from solutions by measuring absorbance at a wavelength of 614 nm and utilizing Equation (1), (Livernoche et al. 1983):

$$CU = \frac{A_1 \times 500}{0.132}, \quad (1)$$

where A_1 is the effluent's absorbance at 614 nm and 0.312 is the ABS_{465n} from a 500.00 CU platinum-cobalt standard solution (Livernoche et al. 1983).

Each assay was performed in 100 mL Erlenmeyer flask containing 25 mL of solution. Each assay consisted of control 1 (only CLWW solution), control 2 with calcium alginate beads (CLWW and calcium alginate beads) and treatment 1 (dye solution and *Pichia pastoris* X33/pGAPZαA-*LaccPost-Stop* (Clone 1) immobilized in calcium alginate beads). Erlenmeyer flasks were incubated at 30 °C at 150 rpm with photographic monitoring every 24 h. Assays were performed in triplicate. For CU determination, sampling was carried out at the beginning (0 h) and the end of the assay (144 h).

CLWW (1500.00 CU) secondary treatment with *P. pastoris* X33/pGAPZαA-*LaccPost-Stop* (Clone 1) immobilized cells (pilot scale)

The pilot treating plant consisted of a 20 L homogenization, neutralization and mixing tank, followed by a 15 L extended

eration bioreactor (turbulent flow and dissolved oxygen $> 1 \text{ mg L}^{-1}$) with a 10 L effective work volume (EWW) at laboratories' room temperature ($\sim 19 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$). The reactor was inoculated with 10,000 beads containing immobilized cells (1 bead mL^{-1}), with 72 h hydraulic retention time. To flocculate the effluent after immobilized cell treatment 340 mL $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (3% w/v) and 36 mL NaOH (60% w/v) were used. Subsequently, the system was transferred to two filtration units with 5 L quartzite sand with 2-min retention time (Fig. 1). Three cycles per treatment were performed (Batch, C1, C2, and C3) for CLWW of the same lot with sampling every 12 h, to determine chemical oxygen demand COD (mg L^{-1}), biological oxygen demand at day five BOD_5 (mg L^{-1}), total suspended solids TSS (mg L^{-1}), total organic carbon TOC (mg L^{-1}), inorganic carbon IC (mg L^{-1}), total carbon TC (mg L^{-1}), total nitrogen TN (mg L^{-1}), pH and UV/VIS absorption spectra changes (Pedroza-Camacho et al. 2018).

Only for C1 immobilized cell reactivation 1 L of media was added (0.05 mM CuSO_4 , 30 g L^{-1} glucose, 2.5 mM

NH_4SO_4 , 10 g L^{-1} peptone, 30 g L^{-1} yeast extract), (Gouzy-Olmos et al. 2018), and cells were soaked in media for 1 h. For the following two cycles (C2 and C3), cells from the previous cycle remained in the bioreactor and 1 L effluent from the previous cycle was added (before flocculation and filtration through quartzite sand). Reactivation in culture media was not performed for C2 or C3.

CLWW (1500.00 CU) secondary treatment with rPOXA 1B free enzyme concentrate (pilot scale)

As described in the previous assay the same treatment plant and conditions were used, except only free enzyme concentrate, was employed and the flocculation step was omitted (Fig. 1). At 72 h of treatment, the effluent was filtered through quartzite sand. Initial dose for concentrated rPOXA lots was $\sim 400 \text{ U L}^{-1}$. Three processes were evaluated (Batch, P1, P2, and P3). To determine COD (mg L^{-1}), TSS (mg L^{-1}), TOC (mg L^{-1}), IC (mg L^{-1}), TC (mg L^{-1}), TN (mg L^{-1}), pH

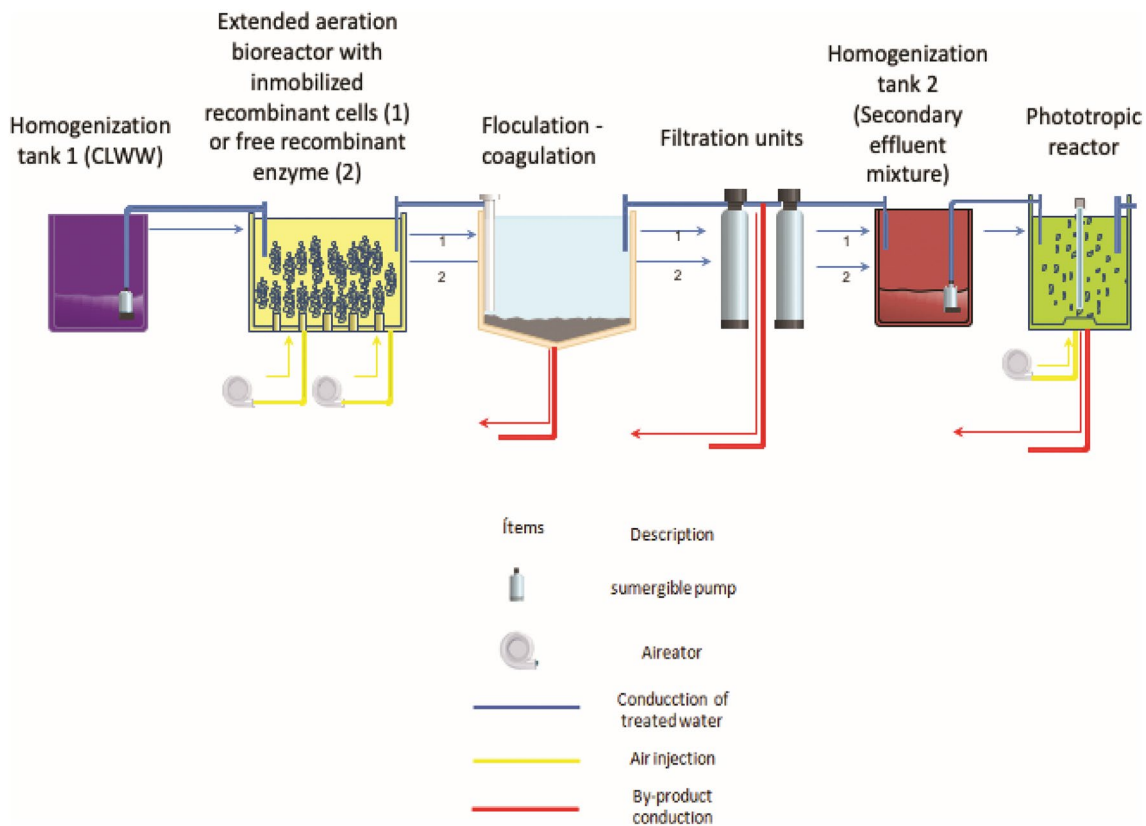


Fig. 1 Schematic representation of the treatment plant employed. Conduction line of treated water 1: CLWW was homogenized at homogenization tank 1, treated with *P. pastoris*X33/pGAPZ α A-*LaccPost-Stop* (Clone 1) immobilized in calcium alginate beads at extended aeration bioreactor, then flocculated and coagulated follow by a quartzite sand filtration; effluent was stored at homogeniza-

tion tank 2. Conduction line of treated water 2: CLWW was homogenized at homogenization tank 1, treated with rPOXA 1B concentrate at extended aeration bioreactor, follow by a quartzite sand filtration; effluent was stored at homogenization tank 2. Once the secondary effluent mixture was homogenized in the homogenization tank 2, it was treated in the phototropic reactor with *Chlorella* sp

and UV/VIS absorption spectra changes samples were collected every 12 h (Pedroza-Camacho et al. 2018).

Tertiary treatment with *Chlorella* sp., of effluents from secondary treatment

For tertiary treatment, effluents from secondary treatments (experiments with immobilized *P. pastoris* and free rPOXA 1B enzyme concentrate) were mixed to generate an only lot. Treatment was performed in 15 L bioreactor with 8 L WEV, inoculated with 4% (v/v) *Chlorella* sp., (10×10^6 CFU mL⁻¹) suspension, aerated with three submergible pumps to maintain a 1 L min⁻¹ flux. A fluorescent lamp was installed within the quartz jacket, placed in the center in the bioreactor (1000 lx with 12 h light/dark cycles), (Fig. 1). Average temperature in the area where the phototrophic reactor was placed oscillated between $\sim 19.00 \pm 3.00$ °C. To determine COD (mg L⁻¹), TOC (mg L⁻¹), NO₃⁼ (mg L⁻¹), NO₂⁻ (mg L⁻¹), TSS, (mg L⁻¹), orthophosphates (mg L⁻¹) and pH, samples were collected in the beginning and at 144 h (6 days). Additionally, microalgae dry biomass was determined (dry weight determination (g L⁻¹) at 105 °C for 20 min), (American Public Health Association et al. 2005). The procedure for estimating the bacteria number was based on the 9215C spread plate method (Dichter and LeChevallier 2017).

Analytical techniques

UV/VIS spectrophotometry

UV/VIS spectra using Mecasys OPTIZEN spectrophotometer were determined for each sample before and after treatment to evaluate changes in absorption spectra in sample coloured compounds.

Colour Units (CU) determination

Colour units were determined measuring CLWW at 614 nm wavelengths, using Eq. (2), (Livernoche et al. 1983):

$$UC = \frac{A_1 \times 500}{0.132}, \quad (2)$$

where A_1 is the absorbance at which CLWW wave length was at its maximum, and 0.132 is the ABS_{465nm} of a standard platinum-cobalt solution with 500.00 CU (Livernoche et al. 1983).

TSS determination

Total suspended solids concentration (mg L⁻¹) was determined using the 2540 D Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Rice 2017).

COD determination

The HACH commercial kit was used based on the 8000 HACH method. Reading was performed in a HACH spectrophotometer at 620 nm using as a blanc a COD tube with dH₂O instead of wastewater. Technique detection ranged between 0 and 15,000 mg L⁻¹.

BOD₅ determination

The VELP SCIENTIFICA system was employed to determine this parameter.

TOC, IC, TC and TN determination

The concentration of organic matter (OM) of the effluents of each cycle and process at time 0 and post-filtration was measured using a TOC analyzer (Shimadzu TOC-L total organic carbon analyzer), this equipment uses a unique combustion catalytic oxidation and NDIR according to 5310B Standard method (Rice 2017).

For TOC determination in tertiary treatment with *Chlorella* sp., a HACH commercial kit for low range Total Organic Carbon (TOC), (Test' N Tube™ 03) was used based on the 5310 C method, specifically persulphate combustion oxidation. Reading was performed in a HACH spectrophotometer at 430 nm using as a blanc one COT tube with Milli Q water instead of CLWW (American Society for Testing and Materials 1994).

Nitrates, nitrites and orthophosphate determination

NitraVer® commercial kit from HACH was used to determine nitrates, based on cadmium reduction method 8171 ranging from 0.1 to 10 mg L⁻¹ NO₃-N (Hach Company/Hach Lange GmbH 2014). Nitrite determination was performed using NitriVer® 3 commercial kit from HACH, based on method 8507 ranging from 0.002–0.300 mg L⁻¹ NO₂-N (Hach Company/Hach Lange GmbH 2007). Last, for orthophosphate determination (HPO₄⁻³ in mg L⁻¹) Spectroquant® for orthophosphates from Merck (MQuant™ three phosphate test, Merck) was used, based on previously reported phosphomolybdic acid colourimetric formation (Murphy and Riley 1962).

On the other hand, with algae biomass in mg L⁻¹, COD (mg L⁻¹) and TOC (mg L⁻¹) consumed at 144 h after tertiary treatment yield ($Y_{X\text{COD}}^{-1}$ and $Y_{X\text{TOC}}^{-1}$) and biomass volumetric productivity (mg L⁻¹ h⁻¹) were calculated (Morales-Álvarez et al. 2016, 2017).

pH determination

Effluent's and influent's pH were measured using a JENWAY pH meter.

Laccase activity determination

Laccase activity (UL^{-1}) was monitored by a change in absorbance at 420 nm ($\epsilon_{420} = 36.000 M^{-1} cm^{-1}$) based on ABTS oxidation in 0.1 M citrate buffer (pH 3.0 ± 0.2). 2 μL of the sample were added to 898 μL of 0.1 M citrate buffer, and 100 μL of 20 mM ABTS at room temperature (25 °C). Green radical formation was evaluated spectrophotometrically for 1 min. Blanc solution contained 2 μL of distilled water, 898 μL of citrate buffer solution, and 100 μL of 20 mM ABTS, Eq. (3).

$$UL^{-1} = \frac{(\Delta E \times V_t)}{(\epsilon \times d \times V_s)}, \quad (3)$$

where ΔE corresponds to the difference between final and initial absorbance after 1 min of reaction, V_t refers to the total reaction volume (mL), ϵ refers to the ABTS molar extinction coefficient ($M^{-1} cm^{-1}$), d is the length of the cuvette in cm and V_s is the volume of sample (mL) contained in the reaction.

Scanning electron microscopy (SEM)

This service was contracted with Universidad de Los Andes (UNIANDÉS), Bogotá, D.C, Colombia. Alginate bead morphology containing *P. pastoris* cells and *Chlorella* sp. cells were observed under scanning electron microscopy (SEM). A JEOL microscope was used, model JSM 6490-LV imaging from 10 to 30 kV. Samples were covered with gold under vacuum conditions using Metalizador Desk IV. Samples were observed at 8000 \times magnification for *Chlorella* sp. and for *P. pastoris* at 20,000 \times magnification.

Results

Treatment of different CU of CLWW with *P. pastoris* X33/pGAPZ α A-LaccPost-Stop (Clone 1) immobilized cells in calcium alginate

Following are the CU selection assays performed at Erlenmeyer flask scale (Fig. 2), which allowed establishing CLWW CU to be used at pilot scale for the plant treatment. Colour at 300.00 and 1200.00 CU notably decreased after 144 h of treatment with percentages of decolouration of 60.53 and 73.16%, respectively (Table 1).

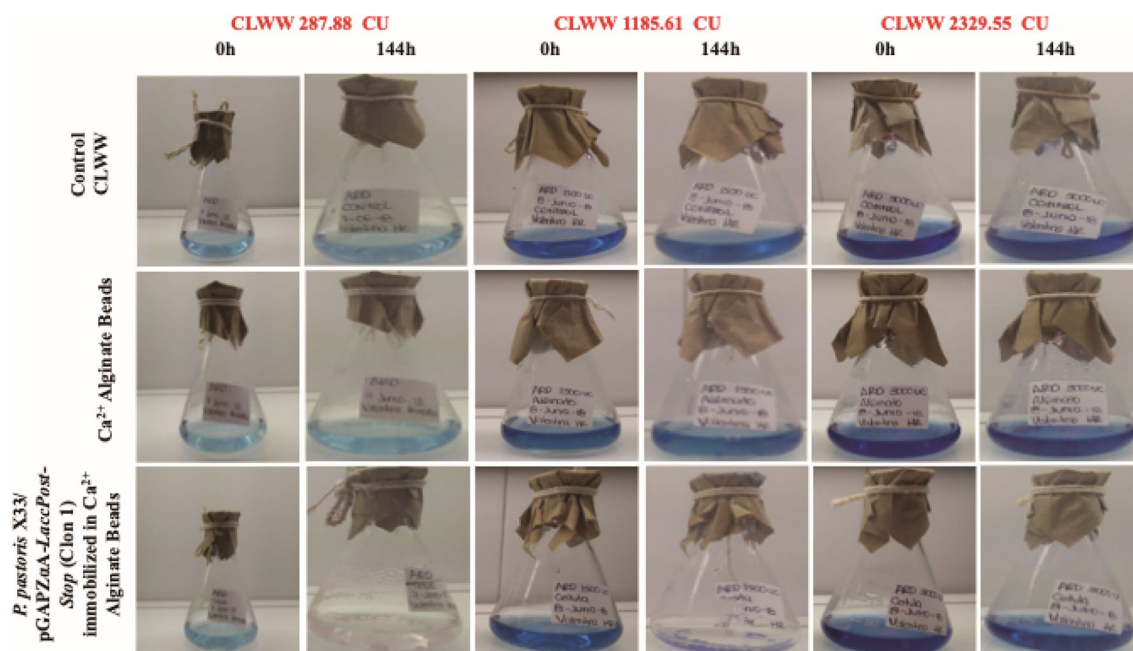


Fig. 2 Photographic monitoring of CLWW treatments. CLWW treatments for ~300.00, ~1200.00 and ~2300.00 CU, respectively, at 0 h and 144 h. The objective was to select best CU of CLWW for pilot

treatment with *P. pastoris* X33/pGAPZ α A-LaccPost-Stop (Clone 1) immobilized cells, and rPOXA 1B enzyme concentrate

Table 1 CLWW percentage decolouration after 144 h of treatment. Treatment with calcium alginate beads and *P. pastoris* X33/pGAPZαA/LaccPost-Stop (Clone 1) immobilized in calcium alginate beads

CLWW, colour unit (CU)	Treatment	% decolouration (144 h)
~ 300.00	C1 ^a	0.00
	C2 ^b	7.89
	T1 ^c	60.53
~ 1200.00	C1	0.00
	C2	14.38
	T1	73.16
~ 2300.00	C1	0.00
	C2	7.97
	T1	1.95

Bold values indicate major decolouration treatments

^aCLWW

^bCLWW + Ca²⁺ alginate beads

^cCLWW + Ca²⁺ alginate beads and *P. pastoris* X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop (Clone 1)

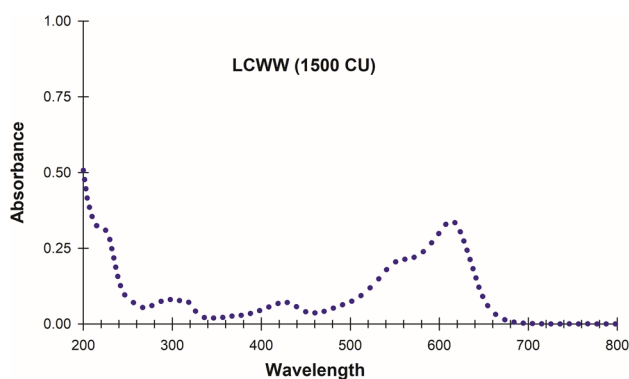


Fig. 3 LCWW UV/VIS (200–800 nm) absorption spectra. LCWW (1500.00 CU) spectra; where 614 nm was selected as the visible wavelength for maximal absorption

CLWW, UV/Vis characterization

CLWW (1500.00 CU) UV/VIS spectra for influent to treat with *P. pastoris* X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop (Clone 1) immobilized in calcium alginate beads and for free rPOXA 1B enzyme concentrate is presented in Fig. 3.

CLWW (1500.00 CU) secondary treatment with *P. pastoris* X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop (Clone 1) immobilized cells at pilot scale

In Fig. 4a–c, the UV/VIS absorption spectra are presented for the three cycles of CLWW (1500.00 CU, influents) treatment with *P. pastoris* immobilized cells producing the recombinant POXA 1B enzyme, as well as removal

percentages of some CLWW discharge parameters after treatment (secondary effluent).

In the three treatment cycles, the UV/VIS spectrum revealed a decrease in absorbance (approximately 0) in the VIS region (400–800 nm) as a consequence of rPOXA 1B action, produced by immobilized cells (Fig. 4a–c). In addition, in the three cycles at 74 h of treatment an increase in absorbance in the UV region (200–400 nm) was observed in comparison with the same region of CLWW (1500.00 CU). However, the signal was gradually decreasing with cycle change (C1 > C2 > C3). Table 2 shows CLWW (1500.00 CU, influents) discharge parameters of the effluent of the different treatment cycles.

CLWW (1500.00 CU) secondary treatment with rPOXA 1B free enzyme concentrate (pilot scale)

UV/VIS absorption spectra for CLWW (1500.00 CU, influents) for the three treatment processes with rPOXA 1B concentrate, as well as removal percentages of certain CLWW discharge parameters after treatment (effluent) are illustrated in Fig. 4e, f.

For the three processes, UV/VIS spectra exhibited a decrease in absorbance signal, almost 0 in the VIS region (400–800 nm) as a consequence of the presence of rPOXA 1B enzyme (Fig. 4d–f). At 73 h of treatment an increase in absorbance for the three processes in the UV region (200–400 nm) was observed, in comparison with the same region of CLWW (1500.00 CU), however, the signal decreased when the process was changed from P1 to P2 (P1 > P2 = P3).

Average enzyme activity at the beginning of treatment was $401.23 \pm 6.83 \text{ U L}^{-1}$ and after 73 h decreased to $296.60 \pm 12.29 \text{ U L}^{-1}$, with oscillations during treatment. Table 3 summarizes CLWW (1500.00 CU, influents) parameter quality and parameters of effluents after different treatments.

Tertiary treatment with con *Chlorella* sp. of a mixture of secondary effluents treated with *P. pastoris* X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop (Clone 1) immobilized cells and enzyme extract

The mix of six secondary effluents presented the following initial characteristics: CU ($90 \pm 3 \text{ CU}_{614 \text{ nm}}$), COD ($300 \pm 9 \text{ mg L}^{-1}$), TOC ($10 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$), TSS ($66.7 \pm 1.2 \text{ mg L}^{-1}$), NO₃ ($6.25 \pm 0.98 \text{ mg L}^{-1}$), NO₂ ($0.065 \pm 0.002 \text{ mg L}^{-1}$), orthophosphates ($15.7 \pm 0.57 \text{ mg L}^{-1}$) and pH (7.06 ± 1.1). UV/VIS absorption spectra of secondary effluents mixture at the beginning of tertiary treatment and at 144 h is presented in Fig. 5. Signal associated with initial CU decreased to end at $34 \pm 4 \text{ CU}$. In the UV region two changes were observed, one at signal 289 nm (decrease in

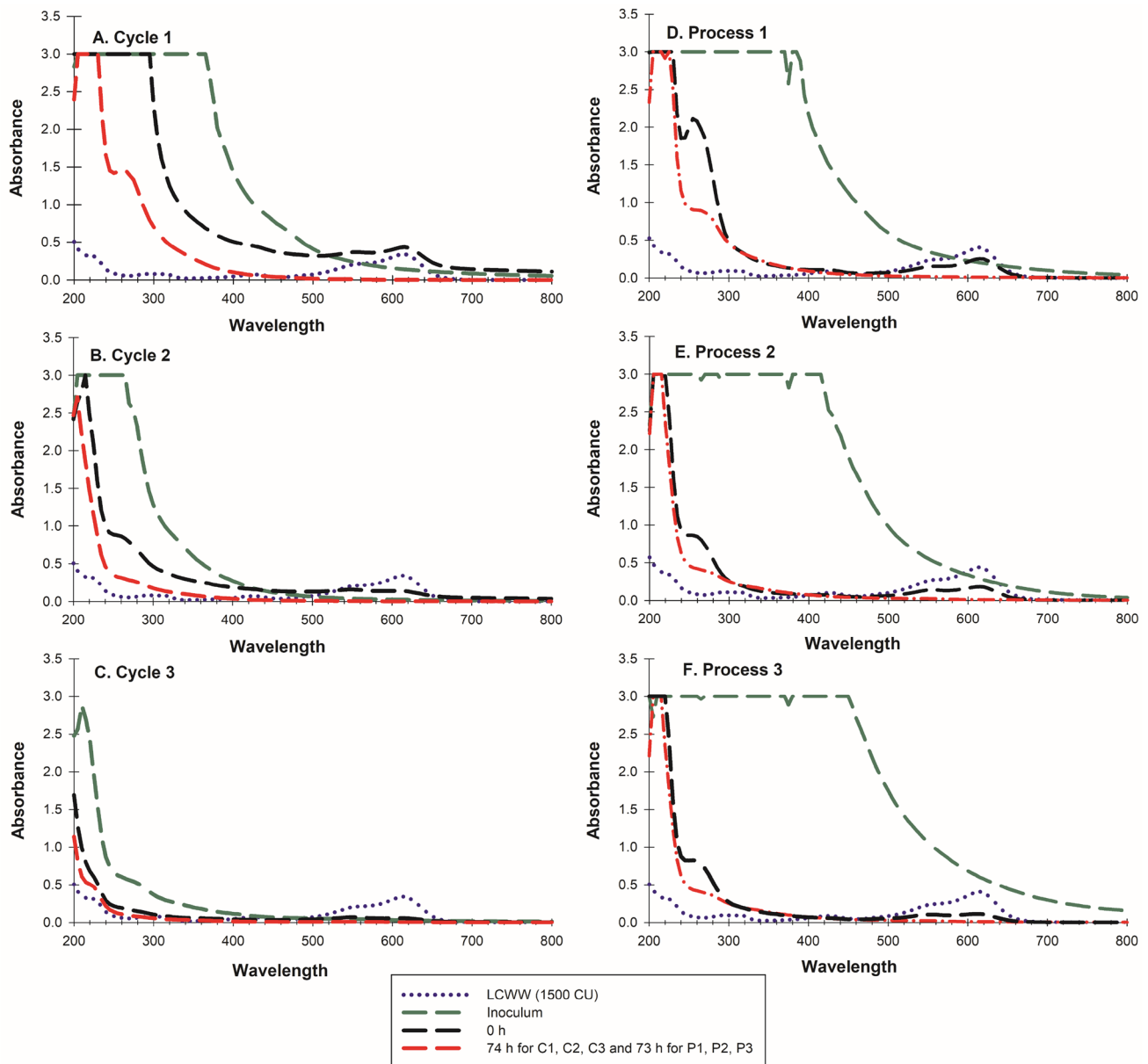


Fig. 4 The behaviour of the 3 cycles and the 3 treatment processes of CLWW (1500.00 CU) treatment with *P. pastoris* X33/pGAPZ α A-LaccPost-Stop (Clone 1) immobilized cells, and with rPOXA 1B

enzyme concentrate, respectively. **a–c** UV/VIS absorption spectra of C1, C2 and C3 respectively. **d–f** UV/VIS absorption spectra of P1, P2 and P3 respectively

absorbance from 0.263 to 0.211), the second change consisted of the appearance of a signal at 253 nm (0.183 units of absorbance), which could be associated with an intermediate produced by *Chlorella* sp., or to a pigment produced by the algae.

Concerning to quantify discharge parameters for the tertiary treatment, initial and final values are presented in Table 4. It is noteworthy a decrease in COD (155 ± 4 mg L⁻¹), TOC (6.6 ± 0.87 mg L⁻¹), NO₃ (4.25 ± 1.11 mg L⁻¹) and orthophosphates (9.2 ± 2.3 mg L⁻¹) concentration. On the contrary, NO₂ and TSS values increased with values of

0.156 ± 0.07 mg L⁻¹ and 149 ± 7 mg L⁻¹, respectively, at 144 h.

Tertiary treatment efficiency and *Chlorella* sp., growth under mixotrophic conditions without sterility conditions were confirmed with a dry weight of algae biomass (initial: 500 ± 10 mg L⁻¹ and final 1400 ± 80 mg L⁻¹) and total bacteria count (initial: $1 \times 10^4 \pm 1 \times 10^1$ CFU mL⁻¹ and final: $1 \times 10^6 \pm 1 \times 10^2$ CFU mL⁻¹). Additionally, when biomass yield was calculated in terms of consumed COD ($Y_{X/DQO}$) and TOC ($Y_{X/COT}$) the values obtained were 9.65 ± 1.24 mg mg⁻¹ and 411 ± 35 mg mg⁻¹, respectively.

Table 2 Discharge parameters behaviour of different cycles of CLWW treatment (1500.00 CU) with *P. pastoris* X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop (Clone 1) immobilized of the cells

Discharge parameter	0 h	74 h	Removal (%)
Cycle 1			
TOC (mg L ⁻¹)	2214.26 ± 46.84	591.97 ± 3.63	73.26 ± 0.40
TC (mg L ⁻¹)	2290.00 ± 48.08	608.50 ± 4.38	73.42 ± 0.37
IC (mg L ⁻¹)	75.74 ± 1.24	16.53 ± 0.75	78.18 ± 0.64
TN (mg L ⁻¹)	411.49 ± 20.53	264.40 ± 4.81	36.49 ± 5.00
CU	1500.00 ± 0.00	12.63 ± 2.19	99.16 ± 0.15 ^a
COD (mg L ⁻¹)	6045.00 ± 35.36	1660.00 ± 0.00	72.43 ± 0.00
BOD ₅ (mg L ⁻¹)	999.00 ± 0.00	999.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TSS (mg L ⁻¹)	275.00 ± 35.36	50.00 ± 0.00	80.00 ± 0.00
BOD ₅ /COD	0.16	0.60	N/A
TOC/TN	5.38	2.24	N/A
COD/TOC	2.73	2.80	N/A
pH	4.16 ± 0.20	5.05 ± 0.20	N/A
Cycle 2			
TOC (mg L ⁻¹)	135.86 ± 6.70	74.01 ± 0.50	45.45 ± 3.06
TC (mg L ⁻¹)	165.09 ± 3.97	93.22 ± 1.22	43.36 ± 2.65
IC (mg L ⁻¹)	29.11 ± 0.93	19.36 ± 0.57	33.49 ± 0.19
TN (mg L ⁻¹)	94.76 ± 1.63	93.20 ± 0.62	2.17 ± 1.32
CU	1500.00 ± 0.00	6.31 ± 4.37	99.58 ± 0.29 ^a
COD (mg L ⁻¹)	760.00 ± 155.56	280.00 ± 14.14	67.82 ± 1.63
BOD ₅ (mg L ⁻¹)	999.00 ± 0.00	250.00 ± 0.00	74.98 ± 0.00
TSS (mg L ⁻¹)	66.67 ± 28.87	66.67 ± 28.87	0.00 ± 0.00
BOD ₅ /COD	1.30	0.80	N/A
TOC/TN	1.43	0.79	N/A
COD/TOC	5.59	3.78	N/A
pH	7.21 ± 0.20	8.01 ± 0.20	N/A
Cycle 3			
TOC (mg L ⁻¹)	47.08 ± 1.41	20.60 ± 3.13	56.13 ± 7.96
TC (mg L ⁻¹)	54.22 ± 2.17	27.81 ± 1.54	48.61 ± 4.59
IC (mg L ⁻¹)	6.33 ± 0.73	7.34 ± 0.85	0.00 ± 0.00
TN (mg L ⁻¹)	60.07 ± 0.66	60.60 ± 0.00	0.00 ± 0.00
CU	1500.00 ± 0.00	10.10 ± 2.19	99.33 ± 0.15 ^a
COD (mg L ⁻¹)	370.00 ± 0.00	295.00 ± 21.21	15.71 ± 6.06
BOD ₅ (mg L ⁻¹)	250.00 ± 0.00	250.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TSS (mg L ⁻¹)	166.67 ± 28.87	33.33 ± 28.87	83.33 ± 14.43
BOD ₅ /COD	0.60	0.80	N/A
TOC/TN	0.78	0.34	N/A
COD/TOC	7.86	14.32	N/A
pH	7.28 ± 0.20	7.50 ± 0.20	N/A

N/A does not apply, N/C unable to calculate

^aPercentage calculated from 1500.00 CU at the beginning of treatment

Last, biomass volumetric productivity was 9.7 ± 1.3 mg L⁻¹ h⁻¹.

P. pastoris immobilized in alginate beads after secondary treatment (74 h) and *Chlorella* sp., after tertiary

Table 3 Discharge parameters for different CLWW (1500.00 CU) treatment processes with rPOXA 1B enzyme concentrate

Discharge parameter	0 h	73 h	Removal (%)
Process 1			
TOC (mg L ⁻¹)	420.06 ± 9.53	273.71 ± 5.08	34.84 ± 0.27
TC (mg L ⁻¹)	481.20 ± 11.03	332.80 ± 6.79	30.84 ± 0.18
IC (mg L ⁻¹)	61.14 ± 1.50	59.09 ± 1.71	3.36 ± 0.43
TN (mg L ⁻¹)	205.37 ± 6.71	198.53 ± 6.11	3.32 ± 1.48
CU	1500.00 ± 0.00	49.24 ± 3.79	96.72 ± 0.25 ^a
COD (mg L ⁻¹)	1865.00 ± 49.49	840.00 ± 84.85	55.00 ± 3.36
TOC/TN	2.05	1.38	N/A
COD/TOC	4.44	3.07	N/A
pH	6.96 ± 0.20	7.97 ± 0.20	N/A
Process 2			
TOC (mg L ⁻¹)	172.53 ± 2.81	112.16 ± 0.68	34.98 ± 1.45
TC (mg L ⁻¹)	210.70 ± 4.10	134.64 ± 0.08	36.09 ± 1.20
IC (mg L ⁻¹)	38.49 ± 1.07	22.48 ± 0.76	41.11 ± 0.02
TN (mg L ⁻¹)	112.94 ± 0.59	104.25 ± 5.08	8.85 ± 5.23
CU	1500.00 ± 0.00	44.19 ± 35.36	97.05 ± 0.15 ^a
COD (mg L ⁻¹)	885.00 ± 77.78	345.00 ± 35.36	60.69 ± 7.45
TOC/TN	1.53	1.08	N/A
COD/TOC	5.13	3.08	N/A
pH	7.16 ± 0.20	7.65 ± 0.20	N/A
Process 3			
TOC (mg L ⁻¹)	155.81 ± 0.41	101.61 ± 2.70	34.79 ± 1.56
TC (mg L ⁻¹)	191.70 ± 2.21	129.64 ± 3.71	32.89 ± 1.67
IC (mg L ⁻¹)	36.29 ± 1.45	27.61 ± 1.69	23.98 ± 1.69
TN (mg L ⁻¹)	105.12 ± 1.07	103.35 ± 1.43	1.77 ± 0.91
CU	1500.00 ± 0.00	53.03 ± 0.00	96.47 ± 0.00 ^a
COD (mg L ⁻¹)	785.00 ± 35.36	360.00 ± 14.14	54.05 ± 3.87
TOC/TN	1.48	0.98	N/A
COD/TOC	5.04	3.54	N/A
pH	7.19 ± 0.20	7.90 ± 0.20	N/A

N/A does not apply, N/C unable to calculate

^aPercentage calculated from 1500.00 CU at the beginning of treatment

treatment (144 h) were characterized under SEM (Fig. 6a, b). *P. pastoris* were oval shaped with an approximate size of 1.6 ± 0.5 μm and were distributed in different zones of the alginate matrix (Fig. 6a). *Chorella* sp., cells were spherical with an approximate size of 4.9 ± 0.9 μm (Fig. 6b). Groups of variable sizes were observed, which could be associated with sample preparation for microscopic analysis.

Regarding EDS analysis, it was observed both cell types contained carbon, oxygen, nitrogen, phosphorus, aluminium and potassium (Table 5). However, atomic percentages varied among them, such that the higher contents were observed in *Chorella* sp., for carbon, oxygen, nitrogen and phosphorus, which could be associated with the capacity of microalgae to assimilate carbon by mixotrophy (fix atmospheric

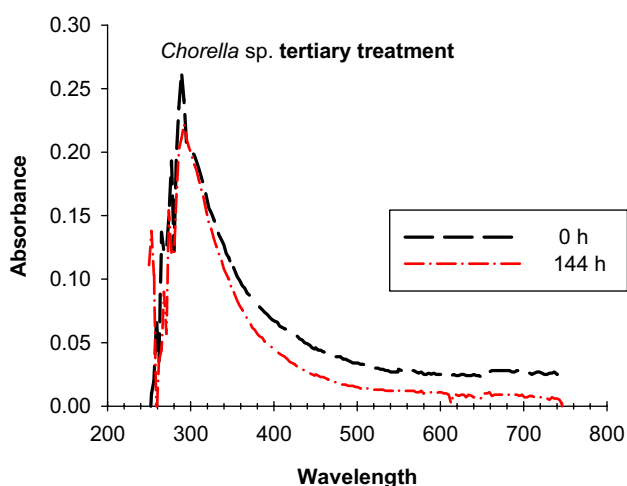


Fig. 5 *Chorella* sp. tertiary treatment. UV/VIS absorption spectra of mix of secondary effluents treated for 144 h

CO₂ and employ organic carbon present in water) and efficiently remove nutrients such as phosphorus and nitrogen.

Discussion

Treatment of different CU of CLWW with *P. pastoris* X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop (Clone 1) immobilized cells in calcium alginate

Data illustrated in Fig. 2 and Table 1 demonstrate that up to 1200.00 CU ~73% color removal was obtained. Decolouration obtained in these assay was supported by three factors, (1) high rPOXA 1B redox potential (Roman et al.

2010; Mendoza et al. 2011; Drumond Chequer et al. 2013; Rivera-Hoyos et al. 2013; El-Batal et al. 2015; Morales-Álvarez et al. 2016), (2) adsorption generated by the presence of calcium alginate beads (Fig. 1) and (3) *P. pastoris* X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop (Clone 1) planktonic cells (Gouzy-Olmos et al. 2018).

Modest colour elimination at 2300.00 CU could be due to aspects, such as (1) calcium alginate matrix saturation, (2) extended treatment time requirement, and (3) possible water toxicity on *P. pastoris* X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop (Clone 1) immobilized cells. Experimentally the effect of time on % decolouration could have been studied, however, after 144 h the assay becomes unfeasible for industrial purposes since it would be too extensive and costly, therefore less attractive; particularly if it is an industrial batch process with a high liquid waste flow.

Considering the gap between 1200.00 and 2300.00 CU is wide, as well as the possible toxic effect on the recombinant strain, it was decided to perform the entire pilot-scale study at 1500.00 CU, an intermediate CLWW dilution, for the cycle treatments with immobilized cells in calcium alginate beads, as well as for the free rPOXA 1B enzyme concentrate. This decision suggests that in practice it will require influent dilution, to adjust the CU to 1500.00. However, it is also clear the possibility of reusing the effluent in the dilution of the influent to be treated, which would significantly reduce water expenditure.

The limitation in enzyme activity determination could have been due to low enzyme diffusion, an effect attributed to alginate concentration ($\geq 4\%$ w/v), (Tanaka et al. 1984; Won et al. 2005). Decolouration percentages are presumed to have resulted from enzyme activity, because of the difference between dye adsorption (absorption control C2,

Table 4 Discharge parameters for tertiary treatment with *Chorella* sp., at 144 h

Tertiary treatment			
Discharge parameter	0 h	144 h	Removal (%)
CU	90 ± 3	34 ± 4	62.2 ± 1.3
TOC (mgL ⁻¹)	10 ± 2	6.6 ± 0.87	34 ± 3
COD (mgL ⁻¹)	300 ± 9	155 ± 4	48.3 ± 2.4
NO ₃ ⁼	6.25 ± 0.98	4.25 ± 1.11	32 ± 2
NO ₂ ⁻	0.065 ± 0.002	0.156 ± 0.07	0
Ortophosphates	15.7 ± 0.57	9.2 ± 2.3	41.4 ± 3.5
TSS (mgL ⁻¹)	66.7 ± 1.2	149 ± 7	0
Algae dry weight	500 ± 10	1400 ± 80	N/A
Total bacteria (CFU mL ⁻¹)	1 × 10 ⁴ ± 1 × 10 ¹	1 × 10 ⁶ ± 1 × 10 ²	N/A
P _(biomass) (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	N/C	9.7 ± 1.3	N/A
Y _(biomass/COD) (mg mg ⁻¹)	N/C	9.65 ± 1.24	N/A
Y _(biomasa/TOC) (mg mg ⁻¹)	N/C	411 ± 35	N/A
pH	7.06 ± 0.20	7.49 ± 0.20	N/A

N/A does not apply, N/C unable to calculate

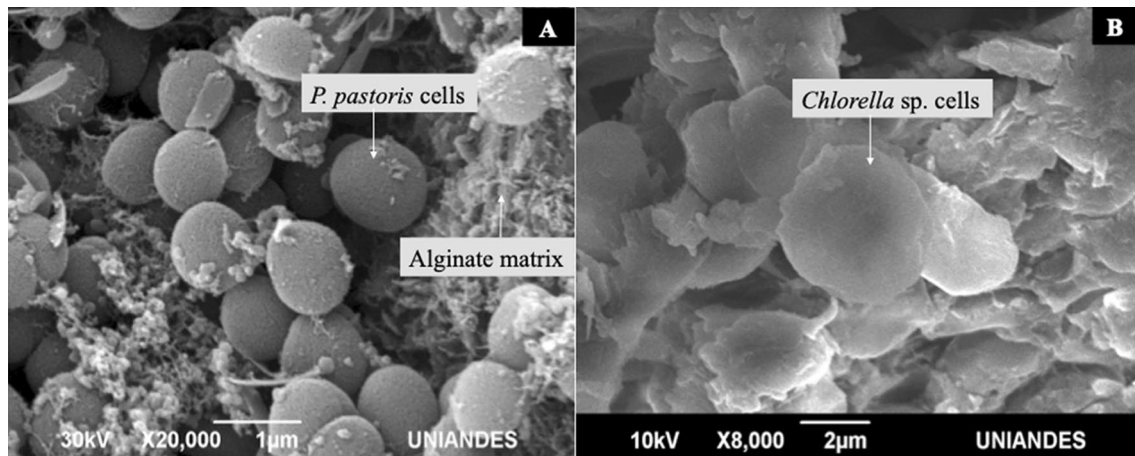


Fig. 6 Scanning electron micrographs (SEM). **a** *P. pastoris* cells immobilized in calcium alginate after the secondary (74 h). **b** *Chlorella* sp. cells after tertiary treatment (144 h)

alginate beads without cells) and T1 treatment for the different CU (Table 1).

CLWW UV/VIS characterization

CLWW lots generated every semester in teaching and research laboratories at the Department of Microbiology School of Sciences, Pontificia Universidad Javeriana are heterogenous, due to different concentrations and types of colourants and/or additives (oils, alcohols and acids, etc.), depending on the time of collection. Thus, to identify the wavelength where maximum absorption was obtained it was necessary to characterize CLWW, UV/VIS spectra and determine the corresponding CU. The CLWW lot used in this work had 25,750.00 CU and was diluted into 1500.00 CU with a maximum VIS absorption at 614 nm (Fig. 3a).

Table 5 Atomic composition for EDS from *P. pastoris* X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop (Clone 1) and *Chlorella* sp.

Element	Atomic (%)	
	<i>P. pastoris</i>	<i>Chlorella</i> sp.
C	51.40	80.75
O	40.32	12.14
N	0.10	1.83
P	0.04	1.20
Na	ND	1.30
Al	0.13	1.27
K	0.07	1.51
Ca	7.94	ND

ND not determined

CLWW (1500.00 CU) secondary treatment with *P. pastoris* X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop (Clone 1) immobilized cells at pilot scale

Absorption spectra tendencies for the three cycles were similar (Fig. 4a–c). At 0 h, when compared with CLWW (1500.00 CU) an increase in absorbance in the UV region (200–400 nm) was observed. This increase resulted from reactivation media supplementation to reactivate immobilized cells in cycle 1 (Gouzy-Olmos et al. 2018), although for cycles 2 and 3 a lesser increase in the UV region was observed (0 h), because for both cycles no reactivation media was added, and only immobilized cells and 1 L effluents from the previous cycle was used (before flocculation and quartzite sand filtration). In general, an increase in UV region absorbance at 0 h could be due to supplementation with organic matter (reactivation media components, effluent from the previous cycle, cells and extracellular metabolites) and to the colour provided by the reactivation media, specifically for cycle 1.

For the VIS region between 0 and 72 h absorbance considerably decreased and flocculation and quartzite sand filtration also reduced absorbance in the UV region (200–400 nm). However, at the end of the cycles, especially cycle 1 and 2, absorbance and spectral profile for UV regions were higher in comparison with CLWW (1500.00 CU) Fig. 5a–c. These results could be due to two aspects, (1) transformation of complex compounds and/or aromatic compounds (with absorbance in the VIS region) that changed their conformation into simple or aliphatic compounds (Fernández et al. 2016; Morales-Álvarez et al. 2016; Blanco-Vargas et al. 2018; Pedroza-Camacho et al. 2018) and (2) remains of the organic load added to the system with the reactivation media.

For cycle 1 at 0 h no important decolouration was observed, varying between 1500.00 to 1436.87 CU (Table 2, Fig. 4a–c), however, at 2 h CU decreased to 273.99 CU (data not shown). Nevertheless, for cycles 2 and 3 decolouration was immediate (0 h) decreasing CU from 1500.00 a 598.48 and 209.59 CU, respectively, (Table 2, Fig. 4a–c). Once effluents from cycles 1, 2 and 3 were flocculated and filtered they demonstrated colour removal of 99.1, 99.5 and 99.3%, respectively (Table 2).

For the different cycle's behavior of discharge parameters (BOD₅, COD, TOC, TC, IC and TN) revealed an evolution in organic charge (Table 2). COD reduction was 72.43, 67.82 and 15.71% for C1, C2 y C3, respectively; suggesting the implemented system decreased organic load supplemented during alginate bead reactivation (reactivation media). However, low COD reduction in C3 indicated it reached its limit. For TOC reduction, this parameter presented removal percentages between 45 and 73%.

TOC/TN ratio in all treatment cycles decreased (Table 2), suggesting an organic matter oxidation, in addition to a greater elimination of carbon compounds in comparison with nitrogenous compound elimination (Malvis et al. 2019). In C1, C2 and C3 TOC/TN ratio decreased between 0 and 74 h of treatment (Table 2). Furthermore, for all cycles COD/TOC ratio was not below 2.5, indicating a decrease in complex sub-products (Bilinska et al. 2016). COD/TOC ratios below 2.5 indicate residual organic carbon is due to the presence of recalcitrant organic compound presence (Guedes et al. 2003); an association that can change due to non-biodegradable organic compounds that remain at the end of wastewater treatment (Mara and Horan 2003). Moreover, (BOD₅/COD) treatability ratio demonstrated values higher than 0.5 for all treatment cycles, suggesting that influents (0 h) as well as effluents (74 h) were susceptible to biodegradation (Tchobanoglous et al. 2013; Bilinska et al. 2016).

In C1, pH changed to neutral (0 at 72 h), (data not shown). A change in pH could be due to the generation of aromatic intermediates and amines resulting from the transformation of the dyes through enzymes (Rani et al. 2014). However, because of the flocculation process used Al₂(SO₄)₃ and NaOH to separate part of the TSS and free biomass in the effluent before filtration, the pH acidified. Although these chemical compounds allow for particle separation, they also generate changes in the pH (Shon et al. 2009; Zhao et al. 2011). The pH in C2 and C3 was neutral throughout the treatment, nevertheless in cycle 2 flocculation slightly modified the pH, the effect caused by the used of the aforementioned chemicals.

During CLWW treatment cycles (C1, C2 and C3), no enzyme activity was detected (U L⁻¹). Enzyme activity arrest difficulties were observed since UC selection analyses (Fig. 2, Table 1). Probably, activity was below detection

values by the used methodology, given the low diffusion of the enzyme from the calcium alginate bead. During the first hours of the cycles, it was possible to observe dye adsorption to the alginate beads and subsequently the gradual discoloration of beads, a similar effect observed in Fig. 2. Other authors reported limited enzyme diffusion with increased alginate concentration ($\geq 4\%$ w/v), (Tanaka et al. 1984; Won et al. 2005), as was employed in this study. Hence, alginate beads should be dissolved in phosphate buffer to detect activity (Hung et al. 2008). Additionally, our group demonstrated in a computational model laccase does not rupture Ca²⁺ alginate matrix (Gouzy-Olmos et al. 2018).

CLWW (1500.00 CU) rPOXA 1B free enzyme concentrate treatment at pilot scale

For the three treatment processes absorption spectra tendencies are shown in Fig. 4d–f. At 0 h an increase in the absorption pattern in the UV region (200–400 nm) was observed, as a consequence of supplementation with enzyme concentrate. Process 1 had the highest increase since 330 mL of rPOXA 1B concentrate (lot number 1) was used for initial enzyme activity of ~ 400 U L⁻¹ in comparison with processes 2 and 3, where only 88 mL (lot number 2) were employed to attain the same initial activity (~ 400 U L⁻¹). In general, an increase in UV region absorbance (0 h) could be due to organic matters incorporated with the addition of enzyme concentrate.

At the end of each process, absorbance and UV spectral profile (200–400 nm) was higher in comparison with CLWW (1500.00 CU), as was observed for treatment cycles with immobilized cells in calcium alginate. This could be related to complex and/or aromatic compound transformation (absorbencies in the VIS region) with changes in configuration into simple or aliphatic compounds displaying maximum absorbencies in the UV region (200–400 nm), (Langergraber et al. 2004; Fernández et al. 2016; Morales-Álvarez et al. 2016; Blanco-Vargas et al. 2018; Pedroza-Camacho et al. 2018). Another possibility is to the organic matter in the bioreactor since at 72 h of treatment it was impossible to reduce to 100% the incorporated organic load with rPOXA 1B, likely caused by low microbial load within the treatment.

In all processes with rPOXA 1B, as well as the three cycles developed with immobilized cells an instantaneous decolouration effect was observed at 0 h decreasing 1500.00 CU into 1041.66, 652.77 and 597.22 CU for processes 1, 2 and 3, respectively (Fig. 4d–f). In all treatment processes (P1, P2 and P3), it was noticed absorption in the UV region considerably decreased after 72 h, with 96.71, 97.05 and 96.46% dye removal, respectively (Table 3).

Discharge parameters for the different processes (COD, TOC, TC, IC and TN), (Table 3) demonstrated that enzyme

concentrate contributed with organic matter to the media (concentrate residual components), because they presented values greater than 0 h in all the processes, compared to those obtained in the CLWW (1500.00 CU), (Fig. 4d–f). However, organic matter contribution was less in comparison with reactivation media supplementation in cycle 1, which could explain why COD and TOC removal percentages were similar for the three processes.

TOC/TN ratio in all processes (P1, P2 and P3), (Table 3) decreased between 0 and 73 h. Additionally COD/TOC ratio also decreased with final rations greater than 2.5 at 73 h (Guedes et al. 2003), which could demonstrate a decrease in complex sub-products after treatment (Bilinska et al. 2016), caused by dye mineralization and/or residual components of the enzyme concentrate.

The pH in all three processes maintained a relatively neutral behaviour because it was not necessary to perform flocculation procedures. Hence, no variations in pH were observed as took place in the cycles.

During the three processes (P1, P2 and P3) enzyme activity ranged between 289.81 ± 3.21 and 415.33 ± 5.86 U L⁻¹, after quartzite sand filtration enzyme activity decreased in all processes, ranging between 282.40 ± 3.21 and 303.70 ± 8.49 , as a result of enzyme adsorption by the quartzite sand (Jada et al. 2006).

Collectively, results demonstrated the capacity to eliminate more than 90% of the CU with both treatments. CLWW treatment with immobilized cells revealed they could be re-used (at least for 216 h) without losing their removal capacity, which presents a technological advantage since it is not necessary to prepare immobilized cells for each treatment and opens new possibilities to implement a continuous system for treatment of this type of CLWW. Moreover, CLWW (1500.00 CU) treatment with 400 U L⁻¹ de rPOXA 1B was also successful in decolouration, obtaining > 96% removal regardless of the volume of enzyme concentrate incorporated.

Although both treatments (cycles and processes) removed > 95% of the colour (which was the objective of the first part in this work), removal of organic matter only reached between 15.71 and 72.43% in the cycles and the processes between 54.05 and 60.69%. Therefore, residual wastewater obtained from the treatments may contain nutrients (sources of carbon, nitrogen and phosphorus) necessary for a tertiary treatment, which in this case propose microalgae use (Malvis et al. 2019).

***Chlorella* sp. tertiary treatment of effluents from secondary treatment**

The initial characterization of six lots of secondary effluents mixture (C1, C2, C3, P1, P2 and P3), changed substantially concerning the individual values obtained for each

secondary treatment (CU 90 ± 3 UC_{614nm}, COD 300 ± 9 mg L⁻¹, TOC 10 ± 2 mg L⁻¹, TSS 66.7 ± 1.2 mg L⁻¹, NO₃ 6.25 ± 0.98 mg L⁻¹, NO₂ 0.065 ± 0.002 mg L⁻¹, orthophosphates 15.7 ± 0.57 mg L⁻¹ and pH 7.06 ± 1.1) (Table 4). This was due to a dilution effect when both secondary effluents were mixed. Even so, initial tertiary treatment values had concentrations that had to decrease before discharging of the tertiary treatment or re-use as irrigation water (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible 2014).

Regarding CU decrease in the VIS region, *Chlorella* sp. efficiently eliminated $62.2 \pm 1.3\%$ of the initial 90 CU. The decrease was observed from the first hours of contact and increased as a function of time (data not shown), (Table 4); demonstrating that initial removal was carried out by dye adsorption to the microalgae's cell wall, a process that depended on biomass quantity, pH, temperature and time of contact (Dirbaz and Roosta 2018; Furuhashi et al. 2019). The increase in microalgae biomass and their size (Fig. 6b), was a factor that favoured dye removal (from 500 to 1400 mg L⁻¹ at 144 h) since contact surface area was increased and more functional groups were made available to adsorb the dyes, where the most representative were those close to pH 7.0 ± 0.2 and –OH, –NH, and the chelant C=O present in amides, and C–O, methyl (–CH₃) and methylene (–CH₂) groups (Khataee et al. 2013; Dirbaz and Roosta 2018).

Another factor that favoured dye adsorption was the pH since during the entire experiment it remained between 7.06 and 7.49 ± 0.2 . Under this condition microalgae, cells wall charges negatively due to OH⁻ adsorption and proton loss, allowing for a more efficient electrostatic attraction adsorption (Table 4). In particular, cationic dyes, such as crystal violet, malachite green and methylene blue (Vyavahare et al. 2019).

Even though it was not verified, microalgae could have also produced enzymes that participated in dye biotransformation process, since in the UV region a decrease in the 289 nm signal was observed with an increase in the 253 nm signal (Fig. 5). This UV region (200–400 nm) absorption changes could be attributed to transformations through enzyme activity. In this sense, it has been reported azoic dyes (such as Congo red) can be degraded by *Chlorella Vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Oscillatoria tenuis*, converting them into simple aromatic rings and amines (Forgacs et al. 2004). This type of degradation can be carried out by two types of enzymes azoreductases (E.C. 1.7.1.6) and oxidases (E.C. 1.1.3), (Solís et al. 2012; Otto and Schlosser 2014).

COD and TOC removal were 48.3 ± 2.4 and 34 ± 3 , respectively. Reduction in these parameters could be accounted by two aspects (Table 4). The first makes reference to *Chlorella* sp. cells adaptation to this type of wastewaters since to keep them under laboratory conditions, secondary effluents from another treatment plant

that operates continuously in the laboratory, in which the present investigation was conducted, was used as a culture medium (Pedroza-Camacho et al. 2018). Some authors report microalgae bioremediation potential can increase if a prior adaptation process is carried out by culturing in media similar to wastewater be treated (Hu et al. 2019). The second reason was related to the capacity *Chlorella* sp. has to grow under mixotrophy conditions, alternating between heterotrophic and autotrophic metabolism. Heterotrophic metabolites were obtained from secondary effluent organic compounds and autotrophic from produced CO₂ by bacterial metabolism present during tertiary treatment (initial: $1 \times 10^4 \pm 1 \times 10^1$ and final: $1 \times 10^6 \pm 1 \times 10^2$), (Table 4).

Combination of both types of metabolism allows *Chorella* sp., to grow more rapidly and to produce greater quantities of biomass in comparison with only autotrophic conditions, which was evident by biomass volumetric productivity ($9.7 \pm 1.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) and biomass yield in terms of COD and TOC (9.65 ± 1.24 and $411 \pm 35 \text{ mg mg}^{-1}$), respectively (Table 4). TOC yield was higher than COD since dissolved organic carbon is easier to employ than total organic matter present, with a mix of carbon, nitrogen and sulphur compounds with different states of oxidation (Nirmalakhandan et al. 2019).

Nitrate ($32 \pm 2\%$) and orthophosphate ($41.4 \pm 3.5\%$) removal demonstrated *Chlorella* sp. eliminated part of the nutrients produced by partial mineralization of the dyes and were accumulated within the microalgae (Table 4). Nitrate removal was not particularly high, which could be due to microalgae preference for ammonium as the inorganic source of nitrogen. This process does not require previous reductions steps and is actively incorporated into the cells by the glutamine synthetase-glutamate synthase (E.C. 6.3.1.2)—(E.C. 1.4.7.1) metabolism for direct amino acid conversion, where glutamine synthase catalyzes glutamine formation from glutamate and adenosine triphosphate (ATP), (Gonçalves et al. 2017). Another factor that might have determined low nitrate removal is associated with nitrites, which increased in concentration. These ions could have been generated by nitrate reduction to nitrite, due to bacteria present during tertiary treatment under non-sterile conditions. Nitrite at various concentrations can exert an inhibitory effect on microalgae.

Regarding orthophosphates, their removal was higher in comparison with nitrates, but it might have been affected by the amount of light on *Chorella* sp., cells. Within the bioreactor when cell density is high, the same algae generate a blocking effect where light cannot go through, and not all cells receive the same luminosity, which determines that ATP and NADPH decreases and orthophosphate ions present in the secondary effluent adsorption becomes rather inefficient (Khalid et al. 2019).

Last, when tertiary effluent results were analyzed it was determined post-treated water was suitable for *Lolium perenniale* seed germination (90% germination at 5 days), (data not shown) since its final composition had low organic carbonaceous organic matter, decreased colour, neutral pH and nutrients that were easily assimilated by the plant, such as nitrates, nitrites and orthophosphates. Results obtained in this work were similar to those reported by Pedroza-Camacho et al. (2018); the same type of wastewater was used; however, a fungal/bacterial consortium carried out biological treatment. Moreover, sedimentation and filtration were used to remove activated sludge, and no microalgae were employed. In that study, final effluent was classified as Class two water suitable for irrigation favoring the growth of *Lolium perenniale* on a greenhouse scale (Pedroza-Camacho et al. 2018).

Table 6 shows differences of control parameters for pollutants removal; differentiating between biological and physicochemical treatments. It is observed that removal parameters vary depending on the treatment applied and that removal of pollutants such as NO₃-N, is difficult to eliminate in some physicochemical treatments, however, using microalgae this drawback can be overcome since the algae uses the nitrogen source as a nutrient (Wang et al. 2010).

On the other hand, the emission of greenhouse gases (CO₂) generated during physicochemical treatments harms the environment; however, microalgae have the advantage, to consume CO₂, being an important operational parameter.

Finally, the use of an open system such as *Chlorella* sp. (tertiary treatment), stands out as a viable option for wastewater treatment; since some physicochemical treatments, in addition to having a higher cost than microalgae, are waste generators that generate negative impacts on the environment (Quiñones et al. 2015; Wang et al. 2018).

Conclusions

This study presented the successful use of recombinant yeast and a recombinant enzyme for the secondary treatment at a pilot-scale of coloured CLWW. Secondary treatment with *P. pastoris* X33/pGAPZαA-*LaccPost-Stop* (Clone 1) immobilized in calcium alginate beads presented a decolouration percentage > 99%. In addition, it demonstrates immobilized cells can be re-used and maintain their colour removal capacity for at least 216 h, which opens new possibilities for a continuous treating system. For secondary treatment with rPOXA 1B free enzyme concentrate, decolouration was > 96%; demonstrating the system has the advantage to incorporate less organic matter, due to the absence of cells and initial reactivation media. *Chlorella* sp., complemented dye removal (62.2%), COD (48.3%), TOC (34%), nitrates (32%) and orthophosphates (41.4%); becoming a valuable

Table 6 Comparison of tertiary treatments

Tertiary treatment	Removal	Operational parameters affecting process	Negative effect/problems	Costs	Reference
Biological process					
Microalgae	UC 62.2% COT 48.3% TOC 34% NO ₃ ⁻ 32% Orthophosphates 41.4% Dye Removal 30%	Biomass, pH Effect of dye concentration, contact time, pH, nutrients pH, nutrients concentrations	Nitrate removal was not particularly high High dye concentration	No calculated High production cost under autotrophic laboratory conditions Dual roles of nutrient reduction and valuable biofuel feedstock production	This study Behl et al. (2019) Wang et al. (2010)
Physiochemical process					
Ozonation (AOP)	TDN > 79.0% Phosphorous > 98.0% TN 88.6–96.4% TP 99.7–99.9 COD 54.9% Micropollutants > 90.0%	Temperature, light, pH, biomass productivity, CO ₂ solubility in the culture medium, CO ₂ consumption rates Temperature, pH, Effluent organic matter concentration levels, alkalinity scavengers, ozone reactive inorganic	There are sometimes allochemicals production Increase of toxicity, low reactivity in dyes aromatic, heterocyclic and nitrogen-containing; low solubility at acidic pH	Microalgal production in open systems is less expensive (construction and operation) High production cost, and high investment and operational costs	Arbib et al. (2014) and Gonçalves et al. (2017) de Arruda Guelli Ulson de Souza et al. (2010), Chys et al. (2018) and Arzate et al. (2019)
Electrochemical advanced oxidation (AOP)	Color 55.0% (BDD anode) color 14.9% (Pt anode) TOC 17.8% (BDD anode) TOC < 2.0% (Pt anode)	Time, anode type, current density	Production of carboxylic acids (highly recalcitrant organic compound)	Technology impractical and costly (long operational times and increases in current density)	Jhones dos Santos et al. (2018)
Heterogeneous photocatalysis (AOP)	COD of 10% (only photolysis) COD ~ 45.0–77.0% (TiO ₂) COD ~ 19.0–50.0% (TVA) COD ~ 5.0–40.0% (Volcanic ashes)	Adsorption capacity and type of the materials, amounts of materials, turbidity, light intensity	Some effluent final has got a high level of genotoxicity or that grow inhibitor of green algae	Increased costs occasioned by separation of photocatalyst from water after treatment	Borges et al. (2014) and Rueda-Marquez et al. (2020)
Photocatalytic ozonation (AOP)	TOC 9.0–25.0% COD ~ 70.0%	Pollutant concentrations, ozone dose, photocatalytic load and properties, pH, temperature, irradiation wavelength	An initial increase in the concentration of phenolics compound and toxicity of effluent	Process considered expensive for wastewater treatment (UV generation with conventional lamps)	Mehrjouei et al. (2015) and Quiñones et al. (2015)

Table 6 (continued)

Tertiary treatment	Removal	Operational parameters affecting process	Negative effect/problems	Costs	Reference
Sonolysis (AOP)	TOC 28.4% COD 16.2% BOD ₅ 8.3% TN 39.6% NH ₃ -N 14.5% TP 14.5%	Temperature, ultrasound range, power density, power input, pollutant concentration	Process has a low mineralizing ability that it is not enough to comply with an acceptable water quality; the increased temperature by the ultrasound affecting the disinfection efficiency	When sonolysis is combined with processes like ozonation, demands high economical costs. The economic cost is in function of energy consumption	Torres-Palma and Serna-Galvis (2018) and Vázquez-López et al. (2019)
Photo-fenton (AOP)	Total polyphenols ~ 90.0% COD ~ 90.0% DOC 4.0–36.0% Micropollutants > 90.0%	pH, sales (FeSO ₄), UV radiation, H ₂ SO ₄ , H ₂ O ₂ and KOH concentration	Waste generated are low biodegradability (ratio rbCOD/COD 0.45); Required a strongly acidic pH to avoid precipitation of iron. CO ₂ liberation during acidification stage	High cost associated with its installation and the energy demand	Lucas et al. (2012) and Arzate et al. (2019)
Ultrafiltration (membrane processes)	COD 78.8% BOD 87.5.4%	Cross-flow velocity, trans-membrane pressure and backflushing methods	Operative problems in wastewater with high solids	High cost	Tchobanoglous et al. (1998)
Coagulation/filtration (Membrane processes)	COD 24.5–35.2% TS 50.0–74.0% TN 3.8–19.2% TP 55.0–80.0%	TSS, Temperature, pH, Filtration rate of D/V filter (m/h), hydraulic retention time of coagulation tank	Increase of 61% of total GHG emissions generated from electricity use; coagulation/filtration processes had no significant effect on TN removal causing eutrophication by NO ₃ -N permanence	High consumption of electricity increased cost of technology; depending on filter type the costs fluctuate between 324.6 and 84.8 USD/t COD eq removed	Wang et al. (2018)
Filtration (Sand)	Turbidity 80.0% SS 72.0% TSS 83.0–98.0% COD 43% BOD 47.0–74.0%	Filtration rates (m/h), size of suspended solids, filters with an effective size filters and uniformity coefficient filters	Operative problem with particles less than 20 microm because are not removed efficiently	The technology is more economical using local sand	Al-Jadhai (2003) and Zahid (2003)

option for CLWW tertiary treatment. Data presented demonstrate a promissory alternative for coloured CLWW sequential treatment.

Acknowledgements This research was funded by Grant No: 00007885 (*Estudio de la estabilidad a tiempo real del concentrado de la lacasa rPOXA 1B de Pleurotus ostreatus producida en Pichia pastoris*) and Grant ID: 00007135 (*Diseño, implementación y evaluación a escala de laboratorio de un sistema secuencial para la remoción de color y carga orgánica presente en los subproductos líquidos derivados de las tinciones de microbiología, con fines de re uso en zonas verdes.*) from Pontificia Universidad Javeriana. Financing entity had no role in the study design, data collection, or analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Authors thank to María Lucía Gutiérrez, Ph.D., for English editing.

Author contributions Conceived and designed the analyses: CMR-H, RAP-P, AMP-R, AP-F, BEQ-H. Acquired funding: AMP-R, RAP-P. Collected the data and performed the analyses: LDA-L, VH-R, DNC-B, JFM-M, LDP-C. Administered resources for the project: AMP-R, RAP-P. Wrote the paper: LDA-L, AMP-R, RAP-P. Performed critical review of the manuscript with editions: AMP-R, CMR-H, RAP-P, AP-F, BEQ-H.

Compliance with ethical standards

Conflict of interests The authors declare they have no competing interests.

References

- Abdel-Kareem O (2012) History of dyes used in different historical periods of Egypt. *Res J Text Appar* 16(4):79–92
- AI-Jadhai IS (2003) Pilot-plant study of the tertiary filtration of wastewater using local sand. *J King Saud Univ Eng Sci* 16:83–96
- American Public Health Association A, American Water Works Association A, Water Environment Federation W (2005) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st edn. Washington DC., USA
- American Society for Testing and Materials A (1994) Standard test method for total carbon in water by ultraviolet, or persulfate oxidation, or both, and infrared detection. D4839-88. American Soc. Testing & Materials, Philadelphia, USA
- Arbib Z, Ruiz J, Álvarez-Díaz P, Garrido-Pérez C, Perales JA (2014) Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production. *Water Res* 49:465–474. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.036>
- Ardila-Leal LD, Albarracín-Pardo DA, Rivera-Hoyos CM, Morales ED, Poutou-Piñales RA, Cardozo-Bernal AM, Quevedo-Hidalgo BE, Pedroza-Rodríguez AM, Díaz-Rincón DJ, Rodríguez-Lopez A, Almcéiga-Díaz CJ, Cuervo-Patiño CL (2019) Media improvement for 10 L bioreactor production of rPOXA 1B laccase by *P. pastoris*. *3 Biotech* 9(12):447. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1979-y>
- Arias DM, Solé-Bundó M, Garfí M, Ferrer I, García J, Uggetti E (2018) Integrating microalgae tertiary treatment into activated sludge systems for energy and nutrients recovery from wastewater. *Bioresour Technol* 247:513–519. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.123>
- Arzate S, Pfister S, Oberschelp C, Sánchez-Pérez JA (2019) Environmental impacts of an advanced oxidation process as tertiary treatment in a wastewater treatment plant. *Sci Total Environ* 694:133572. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.378>
- Baily RE (2009) *Sludge: types, treatment processes and disposal*. Nova Science Publishers Inc, Hauppauge
- Barrios-Ziolo LF, Gaviria-Restrepo LF, Agudelo EA, Cardona-Gallo SA (2015) Technologies for the removal of dyes and pigments present in wastewater. A review. *Dyna* 82(191):118–126. <https://doi.org/10.15446/dyna.v82n191.42924>
- Behl K, Sinha S, Sharma M, Singh R, Joshi M, Bhatnagar A, Nigam S (2019) One-time cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in aqueous dye solution supplemented with biochar for microalgal growth, dye decolorization and lipid production. *Chem Eng J* 364:552–561. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.01.180>
- Bilal M, Ashraf SS, Barceló D, Iqbal HMN (2019) Biocatalytic degradation/redefining “removal” fate of pharmaceutically active compounds and antibiotics in the aquatic environment. *Sci Total Environ* 691:1190–1211. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.224>
- Bilinska L, Gmurek M, Ledakowicz S (2016) Comparison between industrial and simulated textile wastewater treatment by AOPs—biodegradability, toxicity and cost assessment. *Chem Eng J* 306:550–559. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.07.100>
- Blair MF, Kokabian B, Gude VG (2014) Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *J Environ Chem Eng* 2:665–674. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.11.005>
- Blanco-Vargas A, Ramírez-Sierra CF, Duarte-Castañeda M, Beltrán-Villarraga M, Medina LK, Florido-Cuellar A-E, Cardona-Bedoya JA, Campos-Pinilla C, Pedroza-Rodríguez AM (2018) A novel textile wastewater treatment using ligninolytic co-culture and photocatalysis with TiO₂. *Univ Sci* 23(3):437–464. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC23-3.antw>
- Borges ME, Hernández T, Esparza P (2014) Photocatalysis as a potential tertiary treatment of urban wastewater: new photocatalytic materials. *Clean Technol Environ Policy* 16:431–436. <https://doi.org/10.1007/s10098-013-0637-z>
- Chang Q, Jiang G, Tang H, Li N, Huang J, Wu L (2015) Enzymatic removal of chlorophenols using horseradish peroxidase immobilized on superparamagnetic Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposite. *Chin J Catal* 36:961–968. [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(15\)60856-7](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(15)60856-7)
- Chys M, Demeestere K, Nopens I, Audenaert WTM, Van Hulle SWH (2018) Municipal wastewater effluent characterization and variability analysis in view of an ozone dose control strategy during tertiary treatment: the status in Belgium. *Sci Total Environ* 625:1198–1207. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.032>
- de Arruda Guelli Ulson de Souza SM, Santos Bonilla KA, Ulson de Souza AA (2010) Removal of COD and color from hydrolyzed textile azo dye by combined ozonation and biological treatment. *J Hazard Mater* 179:35–42. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.02.053>
- Deblonde T, Cossu-Leguille C, Hartemann P (2011) Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *Int J Hyg Environ Health* 214:442–448. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002>
- Dichter G, LeChevallier MW (2017) 9215 heterotrophic plate count. In: Baird RB, Eaton AD, Rice EW, Bridgewater LL (eds) *Standard methods for examination of water and wastewater*, 23rd edn. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington DC, pp 53–59. <https://doi.org/10.2105/SMWW.2882.216>
- Dirbaz M, Roosta A (2018) Adsorption, kinetic and thermodynamic studies for the biosorption of cadmium onto microalgae *Parachlorella* sp. *J Environ Chem Eng* 6:2302–2309. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.03.039>
- Ditta A, Bibi R, Hussain A, Noureen S, Khalid A, Aziz I (2016) Production of algal biomass using different dilutions of textile effluent wastewater. *Sci Lett* 4(1):71–77

- Drumond Chequer FM, Rodrigues de Oliveira GA, Anastácio Ferraz ER, Carvalho Cardoso J, Boldrin Zanoni MV, Palma de Oliveira D (2013) Textile dyes: dyeing process and environmental impact. In: Gunay M (ed) Eco-friendly textile dyeing and finishing. IntechOpen, pp 151–176. <https://doi.org/10.5772/3436>
- El-Batal AI, ElKenawy NM, Yassin AS, Amin MA (2015) Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles. *Biotechnol Rep* 5:31–39. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.11.001>
- Environmental Protection Agency (EPA) (2005) Biosolids generation, use, and disposal in the United States. EPA, Washington, DC
- Fazal T, Mushtaq A, Rehman F, Khan AU, Rashid N, Farooq W, Rehman MSU, Xu J (2018) Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae. *Renew Sustain Energy Rev* 82:3107–3126. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.10.029>
- Fernández JA, Suan A, Ramírez JC, Robles J, Salcedo JC, Pedroza AM, Daza CE (2016) Treatment of real wastewater with TiO₂-films sensitized by a natural-dye obtained from *Picramnia sellowii*. *J Environ Chem Eng* 4:2848–2856. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.05.037>
- Ferrer Polo J, Seco Torrecillas A, Robles Martínez A (2018) Tratamientos biológicos de las aguas residuales, 3rd edn. Editorial UPV, Valencia
- Ferrera-Cerrato R, Rojas-Avelizapa NG, Poggi-Varaldo HM, Alarcón A, Cañizares-Villanueva RO (2006) Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48(2):179–187
- Forgacs E, Cserhádi T, Oros G (2004) Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environ Int* 30:953–971
- Furuhashi Y, Honda R, Noguchi M, Hara-Yamamura H, Kobayashi S, Higashimine K, Hasegawa H (2019) Optimum conditions of pH, temperature and preculture for biosorption of europium by microalgae *Acutodesmus acuminatus*. *Biochem Eng J* 143:58–64. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.12.007>
- Gonçalves AL, Pires JCM, Simões M (2017) A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Res* 24:403–415. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>
- Gouzy-Olmos M, Cháves-Tequia LM, Rojas-Fajardo MF, Morales-Álvarez ED, Rivera-Hoyos CM, Poutou-Piñales RA, González-Neira EM, Reyes-Montañón EA, Cardozo-Bernal AM, Gómez-Méndez LD, Pedroza-Rodríguez AM (2018) Statistical improvement of batch culture with immobilized *Pichia pastoris* cells for rPOXA 1B laccase production. *Am J Biochem Biotechnol* 14(2):88–107. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2018.88.107>
- Guedes AMFM, Madeira LMP, Boaventura RAR, Costa CAV (2003) Fenton oxidation of cork cooking wastewater—overall kinetic analysis. *Water Res* 37:3061–3069. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00178-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00178-7)
- Hach Company/Hach Lange GmbH (2007) HACH 8507: nitrogen nitrite-low range, diazotization method for water and wastewater
- Hach Company/Hach Lange GmbH (2014) Nitrate, cadmium reduction method (Method 8171)
- Hu X, Meneses YE, Stratton J, Wang B (2019) Acclimation of consortium of micro-algae help removal of organic pollutants from meat processing wastewater. *J Clean Prod* 214:95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.12.255>
- Hung C-P, Lo H-F, Hsu W-H, Chen S-C, Lin L-L (2008) Immobilization of *Escherichia coli* novablue γ -glutamyltranspeptidase in Ca-alginate-k-carrageenan beads. *Appl Biochem Biotechnol* 150:157–170. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8244-x>
- Jada A, Ait Akbour R, Douch J (2006) Surface charge and adsorption from water onto quartz sand of humic acid. *Chemosphere* 64:1287–1295. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.12.063>
- Jhones dos Santos A, de Araújo T, Costa EC, Ribeiro da Silva D, Garcia-Segura S, Martínez-Huitle CA (2018) Electrochemical advanced oxidation processes as decentralized water treatment technologies to remediate domestic washing machine effluents. *Environ Sci Pollut Res* 25:7002–7011. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1039-2>
- Ji C, Nguyen LN, Hou J, Hai FI, Chen V (2017) Direct immobilization of laccase on titania nanoparticles from crude enzyme extracts of *P. ostreatus* culture for micro-pollutant degradation. *Sep Purif Technol* 178:215–223. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.043>
- Kashefi S, Borghei SM, Mahmoodi NM (2019) Covalently immobilized laccase onto graphene oxide nanosheets: preparation, characterization, and biodegradation of azo dyes in colored wastewater. *J Mol Liq* 276:153–162. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.11.156>
- Khalid AAH, Yaakob Z, Sheikh Abdullah SR, Takriff MS (2019) Analysis of the elemental composition and uptake mechanism of *Chlorella sorokiniana* for nutrient removal in agricultural wastewater under optimized response surface methodology (RSM) conditions. *J Clean Prod* 210:673–686. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.11.095>
- Khandare RV, Govindwar SP (2015) Phytoremediation of textile dyes and effluents: current scenario and future prospects. *Biotechnol Adv* 33:1697–1714. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.09.003>
- Khataee A, Dehghan G, Zarei M, Fallah S, Niaei G, Atazadeh I (2013) Degradation of an azo dye using the green macroalga *Enteromorpha* sp. *Chem Ecol* 29(3):221–233. <https://doi.org/10.1080/02757540.2012.744831>
- Langergraber G, Fleischmann N, Hofstaedter F, Weingartner A (2004) Monitoring of a paper mill wastewater treatment plant using UV/VIS spectroscopy. *Water Sci Technol* 49(1):9–14
- Li K, Liu Q, Fang F, Luo R, Lu Q, Zhou W, Huo S, Cheng P, Liu J, Addy M, Chen P, Chen D, Ruan R (2019) Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: a review. *Biores Technol* 291:121934. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121934>
- Livernoche D, Jurasek L, Desrochers M, Dorica J (1983) Removal of color from Kraft mill wastewater with cultures of white rot fungi and with immobilized mycelium of *Coliorus versicolor*. *Biotechnol Bioeng* 24(8):2055–2065
- Lucas MS, Peres JA, Amor C, Prieto-Rodríguez L, Maldonado MI, Malato S (2012) Tertiary treatment of pulp mill wastewater by solar photo-Fenton. *J Hazard Mater* 225–226:173–181. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.013>
- Malvis A, Hodaifa G, Halioui M, Seyedsalehi M, Sa S (2019) Integrated process for olive oil mill wastewater treatment and its revalorization through the generation of high added value algal biomass. *Water Res* 151:332–342. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.026>
- Mara D, Horan N (2003) Handbook of water and wastewater microbiology. Academic Press, California
- Mehrjoui M, Müller S, Möller D (2015) A review on photocatalytic ozonation used for the treatment of water and wastewater. *Chem Eng J* 263:209–219. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.10.112>
- Mendoza L, Jonstrup M, Hatti-Kaul R, Mattiasson B (2011) Azo dye decolorization by a laccase/mediator system in a membrane reactor: enzyme and mediator reusability. *Enzyme Microb Technol* 49:478–484. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.08.006>
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (2014) Resolución 1207 de 2014. Por la cual se adoptan disposiciones relacionadas con el uso de aguas residuales tratadas. Bogotá, DC, Colombia
- Morales-Álvarez ED, Rivera-Hoyos CM, González-Ogliastri N, Rodríguez-Vázquez R, Poutou-Piñales RA, Daza CE, Pedroza-Rodríguez AM (2016) Partial removal and detoxification of Malachite Green and Crystal Violet from laboratory artificially contaminated

- water by *Pleurotus ostreatus*. *Univ Sci* 21(3):259–285. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC21-3.prad>
- Morales-Álvarez ED, Rivera-Hoyos CM, Chaparro-Núñez LE, Daza CE, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM (2017) Decolorization and detoxification of Malachite Green by *Ganoderma lucidum*: key operating parameters and adsorption studies. *J Environ Eng* 143(4):04016093. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001180](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001180)
- Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* 27:31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- Nirmalakhandan N, Selvaratnam T, Henkanatte-Gedera SM, Tchinda D, Abeyasiriwardana-Arachchige ISA, Delanka-Pedige HMK, Munasinghe-Arachchige SP, Zhang Y, Holguin FO, Lammers PJ (2019) Algal wastewater treatment: photoautotrophic vs. mixotrophic processes. *Algal Res* 41:101569. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101569>
- Otto B, Schlosser D (2014) First laccase in green algae: purification and characterization of an extracellular phenol oxidase from *Tetracystis aeria*. *Planta* 240:1225–1236. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2144-9>
- Pedroza-Camacho LD, Lores-Acosta JC, Rojas-Enríquez JF, Mateus-Maldonado JF, Puentes CS, Ramírez-Rodríguez J, Mendez-Casallas FJ, Salcedo-Reyes JC, Díaz-Ariza LA, Lozano-Puentes HS, Pedroza-Rodríguez AM (2018) Effect of domestic wastewater as co-substrate on biological stain wastewater treatment using fungal/Bacterial consortia in pilot plant and greenhouse reuse. *J Water Resour Protect* 10:369–393. <https://doi.org/10.4236/jwarp.2018.103020>
- Piscitelli A, Giardina P, Mazzoni C, Sannia G (2005) Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces fragilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:428–439
- Quiñones DH, Álvarez PM, Rey A, Contreras S, Beltrán FJ (2015) Application of solar photocatalytic ozonation for the degradation of emerging contaminants in water in a pilot plant. *Chem Eng J* 260:399–410. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.08.067>
- Rani B, Kumar V, Singh J, Bisht S, Teotia P, Sharma S, Kela R (2014) Bioremediation of dyes by fungi isolated from contaminated dye effluent sites for bio-usability. *Braz J Microbiol* 45(3):1055–1063
- Ratkovich N, Horn W, Helmus FP, Rosenberger S, Naessens W, Nopens I, Bentzen TR (2013) Activated sludge rheology: a critical review on data collection and modelling. *Water Res* 47:463–482. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.021>
- Rice EW (2017) Standard methods for the examination of water and wastewater 2540 A, 23rd edn. Water Environment Federation, Alexandria
- Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R, Delgado-Boada JM (2013) Fungal laccases. *Fungal Biol Rev* 27(3–4):67–82. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2013.07.001>
- Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poveda-Cuevas SA, Reyes-Guzmán EA, Poutou-Piñales RA, Reyes-Montañón EA, Pedroza-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R, Cardozo-Bernal AM (2015) Computational analysis and low-scale constitutive expression of laccase synthetic genes *GILCC1* from *Ganoderma lucidum* and *POXA 1B* from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris*. *PLoS One* 10(1):e0116524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116524.g002>
- Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Abelló-Esparza J, Buitrago-Pérez DF, Martínez-Aldana N, Salcedo-Reyes JC, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM (2018) Detoxification of pulping black liquor with *Pleurotus ostreatus* or recombinant *Pichia pastoris* followed by CuO/TiO₂/visible photocatalysis. *Sci Rep* 8:3503. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21597-2>
- Roman R, Torres Duarte C, Ayala M, Vázquez Duhalt R (2010) Producción a escala piloto de lacasa de *Corioliopsis gállica*. *Revista Mexicana de Micología* 32:19–27
- Rueda-Marquez JJ, Levchuk I, Fernández Ibañez P, Sillanpää M (2020) A critical review on application of photocatalysis for toxicity reduction of real wastewaters. *J Clean Prod* 258:120694. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120694>
- Santos FM, Pires JCM (2018) Nutrient recovery from wastewaters by microalgae and its potential application as bio-char. *Biores Technol* 267:725–731. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.119>
- Shon H, Vigneswaran S, Kandasamy J, Zareie M, Kim J, Cho D, Kim JH (2009) Preparation and characterization of titanium dioxide (TiO₂) from sludge produced by TiCl₄ flocculation with FeCl₃, Al₂(SO₄)₃ and Ca(OH)₂ coagulant aids in wastewater. *Sep Sci Technol* 44:1525–1543. <https://doi.org/10.1021/es062062g>
- Solís M, Solís A, Pérez HI, Manjarrez N, Flores M (2012) Microbial decolouration of azo dyes: a review. *Process Biochem* 47:1723–1748. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.08.014>
- Tanaka H, Matsumura M, Veliky IA (1984) Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng* XXVI:053–058
- Tchobanoglous G, Darby J, Bourgeois K, McArdle J, Genest P, Tylla M (1998) Ultrafiltration as an advanced tertiary treatment process for municipal wastewater. *Desalination* 119:315–322
- Tchobanoglous G, Stensel HD, Tsuchihashi R, Burton FL, Abu-Orf M, Bowden G, Pfang W (2013) Wastewater engineering: treatment and resource recovery. MC Graw Hill Education, New York
- Torres-Palma RA, Serna-Galvis EA (2018) Sonolysis. In: Ameta SC, Ameta R (eds) Advanced oxidation processes for wastewater treatment: emerging green chemical technology. Academic Press, Cambridge, pp 177–213. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-00384-4>
- Vázquez-López M, Amabilis-Sosa LE, Moeller-Chávez EG, Roé-Sosa A, Neumann P, Vidal G (2019) Evaluation of the ultrasound effect on treated municipal wastewater. *Environ Technol Innov* 40(27):3568–3577. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1481889>
- Vyavahare G, Jadhav P, Jadhav J, Patil R, Aware C, Patil D, Gophane A, Yang Y-H, Gurav R (2019) Strategies for crystal violet dye sorption on biochar derived from mango leaves and evaluation of residual dye toxicity. *J Clean Prod* 2017:296–305. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.09.193>
- Wang L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, Liu Y, Wang Y, Ruan R (2010) Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Appl Biochem Biotechnol* 162:1174–1186. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8866-7>
- Wang D, Guo F, Wu Y, Li Z, Wu G (2018) Technical, economic and environmental assessment of coagulation/filtration tertiary treatment processes in full-scale wastewater treatment plants. *J Clean Prod* 170:1185–1194. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.231>
- Won K, Kim S, Kim K-J, Park HW, Moon S-J (2005) Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochem* 40:2149–2154. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.08.014>
- Yu KL, Show PL, Ong HC, Ling TC, Lan JC-W, Chen W-H, Chang J-S (2017) Microalgae from wastewater treatment to biochar—feedstock preparation and conversion technologies. *Energy Convers Manag* 150:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.07.060>
- Zahid WMK (2003) Tertiary filtration of wastewater using local sand. *J King Saud Univ Eng Sci* 16:23–35. [https://doi.org/10.1016/S1018-3639\(18\)30778-5](https://doi.org/10.1016/S1018-3639(18)30778-5)
- Zhao YX, Gao BY, Shon HK, Cao BC, Kim J-H (2011) Coagulation characteristics of titanium (Ti) salt coagulant compared with aluminum (Al) and iron (Fe) salts. *J Hazard Mater* 185:1536–1542. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.10.084>