



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS



Tema: Producción de la enzima recombinante Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis* para la degradación de residuos agroindustriales

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología

Autora: Angélica Shimabel Penafiel Cargua

Tutor: PhD. David Andrés Terán Mera

Ambato-Ecuador

Diciembre -2019

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. David Andrés Terán Mera

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que corresponde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad

Ambato, 30 de Septiembre del 2019



PhD. David Andrés Terán Mera

C.I. 1716569726

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Angélica Shimabel Peñafiel Cargua, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación modalidad proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas



Srta. Angélica Shimabel Peñafiel Cargua

C.I. 0604899419

AUTORA

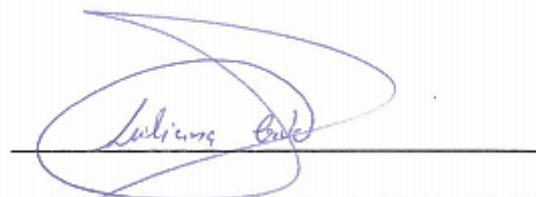
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato

Para consistencia firman

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Liliana Cerda', written over a horizontal line.

Presidente del Tribunal

A handwritten signature in blue ink, 'Liliana Cerda', written over a horizontal line.

Ing. Liliana Alexandra Cerda Mejía, Ph.D.

C.I. 180414808-6

A handwritten signature in blue ink, 'Mario Daniel García Solís', written over a horizontal line.

Ing. Mario Daniel García Solís, Ph.D.

C.I. 1103605471

Ambato, 08 de Noviembre del 2019

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos de línea patrimoniales de mi proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Angélica Shimabel Peñafiel Cargua

C.I. 060489941-9

AUTOR

DEDICATORIA

En primera instancia, este logro se lo dedico infinitamente a Dios, porque en su misericordia y gracia, me ha otorgado la sabiduría, inteligencia y fortaleza para seguir en adelante, y no desmayar, a pesar de las circunstancias que se ha presentado en mi diario vivir.

A mi madre querida, Leonor Cargua, por darme la oportunidad de vivir, sabiendo en las condiciones que Dios me trajo al mundo. Gracias Mamita por nunca rendirse y luchar día tras día con la ayuda del Señor para cuidarme, apoyarme, reprenderme, y por confiar primero en Dios y luego en mí para lograr alcanzar esta meta.

A mi hermana, Elin Peñafiel, por sus consejos, enseñanzas y apoyo mutuo brindado. Gracias mucamita bella, por tu cuidado cuando más lo necesite. A mi sobrinita, Amy Torres por su ternura y ocurrencias compartidas.

A mi Padre Ángel Peñafiel y Abuelitos Eugenia Cargua y Gabriel Cargua, Tíos, primos, y amistades de la familia, por su cariño y palabras de aliento en cada momento.

A mi amiga María José Ríos por compartir conmigo una amistad linda, llena de sinceridad, gratitud y paciencia.

A mis amigas y compañeros de estudio, por brindarme su amistad y confianza, durante mi formación profesional.

Bástate mi gracia; porque mi poder se perfecciona en la debilidad. Por tanto, de buena gana me gloriaré más bien en mis debilidades, para que repose sobre mí el poder de Cristo (2 Corintios, 12:7)

AGRADECIMIENTO

A Dios, por permitirme alcanzar esta meta; porque todas las cosas son de él, por él y para él.

A toda mi familia, quienes han sido y serán el pilar fundamental en mi vida.

A la Universidad Técnica de Ambato, y por medio de ella, a la Facultad de Ciencia e ingeniería en Alimentos por la oportunidad de formarme profesionalmente, a través de los conocimientos impartidos por cada docente.

Agradezco de manera muy especial a mi tutor, el Dr. David Terán por el tiempo, paciencia, palabras de aliento, y sobre todo por la confianza y conocimientos impartidos para culminar esta investigación. Gracias de todo corazón por su amistad y que Dios me lo bendiga en cada momento.

A mis calificadores, el Dr. Mario García, y a la Dra. Liliana Cerda, por sus conocimientos impartidos, paciencia y tiempo para la finalización del presente proyecto de investigación. Sin duda alguna, son Docentes a los que admiro y valoro mucho.

A la Dra. Gabriela Cruz y a los docentes que conforman el Departamento DIBESAU, por permitirme ser parte del Grupo sin Límites. Sin duda alguna es un departamento que se preocupan por el bienestar del estudiante, tanto en lo académico como en lo personal. Gracias por estar pendiente de mí desde el primer día en la Universidad, hasta la finalización de mi carrera universitaria.

A mis compañeros y amigos, Lily, Andre, Aby, Ronald, Fabry, Jhony, Jorge, Ale, Alexa y Jose, por compartirme su amistad, ocurrencias y consejos.

Angélica Shimabel Peñafiel Cargua.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	II
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	III
DEDICATORIA.....	VI
AGRADECIMIENTO.....	VII
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	1

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1	Biomasa lignocelulósica en el Ecuador.....	4
1.2	Importancia de enzimas en la degradación de material lignocelulósico.....	7
1.3	Enzimas con actividad celulósica.....	8
1.4	Antecedentes investigativos.....	9
1.5	OBJETIVOS.....	11
1.5.1	General.....	11
1.5.2	Específicos.....	11
1.6	HIPÓTESIS.....	11
1.6.1	Hipótesis nula.....	11
1.6.2	Hipótesis alternativa.....	11
1.7	Señalamiento de variables de la hipótesis.....	11
1.7.1	Variable independiente.....	11
1.7.2	Variable dependiente.....	11

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1	Microorganismos y plásmido utilizado.....	12
2.2	Extracción de ADN plasmídico.....	12
2.3	Preparación de medio de cultivo y antibiótico.....	12
2.3.1	Medio de cultivo.....	12
2.3.2	Antibióticos e inductor.....	13
2.4	Transformación de células competentes con plásmido de interés.....	13
2.4.1	Inoculación y cultivo de microorganismos.....	13
2.4.2	Preparación de las células competentes.....	13
2.4.3	Transformación de células.....	14

2.5	Producción de enzima.....	14
2.5.1	Preparación del inóculo	14
2.5.2	Cultivo en matraz	14
2.5.3	Obtención de los extractos celulares (proteína de interés)	15
2.6	Análisis de expresión de proteína recombinante Cel6D	15
2.7	Determinación de la concentración aparente de proteína en el extracto celular	15
2.8	Preparación de sustrato específico sintético y residuos lignocelulósicos	15
2.8.1	Sustrato específico sintético PASC.....	15
2.8.2	Residuos lignocelulósicos.....	16
2.9	Determinación de la actividad enzimática en sustrato específico y residuos lignocelulósicos.....	16
2.10	Identificación de los productos de reacción mediante cromatografía de capa fina.....	17
2.11	Diseño experimental y Análisis estadístico	17

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1	Análisis y discusión de los datos	18
3.1.1	Expresión de la proteína Cel6D de <i>Paenibacillus barcinonensis</i> en la bacteria (<i>E.coli</i>).....	18
3.1.2	Cuantificación de Azúcares reductores.....	19
3.1.3	Actividad específica aparente sobre el sustrato específico (PASC) y residuos agroindustriales	20
3.1.4	Análisis de los productos de reacción mediante cromatografía de capa fina.....	25
3.2	Verificación de la Hipótesis	26

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1	CONCLUSIONES.....	27
4.2	RECOMENDACIONES	28
5.	MATERIAL DE REFERENCIA.....	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición química de los diferentes residuos agroindustriales	6
Tabla 2: Aplicaciones de las enzimas en diferentes áreas industriales	7
Tabla 3: Antibióticos e inductor con su respectiva concentración utilizada	13
Tabla 4: Factores y niveles del diseño experimental	17
Tabla 5: Valores obtenidos de la cuantificación de azúcares reductores (mg/mL) ..	20
Tabla 6: Actividad específica aparente U/mg	21
Tabla 7: Análisis de Varianza para la actividad específica aparente de Cel6D sobre diferentes residuos lignocelulósicos (U/ mg proteína).....	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura del material lignocelulósico en la que se señala a la celulosa de color verde, hemicelulosa de color amarillo y a la lignina en enlaces. Figura adaptada de Ribeiro, et al., (2016).....	6
Figura 2: Extractos de la fracción soluble: (A) E. coli (TFH2) /pET28aCel6D y (B) E. coli BL21 (DE3) / pET28aCel6D, electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	19
Figura 3: Estabilidad de celulasas (Cel6D) sobre PASC en relación a la temperatura. Figura adaptada de Cerda (2016).....	21
Figura 4: Prueba de Tuckey al 95% de confianza para los diferentes sustratos celulósicos: Bagazo de caña; Residuos cáscara de cacao y Rastrojo de Maíz.....	23
Figura 5: Actividad específica obtenida de los diferentes residuos lignocelulósicos: Bagazo de caña); Residuos cáscara de cacao; Rastrojo de Maíz y Salvado de arroz; en función de los tiempos de incubación: 30, 120 y 240 min respectivamente.....	24
Figura 6: Análisis mediante cromatografía de capa fina de alta resolución de los productos generados de la degradación enzimática de sustratos celulósicos. Para cada sustrato (10 mg) se incubó con la enzima Cel6D (100 µl) a 55°C. Las diferentes muestras, se tomaron a tiempos entre 2 y 4 horas: Salvado de arroz (SA), Rastrojo de Maíz (RTM), Residuo cáscara de Cacao (RCC) y Bagazo de Caña (BC). Estándar de azúcar: Glucosa (EG) y como muestra de Celobiosa (EC) se utilizó el hidrolizado del PASC	25

RESUMEN

El presente estudio de investigación tiene como objetivo obtener la enzima celulasa a partir de expresión de proteína Cel6D de *Paenibacillus Barcinonensis* en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) y BL21 (TFH2), y analizar si la enzima celulasa tiene la capacidad de degradar los residuos agroindustriales por medio de la actividad específica aparente (U/mg proteína).

Para una mayor accesibilidad de la enzima a la celulosa, los residuos se sometieron a un pretratamiento mecánico, y reducción de tamaño de partícula para aumentar el área de superficie y reducir el grado de cristalinidad.

La actividad específica aparente medida a través de la cuantificación de azúcares reductores luego de la hidrólisis enzimática a una temperatura de 25°C a tiempos de incubación de 30, 120 y 240 min; la celulasa mostró actividad sobre el PASC, bagazo de caña, cáscara de cacao, rastrojo de maíz con un valor de 0,0001; 0,0028; 0,0016 y 0,0011 (U/mg proteína). Pero no se observó actividad enzimática cuando el sustrato fue el salvado de arroz.

Además, se realizó la identificación de los productos generados en la actividad específica, indicando que, la enzima celobiohidrolasa Cel6D hidroliza celobiosa y posiblemente glucosa, en la cáscara de cacao, bagazo de caña y rastrojo de maíz.

Palabras claves: Residuos agroindustriales, celulasa, *Paenibacillus barcinonensis*, celobiosa, celulosa.

ABSTRACT

The present research study aims to obtain the cellulase enzyme from the expression of *Paenibacillus Barcinonensis* Cel6D protein in *E. coli* BL21 (DE3) and BL21 (TFH2) bacteria, and analyze whether the cellulase enzyme has the ability to degrade waste agroindustrial through the apparent specific activity (U / mg protein).

For greater accessibility of the enzyme to cellulose, the residues were subjected to mechanical pretreatment, and particle size reduction to increase the surface area and reduce the degree of crystallinity.

The specific apparent activity measured through the quantification of reducing sugars after enzymatic hydrolysis at a temperature of 25 °C at incubation times of 30, 120 and 240 min; the cellulase showed activity on the PASC, cane bagasse, cocoa husk, corn stubble with a value of 0.0001; 0.0028; 0.0016 and 0.0011 (U / mg protein). But no enzymatic activity was observed when the substrate was rice bran.

Moreover, the identification of products of the enzymatic hydrolysis of agroindustrial waste was tested, showing that the celobiohidrolase Cel6D is capable of hydrolyze the cacao shell, cane bagasse and corn stubble producing cellobiose and occasionally glucose.

Keywords: Agroindustrial wastes, cellulase, *Paenibacillus barcinonensis*, cellobiose, cellulose.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

Una de las principales causas que genera contaminación ambiental, y económica en el Ecuador es la gran cantidad de residuos agroindustriales procedentes de la agricultura y la industria alimentaria (**Samaniego & Espinoza, 2016**). Debido a que estos residuos no son tratados adecuadamente, y estos son sometidos a un proceso de combustión libre el cual genera emisiones de CO₂, CO y entre otros que provocan efecto invernadero (**Abdulla & Shatoury, 2007 y Samaniego & Espinoza, 2016**).

Una posible solución a esta problemática es la degradación de estos residuos agroindustriales por medio de celulasas excretadas por microorganismos (**Andersen, 2007; Ezeji et al., 2007 y Kristensen et al., 2009**), puesto que, estas enzimas permiten degradar la celulosa que es el componente principal de la membrana celular de la planta vegetal (**Jiménez, 2012; Gutiérrez et al., 2014**). El producto obtenido como resultado de la degradación celulolítica puede ser utilizado como materia prima para la generación de biocombustible, como el etanol o productos de valor agregado (**Piñeros, 2016**). Es por tal motivo que se los considera a los residuos lignocelulósicos como una potencial fuente de energía renovable (**Zhang & Lynd, 2004 y Kristensen et al., 2009**)

1.1 Biomasa lignocelulósica en el Ecuador

En el Ecuador, los residuos agroindustriales más representativos generados por la agricultura y las grandes industrias son: salvado de arroz, bagazo de caña, cáscara de cacao y rastrojo de Maíz (Tallo, hojas); los cuales se detallan a continuación:

- El salvado de arroz, según estudio realizado en el 2009 por la Corporación para la investigación energética (**CIE**) indica que, existe alrededor de 1'322 862 toneladas métricas (TM) de salvado de arroz al año.
- Bagazo de caña obtenido luego de extracción del jugo de caña, se genera anualmente 158 000 toneladas métricas (TM) de la producción de caña de azúcar (5' 618 045 TM) cultivada en 79,913 Hectáreas (Has) (**Pozo, 2011**)

- Cáscara de cacao correspondiente al 70-75% del peso de cacao, y se genera 176 000 (TM) al año (**Sánchez, 2013**).
- Rastrojo de maíz correspondiente al tallo y hojas, se genera entre el 20 y 35% de rastrojos de la producción cultivada en 60 000 hectáreas de maíz (**MAGAP, 2013**).

Los residuos lignocelulósicos, en lo general, representan pérdidas económicas para los agricultores y problemas ambientales, ya que, estos residuos son acumulados para ser quemados, provocando de tal manera daños al medio ambiente y a la salud humana por las emisiones indeseadas (**Sánchez et al., 2010 y Samaniego & Espinoza, 2016**). Sin embargo, por su gran disponibilidad, importancia y su bajo costo, hoy en día están siendo utilizados como materia prima para la obtención de azúcares simples por medio de la degradación de celulosa (**Michelin et al., 2013**).

El material lignocelulósico a más de estar constituido por celulosa, también se encuentra formado por hemicelulosa y lignina (**Figura 1**). Cada componente presenta diferente estructura, y se sitúa en diferente posición de la pared celular de la planta.

La celulosa es un polisacárido lineal insoluble y rígido formado por unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos β -1,4. Las cuales se sitúan en las microfibrillas (cadena larga lineal) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waal; por tanto, se lo considera como una estructura cristalina muy resistente a la hidrólisis enzimática (**Carranza, 2010 y Granda, 2011**).

La hemicelulosa que se localiza en la parte intermedia entre la celulosa y lignina, está formada de heteropolímeros lineales y ramificados de 6 carbonos (Xilosas, pentosas y ácidos glucorónicos) unidas por enlaces β -1,4, y en ocasiones por enlaces β -1,3. Este material es el más fácil de hidrolizar que la celulosa; al ser una estructura no cristalina (**Prasad & Ankit, 2015**). Además, como resultado de la degradación libera compuestos del grupo de hexosas y pentosas (**Granda, 2011**).

La lignina presente en la pared celular vegetal se encuentra formando una barrera que cubre a la hemicelulosa y celulosa. De forma que impide el acceso de la enzima a la estructura celulósica para su degradación (**Li et al., 2014**). La lignina, polimérica tridimensional, está compuesta de tres unidades monoméricas precursoras de

fenilpropano diferentes, siendo un compuesto no biodegradable (Prasad & Ankit, 2015).

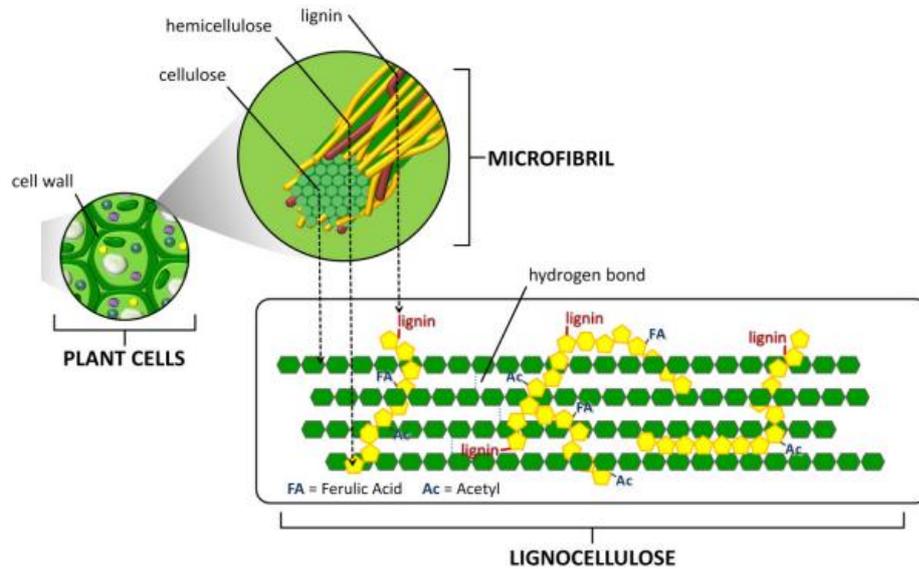


Figura 1: Estructura del material lignocelulósico en la que se señala a la celulosa de color verde, hemicelulosa de color amarillo y a la lignina en enlaces. Figura adaptada de Ribeiro, et al., (2016)

La composición lignocelulósica varía según la fuente y el tipo de residuo, como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Composición química de los diferentes residuos agroindustriales

Residuos	% Celulosa	% Hemicelulosa	% Lignina	Referencia
Cáscara de cacao	35,4	37	14,7	(Daud et al., 2013)
Rastrojos de Maíz (tallos, hojas)	37,69	ND	18,59	(Carroll & Somerville, 2008)
Bagazo de caña	40-50	20-30	18-25	(Andrade & Colodette, 2014)
Salvado de arroz	19,74	ND	6,27	(Vargas et al., 2013)

ND: No determinada

Debido a la estructura robusta que constituye el material lignocelulósico es necesario un pretratamiento para alterar su estructura y composición química del material lignocelulósico (Sukumaran et al., 2005). Este pretratamiento puede ser de tipo mecánico, físico, químico o biológico; su aplicabilidad dependerá de sus características y como actúe frente a una hidrólisis enzimática (Bansal et al., 2009).

Un pretratamiento efectivo debe reducir la cristalinidad de la celulosa y grado de polimerización (Yang et al., 2011).

1.2 Importancia de enzimas en la degradación de material lignocelulósico

La aplicación de enzimas ha cobrado importancia en la actualidad, pues una de estas es la utilización permite la biodegradación más rápida de celulosa presente en el material lignocelulósico. En contraste, el tiempo de vida estimada para la degradación de celulosa (ruptura de enlaces glucosídicos β -1,4) de forma natural es alrededor de 5 a 8 millones de años (Kristensen et al., 2009). Esto justifica el uso de enzimas para la degradación de material lignocelulósico mediante el uso de enzimas.

Por otra parte, la producción de enzimas celulasas a más de ser utilizada para la conversión del material lignocelulósico, también tiene aplicabilidad en otras áreas industriales importantes (Singhania et al., 2013 y Bhat, 2000), como se detalla a continuación en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Aplicaciones de las enzimas en diferentes áreas industriales

Área Industrial	Aplicaciones de las Enzimas “Celulasas”
<ul style="list-style-type: none"> • Textil 	Utilizadas para el ablandamiento del algodón (Zhang & Zhang, 2013)
<ul style="list-style-type: none"> • Alimentos 	Clarificación de jugos de frutas (Singhania et al., 2013)
<ul style="list-style-type: none"> • Balanceado 	Mejora el valor alimenticio y el rendimiento de los animales (Ovando & Waliszewski, 2005)
<ul style="list-style-type: none"> • Detergentes 	Suaviza y reduce mayormente las partículas de suciedad impregnada en la prenda (Singhania et al., 2013)
<ul style="list-style-type: none"> • Papel 	Blanqueamiento de la pulpa de papel (Bhat, 2000)

1.3 Enzimas con actividad celulósica

La hidrólisis enzimática de la celulosa involucra la participación de enzimas celulasas también denominadas como glicosil hidrolasas, las cuales se clasifican según su actividad, como se detallan a continuación:

- Endoglucanasas que hidrolizan los enlaces 1,4- β glucosídicos, en forma aleatoria en el interior de la cadena (**Kristensen et al., 2009**).
- Celobiohidrolasas o exoglucanasas que actúan de manera procesiva desde los extremos de las cadenas de celulosa hidrolizando los enlaces 1,4 β -glucosídicos, liberando celobiosa como producto final (**Divne et al., 2008**)
- β -glucosidasas que catalizan la hidrólisis de la celobiosa, liberando β -D-glucosa (**Marin, 2007**).

Las enzimas celulasas se obtienen a partir de hongos y bacterias, microorganismos que han sido estudiados y utilizados para degradar celulosa proveniente de residuos celulolíticos (**Zelena, et al., 2014**).

La celobiohidrolasas (CBH) poseen un sitio activo típico en forma de túnel (**Poidevin et al., 2013**) y actúa en los extremos reductores (CBHI/ Cel7A) y no reductores (CBHII/ Cel6A) de la cadena de celulosa. Estas se han obtenido a partir del hongo *Trichoderma reesie* del cual se ha estudiado extensamente sus enzimas con actividad celulósica (**Zhang & Lynd, 2004**). Pero también se pueden obtener a partir de una especie bacteriana, *Paenibacillus Barcinonensis*, el cual posee una elevada actividad xilanolítica y celulolítica que ha sido aislada de suelos arrozales del delta del Ebro (**Blanco et al., 1993; Sánchez et al., 2003**). Estas enzimas producidas por este microorganismo generan una mayor expresión proteica a tiempos cortos y económicos a nivel industrial (**Cerda, 2016**).

1.4 Antecedentes investigativos

La degradación enzimática de los residuos agroindustriales para la generación de nuevos productos se ha convertido en un tema de investigación relevante a nivel internacional. A continuación, se detallan algunos estudios:

Vargas & Pérez (2018), resalta que el aprovechamiento de los residuos agroindustriales es una alternativa que promueve el desarrollo de tecnologías, encaminadas hacia una transformación sostenible de los recursos naturales, tales como, tecnologías de la ingeniería enzimática y genética. Ya que facilita la producción de enzimas a gran escala y fines comerciales (**Headon & Walsh, 1994**). Pero sugiere que, antes de llevar a cabo dicho proceso, los residuos celulósicos deben ser expuestos a un pretratamiento para alterar la estructura de la biomasa lignocelulósica. De este modo disminuir el contenido de lignina, reducir la cristalinidad de celulosa y a su vez incrementar la porosidad del residuo. Se conoce que el contenido de lignina presente en la pared celular de la planta, tiende a formar barreras que impide la acción de enzimas (**Krishna, et al., 2001**).

Vega (2016) ha obtenido azúcares fermentables a partir de la hidrólisis del bagazo de caña de maíz y aserrín de laurel, usando celulasas producidas por hongos celulolíticos. Estos sustratos son sometidos a un pretratamiento físico (molienda) por ser un tratamiento económico y de bajo impacto ambiental.

Jeya, et al., (2009) obtuvieron azúcares reductores a partir de la hidrólisis de residuos de arroz de *Trametes hirsuta* con un rendimiento del 70% luego de 48 h de hidrólisis. Para lo cual, los residuos de arroz han sido pretratados químicamente con hidróxido de sodio al 2% a 85% durante una hora. Por filtración se recupera el residuo sólido, se lava con agua destilada hasta obtener un pH neutro y se seca a 70°C.

La producción de enzimas obtenidas a partir de hongos y bacterias, se puede lograr también mediante la aplicación de la tecnología del ADN recombinante. Esta tecnología permite obtener mayor cantidad de enzimas y la introducción de modificaciones para la obtención de nuevas características. Así lo reporta la investigación realizado por **Schwarz et al., (1986)**, en donde clonaron genes de celulasa de *Clostridium thermocellum* en la bacteria *E.coli*. De donde, la enzima

expresada y purificada presentó actividad enzimática sobre los compuestos beta glucano y liqueno. Igualmente, se han clonado genes de enzimas celulasas de la bacteria *Pectobacterium carotovorum*, en *E. coli DH5α*; la cual demostró degradación del sustrato sintético CMC (carboxi metil celulosa) (**Ibrahim et al., 2013**). Esta producción de enzimas recombinadas ha resultado un proceso eficiente, rápido y rentable a nivel industrial. Ya que de esta manera se obtiene grandes cantidades de producto (enzimas) y sobre todo altamente reproducible (**González & Fillat, 2018**).

Maki, Leung & Qin, (2009) han aislado celulasas de cepas bacterianas (*Paenibacillus* y *Bacillus*) con actividad en celulosa soluble y cristalina. Estas enzimas pueden clonarse y producirse más fácilmente a través de la recombinación en un huésped bacteriano de rápido crecimiento como *E.coli*.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 General

Producir la enzima recombinante Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis* para la degradación de residuos agroindustriales

1.5.2 Específicos

- Seleccionar y transformar diferentes células con el plásmido que contienen el gen para la expresión de la enzima recombinante.
- Analizar la sobre expresión de la enzima recombinada Cel6D a escala de laboratorio
- Evaluar la efectividad enzimática de Cel6D con el sustrato específico sintético PASC
- Determinar la actividad enzimática de Cel6D en residuos lignocelulósicos-agroindustriales

1.6 HIPÓTESIS

1.6.1 Hipótesis nula

Ho: La enzima recombinante Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis* obtenida no tiene la capacidad de degradar sustratos celulósicos provenientes de residuos agroindustriales.

1.6.2 Hipótesis alternativa

Hi: La enzima recombinante Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis* obtenida tiene la capacidad de degradar sustratos celulósicos provenientes de residuos agroindustriales.

1.7 Señalamiento de variables de la hipótesis

1.7.1 Variable independiente

Enzima recombinante Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis*

1.7.2 Variable dependiente

Residuos lignocelulósicos, cáscara de cacao, rastrojo de maíz, bagazo de caña y salvado de arroz.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Microorganismos y plásmido utilizado

Las cepas utilizadas en el proyecto de investigación fueron *Escherichia coli* (*E.coli*) *Bl21 (DE3)* y *E. coli* TFH2, las cuales han sido creadas en condiciones de laboratorio para la producción de proteínas recombinantes (Jeong, Kim, & Lee, 2015). La cepa *Bl21 (DE3)*, y el plásmido pET28aCel6D que se produce en el microorganismo *Paenibacillus barcinonensis*, fue proporcionado por la Dra. Cerda de la Universidad de Barcelona/Universidad Técnica de Ambato. El plásmido fue seleccionado porque tiene una gran efectividad en la degradación de celulosa vegetal (Cerda, 2016). Por otro lado, la cepa *E. coli* TFH2 fue proporcionado por el Dr. Terán de la Universidad Técnica de Ambato. Las dos cepas se conservaron a -80°C y el plásmido se conservó a -20°C.

2.2 Extracción de ADN plasmídico

Para la manutención y duplicación del plásmido que contiene el gen de expresión para la enzima recombinante Cel6D se transformaron células competentes de *E. coli* DH α 5. Posteriormente se extrajo el ADN plasmídico utilizando S.N.A.P. Miniprep (Invitrogen), para lo cual se siguió el protocolo del kit comercial. Se comprobó la pureza y concentración del plásmido extraído por medio de NanoDrop 2000 (ThermoScientific)

2.3 Preparación de medio de cultivo y antibiótico

2.3.1 Medio de cultivo

Para el crecimiento de las diferentes células bacterianas en medio líquido y sólido se utilizó medio de cultivo LB (Luria Bertani) (Green & Sambrook, 2012). La composición del medio líquido es 10 gr/L de bacto triptona, 5 gr/L de extracto de levadura y 5 gr/L de NaCl y además 15 gr/L de agar para medio sólido, los cuales se suspendieron con agua destilada.

El material de vidrio y medios de cultivos utilizados durante el trabajo de investigación, fueron esterilizados por calor húmedo en autoclave (Hirayma/HV-110) por 15 minutos a 121°C.

2.3.2 Antibióticos e inductor

Los antibióticos e inductor que se detalla en la **Tabla 3**, fueron preparados acorde a lo establecido por (**Green & Sambrook, 2012**), los cuales se almacenaron a -20°C .

Tabla 3: Antibióticos e inductor con su respectiva concentración utilizada.

Antibióticos e inductor	Solución inicial	Concentración final en el medio de cultivo
Cloranfenicol (Cho^+)	20 mg/mL en etanol	20 $\mu\text{g/mL}$
Kanamicina (Kan^+)	50 mg/mL en agua bidestilada	50 $\mu\text{g/mL}$
IPTG (isopropil- β -tiogalactopiranosido)	1 M en agua bidestilada	1 mM

2.4 Transformación de células competentes con plásmido de interés

2.4.1 Inoculación y cultivo de microorganismos

Se reactivaron las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* TFH2 en medio LB sólido y líquido. En medio sólido, se realizó placas de LB (20 mL) con 20 μL de antibiótico (Cho^+) y 300 μL de cada cepa respectiva y se incubó a 37°C por 24 h. En medio líquido (primer overnight) para cada cepa; se inoculó 200 μL de células en 2 mL de LB con 2 μL de antibiótico y se incubó a 37°C por 24 h con agitación a 200 rpm (Incubador Benchmark)

2.4.2 Preparación de las células competentes

Se utilizó el cultivo nocturno (primer overnight) y se agregó 10 mL de medio LB líquido con la cantidad requerida de antibióticos y se dejó en la incubadora a 37°C por una hora a 200 rpm. Se utilizó 2 mL del overnight para hacer células competentes y el resto se mezcló con 35% de glicerol y se guardó en alícuotas de 200 μL de cultivo en tubos eppendorf a -80°C .

Para la preparación de células competentes se utilizó el método CaCl_2 (**Cohen, et al., 1972**). Para lo cual, se realizó un overnight que contenía 20 mL de medio LB, 20 μL de antibiótico con 2 mL del cultivo nocturno y se incubó a 37°C a 200 rpm hasta cuando el cultivo se encuentre en una fase exponencial temprana de crecimiento (DO_{600} 0,3 – 0,4). A continuación, se reposó en hielo por 20 min y se centrifugó a 3000 rpm por 5 min, transcurrido ese tiempo se descartó el sobrenadante y en el pellet

se agregó 1 mL de CaCl_2 50 mM, luego se reposó en hielo por una hora. Nuevamente se centrifugó por 15 min a 3000 rpm, se descartó el sobrenadante, se agregó 1 mL de CaCl_2 50 mM 15% de glicerol y se removió en frío con mucho cuidado. Finalmente se realizó alícuotas de 100 μL y se guardó a 37°C .

2.4.3 Transformación de células

Para transformar las células se mezcló una alícuota de 100 μL de células competentes con 2 μL del DNA plasmídico con el gen de interés y se mantuvo en hielo por 1 minuto. Luego se sometió las células a un choque térmico a 42°C por 45 segundos en baño termostático, se colocó en hielo, se añadió 1 mL de medio LB y se incubó a 37°C por una hora a 200 rpm. Seguidamente se realizó un overnight de 20 ml de LB con su respectivo antibiótico y 400 μL de células transformadas, posterior a ello se incubó a 37°C durante toda la noche junto con una siembra en placa de LB con los 200 μL de células restantes transformadas. Transcurrido el tiempo descrito; en el cultivo nocturno líquido se añadió 30% de glicerol y se guardó en alícuotas de 200 μL en tubos eppendorf a -80°C y las placas sembradas a -20°C .

2.5 Producción de enzima

2.5.1 Preparación del inóculo

Se descongeló un eppendorf de 200 μL de células transformadas en hielo y se agregó a un frasco estéril de 50 mL con 20 mL de medio LB y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Kan^+ y Cho^+ respectivo. El pre inóculo se incubó a 37°C por 16:30 h con agitación de 200 rpm.

2.5.2 Cultivo en matraz

El pre inóculo (2.5.1) se escaló a un matraz de 500 mL con 200 ml de medio LB con los antibióticos correspondientes y se incubó hasta llegar a una fase exponencial (DO_{600} 0,6 – 0,8). Esta densidad corresponde al crecimiento exponencial de las células, el cual fue el instante clave para inducir la sobreexpresión de la proteína. Una vez determinada la fase exponencial se indujo la expresión del gen de interés y producción de la proteína recombinante con IPTG 1 mM y se incubó a 18 horas. Posteriormente, se colectó las células por centrifugación a 3000 rpm durante 20 min a una temperatura de 4°C , se añadió 5 mL de buffer Tris 20 mM pH 7 y se guardó a -80°C .

2.5.3 Obtención de los extractos celulares (proteína de interés)

Para la ruptura de células se utilizó un sonicador Ultrasonic cell crusher, por tres ciclos durante 9 min con pausas de 10 s. Se centrifugó a 14900 rpm por 15 min a 4 °C y se guardó el sobrenadante a -20°C en alícuotas de 1,5 mL en tubos eppendorf

2.6 Análisis de expresión de proteína recombinante Cel6D

Para el análisis de la expresión de la proteína de interés se realizó electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE) (**Laemmli, 1970**). Esta técnica separa las proteínas según su peso molecular de manera que se comprobara si la expresión que se llevó a cabo es correcta. Para visualizar las bandas; en primer lugar, se tiñó con azul de Coomassie por 15 min, se removió y se añadió la solución destaining por 24 horas.

2.7 Determinación de la concentración aparente de proteína en el extracto celular

Para su respectiva determinación se utilizó el equipo NanoDrop 2000 (ThermoScientific). Para ello se requirió de los parámetros específicos de la enzima, peso molecular (84kDa) y coeficiente de extinción molar (139437). Estos valores se obtuvieron a través de la secuencia de aminoácidos de la enzima, analizados en el programa *ProtParam ExPASy*.

2.8 Preparación de sustrato específico sintético y residuos lignocelulósicos

2.8.1 Sustrato específico sintético PASC

Para la obtención de la celulosa hinchada (PASC) se siguió el protocolo descrito por (**T. M. Wood, 1988**), el cual se basa en tratar a la celulosa cristalina con ácido fosfórico al 70%. Para ello se resuspendió 1 gr de avicel en 100 mL de ácido fosfórico y se incubó a 60°C por 4 horas. Transcurrido este tiempo se añadió 1 litro de agua destilada fría y se reposó a 4°C por 24 horas para sedimentar por completo el Avicel. Se eliminó el sobrenadante usando el equipo de separación Burner. Seguidamente se realizó varios lavados por medio de filtración con agua destilada fría, hasta obtener un pH neutro del Avicel. Una vez alcanzado el pH 7 se resuspendió en 20 mL de agua bidestilada y se guardó en un tubo falcón Corning a 4°C.

2.8.2 Residuos lignocelulósicos

Los residuos agroindustriales seleccionados para este proyecto fueron: salvado de arroz, cáscara de cacao; bagazo de caña y rastrojo de maíz. Los cuales, se obtuvieron de Santo Domingo, Baños (Sector Totoras Km 5 1/2) y Latacunga respectivamente. A cada residuo se sometió a un pretratamiento mecánico y se esterilizó en un autoclave (Hirayma/HV-110) por dos horas a 121°C. Luego, se tamizó para una reducción de tamaño de partícula, utilizando tamiz de malla número 50 (0,30 mm) y 100 (0,15 mm) (Humboldt).

2.9 Determinación de la actividad enzimática en sustrato específico y residuos lignocelulósicos

En tres tubos eppendorf con 10 mg de residuo lignocelulósico y en un tubo eppendorf 25 µL de sustrato específico (PASC), se añadió 50 µL de buffer acetato 50 mM pH 4 y 100 µL de enzima. Luego se incubó a 25°C con 150 rpm a tiempo de 30, 120 y 240 min respectivamente, terminado el tiempo de reacción enzimática se colocó en hielo para que la enzima retenga su proceso de degradación. El proceso se realizó para cada uno de los residuos. A continuación, se evaluó la concentración de glucosa producida por la enzima celulasa a partir de los sustratos celulósicos por el método de DNS (Miller, 1959) de la siguiente manera: en cada tubo eppendorf se añadió 100 µL de la solución de DNS y se puso en una plancha de calentamiento (Labnet) para inactivar a la enzima a 99,5°C por 5 min. Posteriormente las muestras se enfriaron por 5 min para retener la reacción y luego se añadió 150 µL de agua miliQ y se centrifugó a 13000 rpm a 4°C por 5 min (centrifuga eppendorf Hettich). Finalmente se tomó 200 µL de sobrenadante y se dispuso en una placa multipocillo (96 pozos) para proceder a la lectura a 540 nm en el espectrofotómetro para microplacas (Thermo Scientific Multiskan). Para su determinación respectiva de concentración de glucosa en cada una de las muestras celulósicas, se utilizó glucosa como estándar. Para lo cual se preparó soluciones de 1 a 10 mg por mL de agua destilada. Luego se aplicó el mismo método de DNS de las muestras.

La actividad enzimática específica se expresó en U/mg proteína, equivalente a la cantidad de enzima (Unidades) requerida para liberar 1 mg/mL de glucosa de muestra evaluada (sustrato específico- residuo lignocelulósico).

2.10 Identificación de los productos de reacción mediante cromatografía de capa fina.

Para identificar los productos generados por la hidrólisis enzimática de la celulasa sobre los diferentes residuos lignocelulósicos se utilizó la cromatografía de capa fina (TLC) de alta resolución. Para lo cual se realizó la reacción enzimática (10 mg de sustrato y 100 μ L de enzima) incubados a 120 y 240 min. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 min a 4°C y se guardó el sobrenadante a -20°C para su posterior análisis.

2.11 Diseño experimental y Análisis estadístico

Se aplicó un diseño factorial AxBxC con dos réplicas, valorando los diferentes tipos de residuos agroindustriales, Tipo de muestra y tiempo de incubación (**Tabla 4**). Los datos fueron analizados en el programa estadístico STATGRAPHICS utilizando un ANOVA multifactorial con un 95% de confianza.

Tabla 4: Factores y niveles del diseño experimental

Factores	Niveles	
Factor A: Tipos de residuos agroindustriales	a0	Cáscara de Cacao
	a1	Rastrojo de maíz
	a2	Bagazo de Caña
	a3	Salvado de Arroz
Factor B: Tamaño de partícula (mm)	b0	0,15
	b1	0,30
Factor C: Tiempo de incubación (min)	c0	30
	c1	120
	c2	240

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de los datos

3.1.1 Expresión de la proteína Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis* en la bacteria (*E.coli*)

Para evidenciar si las bacterias *E.coli* BL21 (DE3) y *E.coli* BL21 (TFH2) transformadas con el plásmido pET28aCel6D expreso la proteína de interés Cel6D después de la inducción (1mM IPTG, 25 °C, 18 h en agitación a 200 rpm), el extracto soluble, se analizó por electroforesis de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (**Figura 2**). Se observó que, en el carril A correspondiente a la cepa recombinante *E.coli* (TFH2)/pET28aCel6D hubo expresión de proteína (banda de alta intensidad), en comparación al carril B de la cepa recombinante *E.coli* (DE3)/pET28aCel6D que no mostro expresión. Se presume que la no expresión de la proteína pudo ser afectada por una de las condiciones de inducción, o a su vez por las condiciones del laboratorio. (**Papaneophytou & Kontopidis, 2014**), ya que, con respecto a otros estudios reportados en bibliografía señalan que han obtenido expresión de la proteína Cel6D al emplear una concentración de inducción de 0,5 mM IPTG por 18 h a 16 °C (**Cerda, 2016**). Dado que, la utilización de una baja concentración de inductor ayuda a que la proteína se exprese de manera soluble, y el al emplear una mayor concentración del inductor puede reducir la solubilidad de la proteína **Hayat et al., (2018)**

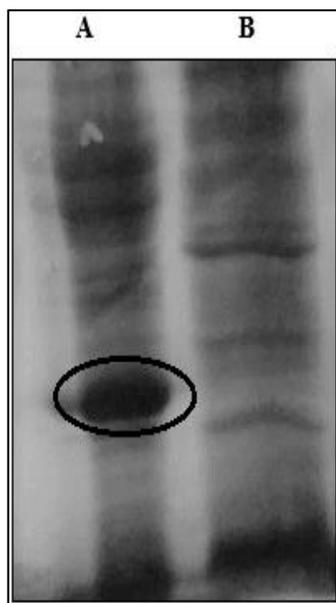


Figura 2: Extractos de la fracción soluble: (A) *E. coli* (TFH2) /pET28aCel6D y (B) *E. coli* BL21 (DE3) / pET28aCel6D, electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

3.1.2 Cuantificación de Azúcares reductores

Para valorar la hidrólisis de los residuos lignocelulosicos se empleó el metodo de DNS establecido por **Miller (1959)**. Este método ha sido seleccionado por ser eficiente y preciso en la determinación de azúcares reductores de la hidrólisis de biomasa (**Wood et al., 2012**). Como resultado de la hidrólisis se observó que existe mayor liberación de azucares en los sustratos de menor tamaño de partícula (0,15 mm) en relación a los sustratos de mayor tamaño de partícula (0, 30 mm); aunque su diferencia es mínima, tal como se observa en la **Tabla 5**. Esto se debe a que, los sustratos al ser sometidos a un proceso de molienda permiten aumentar el área de superficie para la accesibilidad de la enzima al sustrato, por ende, al reducir el tamaño de las partículas aumenta el área de superficie específica y con ello aumenta la liberación de azúcares durante la degradación lignocelulosica (**Lopez et al., 2013**). Sin embargo, en el residuo de salvado de arroz no se detectó liberación de glucosa, esto pudo deberse a su alto contenido de lignina presente en su estructura, lo cual, es un obstáculo para que la celulasa actúe sobre el salvado de arroz y pueda ser degradada (**Li et al., 2014**).

Tabla 5. Valores obtenidos de la cuantificación de azúcares reductores (mg/mL)

Tiempo de incubación (min)	Residuo lignocelulósico	Tamaño de partícula (mm)	
		0,15	0,30
30	Cáscara de cacao	4,5360	4,1850
	Rastrojo de maíz	3,2820	2,6341
	Bagazo de caña	8,2660	5,1880
	Salvado de arroz	N.D.	
120	Cáscara de cacao	4,2918	3,4440
	Rastrojo de maíz	2,2464	2,1222
	Bagazo de caña	3,8258	2,4966
	Salvado de arroz	N.D.	
240	Cáscara de cacao	1,9332	1,3564
	Rastrojo de maíz	2,0172	1,7613
	Bagazo de caña	2,3724	1,5474
	Salvado de arroz	N.D.	

N.D. No detectada

3.1.3 Actividad específica aparente sobre el sustrato específico (PASC) y residuos agroindustriales

La actividad específica aparente de la celulasa determinada a partir de la cuantificación de los azúcares reductores (**Tabla 6**), mostró actividad a los 30 min de incubación sobre el PASC, con un valor de 0,0001 U/mg. Este resultado es bajo en comparación a lo reportado por **Cerda (2016)** pues, en el estudio que ha realizado sobre enzimas modificadoras de la pared celular indica que, la actividad enzimática Cel6D sobre el PASC es de 0,66 U/mg proteína; esta discrepancia posiblemente se deba a varios factores como temperatura o pH. Debido que, la degradación del sustrato PASC se ha realizado a 47°C, mientras que, en el presente estudio se realizó los ensayos a 25 °C, la cual es una temperatura en donde la celulasa es estable durante 3 horas; a 45 °C la enzima mantiene el 57% de la actividad y a 55 °C la enzima tiende a ser inestable

(Figura 3). Por otra parte, la enzima celulasa mostró actividad sobre cada uno de los residuos a excepción en el salvado de arroz.

Tabla 6 Actividad específica aparente U/mg

Tiempo de incubación (min)	Sustratos	U/mg proteína
	PASC *	0,66
30	PASC	0,0001
	Cáscara de cacao	0,0016
	Rastrojo de maíz	0,0011
	Bagazo de caña	0,0028
	Salvado de arroz	N.D.
120	Cáscara de cacao	0,00037
	Rastrojo de maíz	0,00019
	Bagazo de caña	0,00033
	Salvado de arroz	N.D.
240	Cáscara de cacao	0,00006
	Rastrojo de maíz	0,00009
	Bagazo de caña	0,00010
	Salvado de arroz	N.D.

* = Actividad específica reportada bibliográficamente
N.D. No detectada

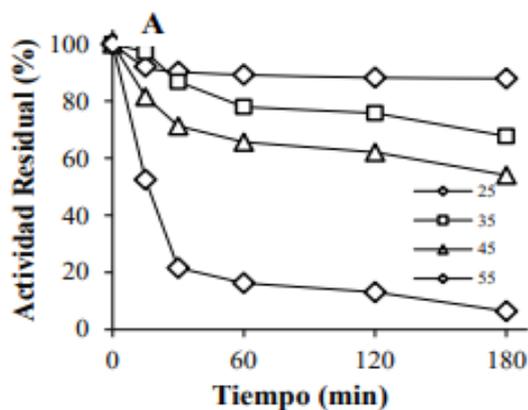


Figura 3: Estabilidad de celulasa (Cel6D) sobre PASC en relación a la temperatura. Figura adaptada de Cerda (2016).

En la **Tabla 7** se muestra el análisis de varianza (ANOVA) de la actividad específica aparente (U/mg proteína). Se establece que, el Factor A (Tipo de residuos lignocelulósicos), Factor B (Tiempo de incubación) y las interacciones AxB tienen un efecto estadísticamente significativo sobre U/ mg proteína con un 95,0% de nivel de confianza, y no existe diferencia significativa en el Factor B (Tamaño de partícula), ya que, la diferencia de actividad entre si es mínima. No obstante, para mejores resultados de actividad específica se puede trabajar con los sustratos de menor tamaño de partícula.

Tabla 7: Análisis de Varianza para la actividad específica aparente de Cel6D sobre diferentes residuos lignocelulósicos (U/ mg proteína).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tipo de residuo lignocelulósico	0,00000204667	2	0,00000102333	8,94	0,0020
B: Tiempo de incubación (min)	0,000011655	2	0,0000058275	50,92	0,0000
C: Tamaño de partícula	1,87778E-7	1	1,87778E-7	1,64	0,2165
INTERACCIONES					
AB	0,00000169833	4	4,24583E-7	3,71	0,0226
AC	5,55556E-8	2	2,77778E-8	0,24	0,7870
BC	3,77222E-7	2	1,88611E-7	1,65	0,2202
ABC	1,99444E-7	4	4,98611E-8	0,44	0,7811
RESIDUOS	0,00000206	18	1,14444E-7		
TOTAL (CORREGIDO)	0,00001828	35			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

En el test de rango múltiple (**Figura 4**) para el efecto principal, Factor A, correspondiente a los tipos de residuos muestra que hay diferencias estadísticamente significativas entre el Bagazo de caña con respecto a la cáscara de cacao y Rastrojo de maíz, con un nivel de confianza del 95%. Pero no hay diferencia significativa entre la cáscara de cacao y rastrojo de maíz. Como resultado de esta evaluación, el bagazo de caña muestra mayor valor de la media de actividad específica; seguido está la cáscara de cacao y rastrojo de maíz. Esta diferencia puede deberse a la composición lignocelulósica que se encuentra en su estructura (**Tabla 1**). En el salvado de arroz la enzima recombinante no muestra actividad enzimática, por tanto, el valor de la media

fue inferior a 1. Para su degradación se requiere de una enzima xilanasa o de la combinación de enzimas en su reacción (Straw et al., 2019).

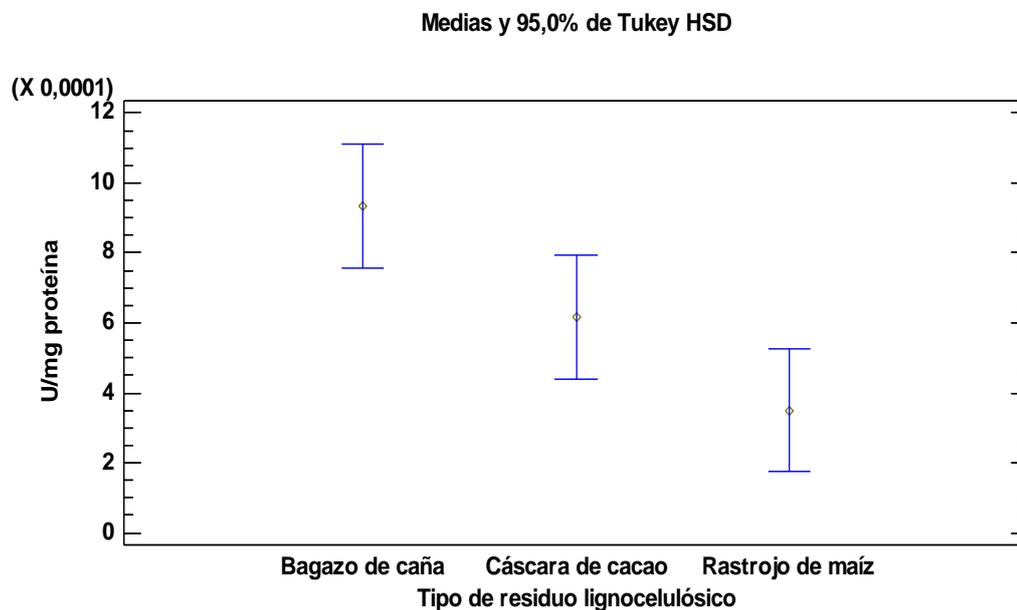


Figura 4 Prueba de Tuckey al 95% de confianza para los diferentes sustratos celulósicos: Bagazo de caña; Residuos cáscara de cacao y Rastrojo de Maíz

Además, en la **Figura 5** se evalúa el efecto de las interacciones AXB (Tipo de residuo-Tiempo de incubación) sobre la actividad enzimática, donde el mayor efecto de la interacción se da con el residuo del bagazo de caña y el tiempo de incubación de 30 min, con un valor de 0,0028 U/ mg proteína. Al mismo tiempo, está la cáscara de cacao y rastrojo de maíz con una actividad de 0,0016 y 0,0011 U/mg respectivamente. Entre los tiempos de incubación de 120 y 240 min la actividad enzimática sobre los diferentes residuos lignocelulósicos presenta un comportamiento similar, es decir que no existe diferencias entre el 120 y 240 min.

Gráfico de Interacciones

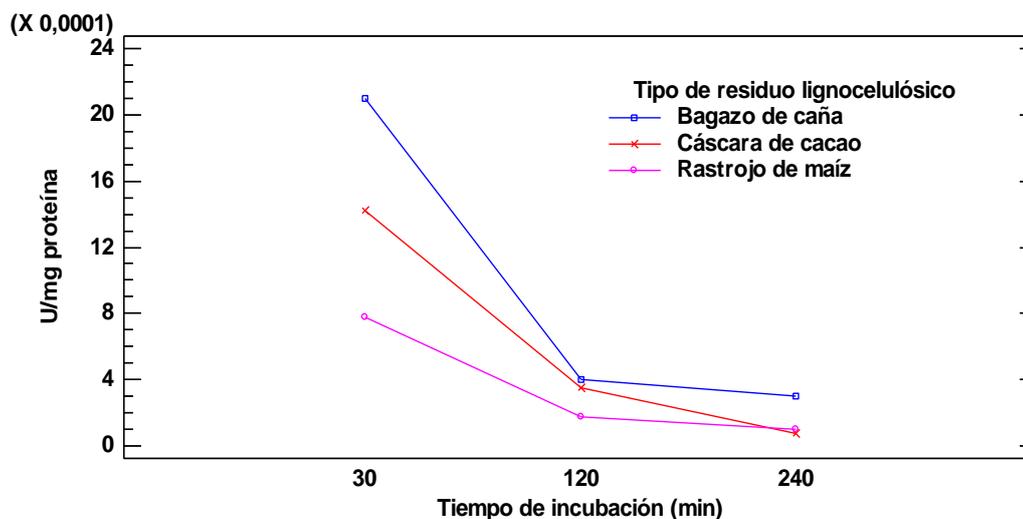


Figura 5: Actividad específica obtenida de los diferentes residuos lignocelulósicos: Bagazo de caña); Residuos cáscara de cacao; Rastrojo de Maíz y Salvado de arroz; en función de los tiempos de incubación: 30, 120 y 240 min respectivamente

La disminución de la actividad específica al transcurrir el tiempo de incubación de 30 min a los 120 y 240 min puede deberse a que, luego de alcanzar su máxima actividad inicialmente, la velocidad de reacción disminuye rápidamente a medida que aumenta la conversión de la celulosa (celobiosa) (Eriksson et al., 2002). Lo cual, conlleva a la producción de una inhibición por producto final en la hidrólisis enzimática. Kristensen, et al., (2009) reporta que, ha obtenido una tendencia lineal decreciente de conversión enzimática (glucosa, celobiosa) por la concentración de producto final. Los mismos que han sido generados a elevadas concentraciones de sustrato celulósico en la hidrólisis lignocelulósica respectiva. Por otro lado, Belanche & Pérez (1994) manifiesta que, al actuar la enzima celobiohidrolasa de modo individual en el proceso de la degradación celulolítica, puede generar una inhibición competitiva, entre la unión de enzima y sustrato o enzima y producto. Para ello, la intervención de una enzima β glucosidasa en la hidrólisis enzimática evitaría una inhibición competitiva de la celobiohidrolasa (CBH) (Singhania et al., 2013).

3.1.4 Análisis de los productos de reacción mediante cromatografía de capa fina.

En la **Figura 6**, se observó los productos liberados durante la reacción enzimática mediante cromatografía de capa fina de alta resolución. Se cree que se obtuvo celobiosa en el bagazo de caña, rastrojo de maíz, y muy leve en la cáscara de cacao, ya que, (**Poidevin et al., 2013 y Divne et al., 2008**) indican que la celobiosa es el producto final de hidrolisis de la celobiohidrolasa que actúa sobre el extremo no reductor de la celulosa. Sin embargo, es posible que libere en la fase final de la hidrólisis, glucosa (**Divne et al., 2008**). En el salvado de arroz no se observa ningún producto, lo cual concuerda con la falta de liberación de azúcar reductor reportado anteriormente.

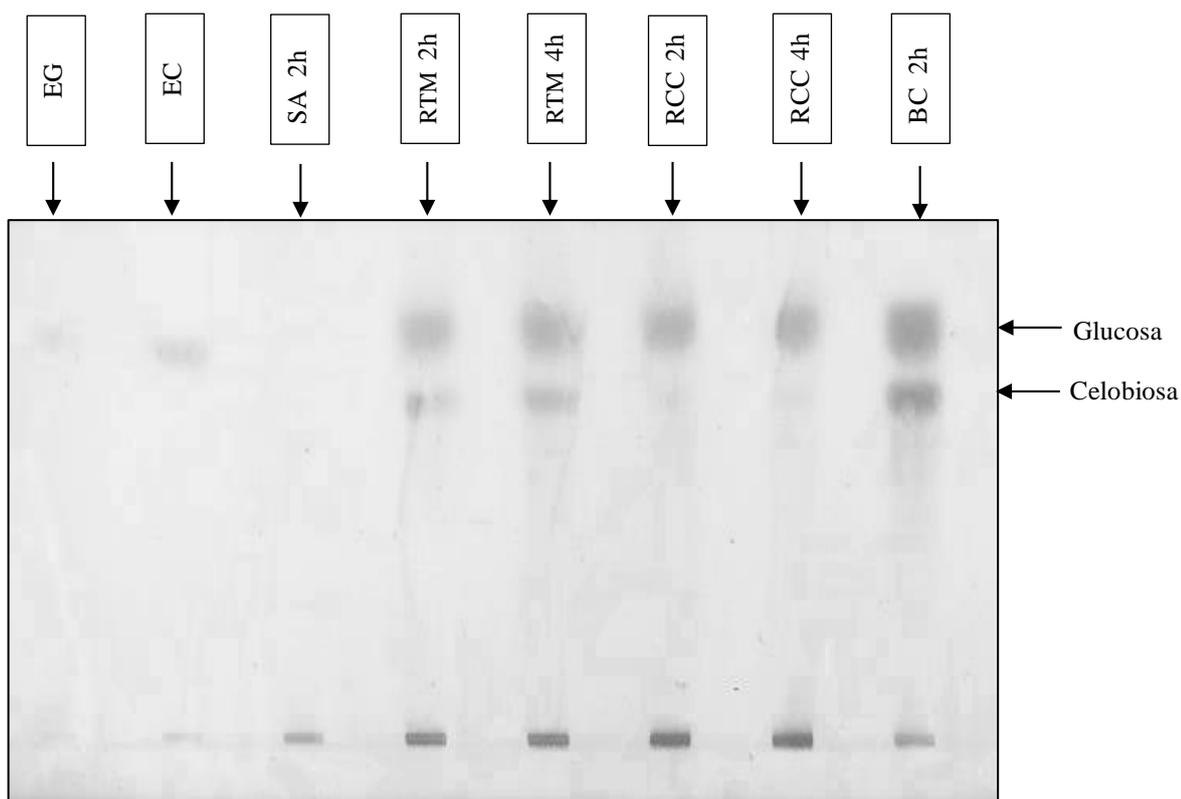


Figura 6 Análisis mediante cromatografía de capa fina de alta resolución de los productos generados de la degradación enzimática de sustratos celulósicos. Para cada sustrato (10 mg) se incubó con la enzima Cel6D (100 μ l) a 55°C. Las diferentes muestras, se tomaron a tiempos entre 2 y 4 horas: Salvado de arroz (SA), Rastrojo de Maíz (RTM), Residuo cáscara de Cacao (RCC) y Bagazo de Caña (BC). Estándar de azúcar: Glucosa (EG) y como muestra de Celobiosa (EC) se utilizó el hidrolizado del PASC

3.2 Verificación de la Hipótesis

Según los resultados obtenidos y analizados (ANOVA) con un nivel de confianza de 95%; se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. Dado que la enzima recombinante *E.coli* (TFH2)/pET28aCel6D de *Paenibacillus barcinonensis* obtenida si tiene la capacidad de degradar residuos lignocelulósicos, excepto el salvado de arroz. La mayor actividad específica se obtuvo en el bagazo de caña a 30 min de incubación.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- La enzima Cel6D de *Paenibacillus barcinonensis* producida de forma recombinante mostró potencial para la degradación de residuos agroindustriales ricos en material lignocelulósicos.
- Se determinó que la línea celular *E. coli* (TFH 2) fue efectiva para la expresión de la enzima pET28aCel6D de *Paenibacillus barcinonensis*
- Se analizó la expresión de la enzima recombinante *E. coli* (TFH2)/pET28aCel6D a escala de laboratorio, en la que se consideró el tiempo hasta alcanzar su densidad óptica, a 37°C por 4 horas, y tiempo de inducción de IPTG a 25°C por 18 horas.
- Se evaluó la efectividad enzimática de la celulasa sobre PASC, la cual muestra actividad específica aparente a los 30 min de incubación, con un valor de 0,0001 U/mg proteína, el cual, disminuye al transcurrir los 120 y 240 min de incubación.
- Se determinó la actividad específica aparente de la celulasa sobre los residuos lignocelulósicos, mostrando mayor actividad en residuos que contienen mayor porcentaje de celulosa en su composición lignocelulósica. Además, se observó que dicha actividad disminuye al transcurrir las dos horas de incubación, pues la conversión celulósica generada (celobiosa) empieza a actuar como un represor de la enzima.

4.2 RECOMENDACIONES

Se requiere trabajar con una enzima completamente purificada

Se requiere de una enzima xilanasas para degradar la lignina del salvado de arroz y con ello facilitar la unión entre enzima y sustrato.

Para evitar la inhibición por producto en la degradación lignocelulósica, se requiere de un complejo enzimático, ya sea de la intervención de una endoglucanasa o β -glucanasa (Sinergismo).

MATERIAL DE REFERENCIA

- Abdulla, H. M., & Shatoury, S. A. (2007). Actinomycetes in rice straw decomposition. *Waste Management*, 27(6), 850–853.
- Andrade, M., & Colodette, J. (2014). Dissolving pulp production from sugar cane bagasse. *Industrial Crops and Products*, 52, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.09.041>
- Bansal, P., Hall, M., Realf, M. J., Lee, J. H., & Bommarius, A. S. (2009). Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances*, 27(6), 833–848. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.005>
- Belanche, L., & Pérez, J. (1994). *Aprovechamiento de residuos de la industria de conservas vegetales. Hidrólisis enzimática.pdf*. Universidad de Zaragoza, 13–24.
- Carroll, A., & Somerville, C. (2008). Cellulosic Biofuels. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 165–182. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092125>
- Cerda, L. (2012). *Clonación y caracterización de la β -glucanasa LicA de Paenibacillus barcinonensis*, 4–10.
- Cerda, L. (2016). *Enzimas modificadoras de la pared celular vegetal. Celulasas de interés biotecnológico papelerero*. Universidad de Barcelona, 48–74.
- CIE. (2009). *Corporación para la investigación energética, Inventario de biomasa residual en las provincias de los Rios, El Oro y Pichincha, Quito*.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8).
- Daud, Z., Kassim, A., Aripin, A., Awang, H., & Hatta, M. (2013). Chemical composition and morphological of cocoa pod husks and cassava peels for pulp and paper production. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(9), 406–411.

- Diorio, L. A., Forchiassin, F., Papinutti, V. L., & Sueldo, D. V. (2003). Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (Fungi , Ascomycotina). *Revista Iberoamericana de Micología*, 20, 11–15.
- Divne, C., Ståhlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Knowles, J. K. C., Teeri, T. T., & Jones, T. A. (2008). The Three-Dimensional Crystal Structure of the Catalytic Core of Cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2884415>. *Advancement Of Science*, 265(5171), 524–528.
- Eriksson, T., Karlsson, J., & Tjerneld, F. (2002). A Model Explaining Declining Rate in Hydrolysis of Lignocellulose Substrates with Cellobiohydrolase I (Cel7A) and Endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*, 101, 41–60.
- Ezeji, T., Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (2007). Butanol production from agricultural residues : impact of Degradation products on clostridium beijerinckii growth and butanol Characterization of bacterial and archaeal communities in air-cathode microbial fuel cells, open circuit and sealed-off reactors. *Bioresource and Bioengineering*, 97(6), 1460–1469. <https://doi.org/10.1002/bit>
- González, A., & Fillat, M. (2018). Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*, 37(1), 14–27.
- Granda, M. (2011). Determinación de azúcares, productos de fermentación e inhibidores de fermentación por HPLC en un proceso de obtención de etanol lignocelulósico., 136.
- Green, M., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning, a laboratory manual* (Vol. 1,2,3).
- Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2014). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>
- Hayat, S. M. G., Farahani, N., Golichenari, B., & Sahebkar, A. H. (2018).

- Recombinant Protein Expression in Escherichia coli (E.coli): What We Need to Know. *Current Pharmaceutical Design*, 24(February), 2-11.
- Headon, D. R., & Walsh, G. (1994). Special Issue Biotechnology and Industry: Present and Future The industrial production of enzymes. *Biotechnology Advances*, 12(4), 635–646.
- Ibrahim, E., Jones, K., Hossey, E., & Escudero, J. (2013). Molecular Cloning and Expression of Cellulase and Polygalacturonase Genes in E. coli as a Promising Application for Biofuel Production. *J Phylogenetics. Evol Biol*, 4:147.
- Jeong, H., Kim, J., & Lee, J. (2015). Complete Genome Sequence of Escherichia coli Strain BL21. *Genome Anno*, 3(2), 2015.
- Jeya, M., Zhang, Y., & Lee, J. (2009). Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM. *Bioresourse Technology*.
- Jiménez, M. (2012). *Determinación de la actividad celulolítica, ligninolítica y aminolítica de actinobacterias aisladas de suelo rizosférico de trébol blanco (Trifolium Repens)*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Krishna, S. ., Reddy, J., & Chowdary, G. (2001). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresourse Technology*, 77, 193±196.
- Kristensen, J. B., Felby, C., & Jørgensen, H. (2009). Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 2, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-11>
- Li, Q., Song, J., Peng, S., Wang, J. P., Qu, G. Z., Sederoff, R. R., & Chiang, V. L. (2014). Plant biotechnology for lignocellulosic biofuel production. *Plant Biotechnology Journal*, 12(9), 1174–1192. <https://doi.org/10.1111/pbi.12273>
- Longoria, A., Guadarrama, L., Gosset, G., & Martínez, A. (2003). Producción de etanol a partir de la fracción celulósica del rastrojo de maíz blanco, 154298.
- MAGAP. (2013). *Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca del Ecuador. Estadísticas de las importaciones de abonos fertilizantes al Ecuador*.

- Marin, R. (2007). *Caracterización y Expresión Recombinante de una celulasa de origen antártico. Genome*. Universidad de Chile.
- Michelin, M., Polizeli, M., Ruzene, D., Silva, D., & Teixeira, J. (2013). Application of lignocellulosic residues in the production of cellulases and hemicellulases from fungi.
- Ovando, S. L., & Waliszewski, K. N. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad Y Ciencia*, 21(42), 111–120.
- Papaneophytou, C. P., & Kontopidis, G. (2014). Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. *Protein Expression and Purification*, 94, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.10.016>
- Piñeros, Y. (2016). *Aprovechamiento de biomasa lignocelulósica, algunas experiencias de investigación en Colombia*. (J. Melo, Ed.), *ResearchGate*. Colombia.
- Poidevin, L., Feliu, J., Doan, A., Berrin, J. G., Bey, M., Coutinho, P. M., ... Heiss-Blanquet, S. (2013). Insights into exo- and endoglucanase activities of family 6 glycoside hydrolases from *Podospora anserina*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(14), 4220–4229. <https://doi.org/10.1128/AEM.00327-13>
- Pozo, C. (2011). *Aprovechamiento del bagazo de caña de azúcar en la fabricación de bloques ecológicos para mampostería liviana*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Prasad, D., & Ankit, M. (2015). An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0279-4>
- Ravindra, P. (2015). Pretreatment studies of rice bran for the effective production of cellulose, (January).
- Ribeiro, G. O., Gruninger, R. J., Badhan, A., & McAllister, T. A. (2016). Mining the rumen for fibrolytic feed enzymes. *Animal Frontiers*, 6(2), 20–26. [doi:10.2527/af.2016-0019](https://doi.org/10.2527/af.2016-0019)

- Samaniego, M., & Espinoza, J. (2016). Políticas para la promoción de las energías renovables en Ecuador. *ResearchGate*, (May), 259–300.
- Sánchez, A., Gutiérrez, A., Muñoz, J., & Rivera, C. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos Bioethanol Production from agroindustrial lignocellulosic byproducts. *Tumbaga*, 5, 61–91.
- Sánchez, J. (2013). *Evaluación energética de cáscaras de cacao nacional y CCN-51*. Universidad de Cuenca.
- Schwarz, W., Grabnitz, F., & Staudenbauer, W. (1986). Properties of a *Clostridium thermocellum* endoglucanase produced in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 51 (6), 293–1299.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Sukumaran, R. K., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 127, 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.012>
- Straw, W., Overview, A., Swain, M. R., Singh, A., Sharma, A. K., & Tuli, D. K. (2019). *Bioethanol Production From Rice-and Wheat Straw. Bioethanol Production from Food Crops*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813766-6/00011-4>
- Sukumaran, R. K., Singhania, R. R., & Pandey, A. (2005). Microbial cellulases - Production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64(11), 832–844.
- Vargas, J., Alvarado, P., Vega, B., & Porras, M. (2013). Caracterización del subproducto cascarillas de arroz en búsqueda de posibles aplicaciones como materia prima en procesos, 23(1).
- Vega, M. (2016). *Uso de residuos celulosicos de la agroindustria para la produccion de bioetanol*. Pontificia Universidad Catolica del Ecuador.
- Wolfende, R., & Snider, M. (2001). The depth of chemical time and the power of enzyme as catalysts. *Acc Chem Ress*, 34, 938–945.
- Wood, I., Elliston, A., Ryden, P., Bancroft, I., Roberts, I. N., & Waldron, K. W. (2012).

Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass and Bioenergy*, 44(0), 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.003>

Wood, T. M. (1988). Biomass Part A: Cellulose and Hemicellulose. Methods in Enzymology. *Elsevier*, 160.

Zelena, K., Eisele, N., & Berger, R. G. (2014). Escherichia coli as a production host for novel enzymes from basidiomycota. *Biotechnology Advances*, 32(8), 1382–1395.

Zhang, X., & Zhang, Y. P. (2013). CELLULASES: CHARACTERISTICS, SOURCES, PRODUCTION, AND APPLICATIONS, 131–146.

Zhang, Y. P., & Lynd, L. R. (2004). Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose : Noncomplexed Cellulase Systems. <https://doi.org/10.1002/bit.20282>