

Diseño eficiente de medios para la producción de lacasa, manganeso peroxidasa y endoxilanas de *Trametes versicolor* cultivado sobre residuos agroindustriales, mediante modelamiento matemático

Efficient design of means for the production of laccase, manganese peroxidase and endoxylanase from *Trametes versicolor* grown on agro-industrial residues, through mathematical modeling

Sandra Montoya Barreto , Yesica Alejandra Patiño Marín 
Óscar Julián Sánchez Toro 
Universidad de Caldas, Colombia

Open Access

Recibido:

20 de diciembre de 2019

Aceptado:

24 de junio de 2020

Publicado:

5 de agosto de 2020

Correspondencia:

sandra.montoya@ucaldas.edu.co

DOI:

<https://doi.org/10.17081/invinno.8.2.3601>



© Copyright: Investigación e Innovación en Ingenierías

Resumen

Objetivo: Investigar la influencia de los iones de Mn²⁺ y Cu²⁺ en ocho formulaciones de diferentes medios sólidos (F1-F8) para la producción de lacasa (LAC), manganeso peroxidasa (MnP) y endo β-D-1,4-xilanas (ENX) con *Trametes versicolor*. **Metodología:** Los medios se formularon con residuos lignocelulósicos, dos niveles de carbonato de calcio, sulfato de manganeso (II) y sulfato de cobre (II). Las formulaciones se inocularon al 4% (p/p) con *Trametes versicolor* y se incubaron por 17 días evaluando la producción de biomasa, azúcares reductores y la degradación de hemicelulosa y lignina. Se aplicó un diseño experimental multifactorial a cuatro vías y se determinó la actividad de LAC, MnP y ENX. **Resultados:** Los mejores títulos enzimáticos de LAC se obtuvieron para F5 y F8 con actividades de 11,96 U/g sólido seco (ss) y 8,36 U/g ss; para MnP, el medio F8 arrojó la mayor actividad enzimática (1,32 U/g ss). La máxima actividad ENX fue de 2,63 U/g ss para F1. La mayor degradación de lignina (42,5%) y de hemicelulosa (32,5%) se alcanzó con el medio F7. Se propuso un modelo matemático para la producción de biomasa fúngica, actividades LAC y MnP y consumo de sustratos. **Conclusiones:** La adición de 0,16% de CuSO₄ y de 0,1% de MnSO₄ favoreció la producción de LAC y MnP por *Trametes versicolor*. Las condiciones de cultivo seleccionadas permitieron una mayor síntesis de LAC y ENX. El modelo matemático propuesto permitió describir adecuadamente el proceso de fermentación en estado sólido con *Trametes versicolor*.

Palabras claves: Enzimas degradadoras de lignina, cultivo en estado sólido, cinética de fermentación, xilanas, sales minerales.

Abstract

Objective: This work assesses the influence of Mn²⁺ and Cu²⁺ ions in eight formulations of different solid media (F1–F8) for the production of laccase (LAC), manganese peroxidase (MnP), and endo 1,4 β-D-xylanase (ENX) from *Trametes Versicolor*. **Methodology:** The production media were formulated using lignocellulosic waste, two calcium carbonate levels, manganese sulfate (II), and copper sulfate (II). These formulations were inoculated at 4% (w/w) with *Trametes versicolor* and incubated for 17 days, during which time biomass, reducing sugar production, and hemicellulose and lignin degradation were assessed. Then, a four-way multifactorial experimental design was applied to determine LAC, MnP, and ENX activity. **Results:** The best LAC enzymatic titers were produced by the F5 and F8 media, with activities of 11.96 and 8.36 U/g dry solid (DS), respectively. For MnP, the F8 medium exhibited the highest enzymatic activity at 1.32 U/g DS. The maximum ENX activity was reported by F1 at 2.63 U/g DS. In addition, the F7 medium evidenced the highest lignin (42.5%) and hemicellulose (32.5%) degradation compared with all other media. Finally, a mathematical model was proposed for fungal biomass production, LAC and MnP activities, and substrate consumption. **Conclusions:** Adding CuSO₄ at 0.16% and MnSO₄ at 0.1% favored LAC and MnP production from *Trametes versicolor*, respectively. The selected culture conditions facilitated LAC and ENX to be synthesized at a high rate. In addition, the proposed mathematical model adequately describes the solid-state fermentation process from *Trametes versicolor*.

Keywords: Lignin Degrading Enzymes, Solid-State Culture, Fermentation Kinetics, Xylanase, Mineral Salts.

Como citar (IEEE): S. Montoya - Barreto., Y.A. Patiño - Marín., y O.J. Sánchez - Toro, "Diseño eficiente de medios para la producción de lacasa, manganeso peroxidasa y endoxilanas de *Trametes versicolor* cultivado sobre residuos agroindustriales, mediante modelamiento matemático", Investigación e Innovación en Ingenierías, vol. 8, n°. 2, 2020. DOI: <https://doi.org/10.17081/invinno.8.2.3601>

Introducción

Se estima que la producción mundial de biomasa al año es aproximadamente de 220 mil millones de toneladas en peso seco [1]. Las actividades agrícolas y agroindustriales generan grandes volúmenes de biomasa con altos contenidos de material lignocelulósico. Esta biomasa lignocelulósica se puede usar como materia prima para obtener nuevos productos con valor agregado reduciendo los problemas ambientales asociados con su disposición final. No obstante, la presencia de lignina en el complejo lignocelulósico y su naturaleza recalcitrante, la cristalinidad de la celulosa contenida en este mismo complejo y la baja porosidad de sus fibras, entre otros factores, hacen que este material sea de difícil degradación [2], paso necesario en la mayoría de los casos para su conversión en bioproductos de alto valor. Entre estos bioproductos se destacan las enzimas lignocelulolíticas que, a su vez, se destacan por su eficiencia en la bioconversión de polímeros lignocelulósicos en productos de valor agregado. La capacidad oxidativa y la acción hidrolítica de las enzimas lignocelulolíticas en su conjunto han permitido su aplicación en diferentes sectores industriales, así como para fines de biorremediación y en biorrefinerías [3]. Específicamente, las enzimas degradadoras de lignina (ligninasas) se han empleado en el tratamiento de aguas residuales, en la degradación de colorantes sintéticos en aguas de la industria textil, en el blanqueamiento de pulpa en la industria papelera, y en la degradación y mineralización de hidrocarburos aromáticos, pesticidas y otros contaminantes nitro-aromáticos [4, 5]. Las ligninasas también se han empleado en la industria de alimentos para animales ya que mejoran las propiedades nutricionales de los forrajes al posibilitar la deslignificación de materias primas lignocelulósicas particularmente en el caso de los rumiantes [6].

Los basidiomicetos de pudrición blanca son capaces de mineralizar una amplia gama de compuestos aromáticos, incluyendo compuestos xenobióticos, debido a su sistema enzimático ligninolítico oxidativo [7]. El hongo de pudrición blanca *T. versicolor* ha sido reconocido como uno de los basidiomicetos más efectivos en la deslignificación selectiva [8]. Los hongos de pudrición blanca deben degradar primero la lignina para luego tener acceso a los polisacáridos de hemicelulosa y celulosa que son su fuente de energía, por lo que han desarrollado características específicas para reducir la resistencia de la biomasa lignocelulósica y mineralizar eficientemente la lignina hasta CO₂ y agua como productos finales [9].

La transformación de los materiales lignocelulósicos por *T. versicolor* se atribuye predominantemente a la acción sinérgica de su sistema enzimático. Las enzimas ligninolíticas son el primer conjunto de enzimas que actúan para degradar significativamente la lignina. Este sistema enzimático está conformado por enzimas oxidasas y peroxidadasas como lacasa (LAC),

manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP), peroxidasa versátil y las enzimas productoras de peróxido de hidrógeno (glioxal oxidasa y glucosa oxidasa) [10]. El segundo sistema enzimático extracelular es el hidrolítico, el cual se encuentra conformado por las hemicelulasas y celulasas [11]. La degradación del polímero de hemicelulosa por medio de las hemicelulasas se realiza casi al tiempo con la degradación de la lignina; los hongos emplean los productos de la hemicelulosa como su fuente inmediata de nutrientes para posteriormente acceder a la celulosa como su principal fuente de energía [12].

La obtención de las enzimas lignocelulolíticas por hongos de pudrición blanca se encuentra influenciada por factores como la relación carbono/nitrógeno (C/N) del medio y las condiciones de operación como la aireación, la temperatura, y el control del pH, entre otros [2, 13]. Una estrategia para aumentar la actividad de estas enzimas consiste en suplementar los medios de cultivo y generar las mejores condiciones de operación en los procesos de fermentación. En particular, se ha estudiado el efecto inductor sobre la actividad lignocelulolítica que ejercen algunas sustancias adicionadas al medio de cultivo como alcoholes, compuestos aromáticos, iones metálicos y vitaminas, entre otros [14, 15, 16].

En general, la suplementación de los medios para el cultivo de hongos con metales en bajas concentraciones como cadmio, zinc, manganeso y cobre ha incrementado los títulos enzimáticos de lacasa y MnP, exhibiendo una mayor velocidad de colonización de los sustratos [17, 18, 19]. En el caso de *T. versicolor*, la adición al medio de concentraciones bajas de sulfato de cobre (II) y sulfato de manganeso (II) en fermentaciones en estado sólido y fermentaciones sumergidas permitió alcanzar mayores títulos enzimáticos que cuando no se suplementaron los medios con estas sales o cuando éstos fueron suplementados con alcoholes y compuestos aromáticos [20, 21, 22]. Pese al esfuerzo que se ha realizado por esclarecer la acción directa que ejercen los metales sobre la activación de las ligninasas, así como sobre las concentraciones óptimas de estos metales inductores para la síntesis de estas enzimas por hongos macromicetos, se requiere investigar el efecto de estos metales en el caso de cultivos en estado sólido teniendo en cuenta que la mayoría de los estudios se han enfocado en procesos de fermentación sumergida. En un trabajo previo [6], se estudió el efecto de la relación C/N y de la adición de Cu²⁺ a medios sólidos basados en aserrín de roble, capacho de coco, cascarilla de café y salvado de maíz sobre la producción de enzimas lignocelulolíticas por *T. versicolor*. Sin embargo, se requiere esclarecer el efecto inductor del cobre y del manganeso sobre la síntesis de estas enzimas lignocelulolíticas a partir de este tipo de residuos agroindustriales en fermentación en estado sólido. Adicionalmente, no se reporta en la literatura disponible evidencia científica sobre la acción sinérgica que ejercen estos metales en conjunto con el carbonato de calcio sobre la producción de enzimas ligninolíticas por hongos como *T. versicolor* mediante

fermentación en estado sólido. Al respecto, el carbonato de calcio es empleado comúnmente para ajustar el pH de los sustratos sólidos, así como para mejorar el metabolismo del calcio y hacer más consistente la producción de los macromicetos de cultivo en cultivo [23]. En particular, se requiere investigar con mayor detalle el posible efecto inductor de la interacción de los iones de cobre y manganeso con el carbonato de calcio en sustratos sólidos sobre la obtención de las enzimas oxidativas de lignina del hongo *T. versicolor*.

De otro lado, se necesita ampliar la información existente en torno a los modelos matemáticos utilizados para modelar el comportamiento de la producción de enzimas lignocelulolíticas cuando se obtienen a partir de medios de cultivo sólidos suplementados con metales. Los modelos matemáticos para describir procesos de fermentación en estado sólido son escasos, debido principalmente a la heterogeneidad de los procesos. Las expresiones matemáticas utilizadas corresponden generalmente a fermentaciones sumergidas que son adaptadas a estos procesos. Se han desarrollado algunas expresiones específicamente para fermentaciones en estado sólido [6]. En este sentido, se han utilizado varias ecuaciones cinéticas de complejidad variable, tales como la ecuación lineal, logística, de dos fases o la ecuación de Monod a fin de describir la producción de biomasa en procesos de fermentación en estado sólido [24, 25]. De las expresiones matemáticas utilizadas, la más frecuente es la ecuación logística debido a su simplicidad. En contraste, la producción de metabolitos primarios y secundarios como los azúcares reductores y las enzimas requiere mayor complejidad en los modelos, por lo que se hace necesario utilizar ecuaciones que adapten expresiones cinéticas de procesos de fermentación sumergida o de procesos enzimáticos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de dos niveles de Mn^{+2} y Cu^{+2} y dos niveles de carbonato de calcio en ocho formulaciones de sustratos basados en residuos lignocelulósicos sobre las actividades lignocelulolíticas lacasa, manganeso peroxidasa y endo β -D-1,4-xilanas en cultivo sólido empleando *T. versicolor*, así como la capacidad de este hongo para degradar los polímeros de lignina y hemicelulosa presentes en los sustratos formulados. Adicionalmente, se propuso un modelo matemático para describir el comportamiento de la biomasa fúngica, los sustratos y las enzimas estudiadas en un proceso de cultivo en estado sólido por lotes empleando el hongo *T. versicolor*.

Metodología

Microorganismo

Se utilizó la cepa *Trametes versicolor* PSUWC861 obtenida de la Pennsylvania State University (EUA). Esta cepa fue extendida sobre agar papa dextrosa (PDA) y mantenida en refrigeración a 4°C con transferencias periódicas. La fase experimental del presente estudio se llevó a cabo en la Planta de Bioprocesos y Agroindustria de la Universidad de Caldas a 2280 m s. n. m, con temperatura promedio de 17°C en Manizales, Colombia.

Preparación de la semilla

La semilla para la inoculación de los medios de cultivo sólidos se realizó sobre sorgo rojo lavado e hidratado con agua caliente hasta 40%-45% de humedad. El sorgo hidratado fue empacado en unidades de 200 g en bolsas de polipropileno bi-orientado, provistas con un filtro de algodón en la parte superior de la bolsa para el intercambio gaseoso. Posteriormente, el grano fue esterilizado a 121°C por 2 horas. El grano hidratado y esterilizado fue inoculado con cuatro trozos cuadrados de 0,5 cm de lado de micelio extendido en agar en cabina de flujo laminar. Las bolsas inoculadas se llevaron a incubación en penumbra y a 25°C hasta colonización completa.

Medios de cultivo y condiciones de colonización

Se utilizaron ocho formulaciones de sustrato sólido en las que se combinaron dos niveles de sulfato de cobre (II) (0,08% y 0,16% en base seca), dos niveles de sulfato de manganeso (II) (0,05% y 0,1% en base seca) y dos niveles de carbonato de calcio (0% y 2% en base seca) como se muestra en la Tabla 1. Los demás componentes en las formulaciones de los sustratos (en base seca) se mantuvieron constantes: cascarilla de café 20%, salvado de maíz 20% y sacarosa 1%; la cantidad de aserrín de roble en base seca varió entre 57% y 59% según las cantidades adicionadas de las sales. Adicionalmente, se realizó una formulación de control F0 sin adición de metales ni de carbonato de calcio. Los sustratos se formularon a 60% de humedad, empacados en bolsas de polipropileno bi-orientado de 200 g y posterior esterilización a 121°C por 2 horas. Posteriormente, los sustratos se inocularon con la semilla al 4% en base húmeda, se llevaron a incubación a 25°C bajo penumbra, con 60%-65% de humedad relativa, con relevos de aire de 2 horas cada 24 horas. Para los análisis se tomaron tres muestras destructivas por semana durante 14 días de incubación.

Tabla 1. Contenidos de sales de cobre, manganeso y calcio (en porcentaje en base seca) para ocho formulaciones de sustrato para el cultivo en estado sólido de *T. versicolor*

Formulación	F0	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
CuSO ₄	0,00	0,16	0,16	0,08	0,08	0,16	0,16	0,08	0,08
MnSO ₄	0,00	0,05	0,05	0,05	0,05	0,10	0,10	0,10	0,10
CaCO ₃	0,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	2,00

Fuente: Elaboración propia

Determinación de actividades enzimáticas

Los extractos para la determinación de las actividades enzimáticas xilanoítica y ligninolíticas fueron obtenidas a partir de 10 g de sustrato fresco en 30 mL de agua destilada sometidos a ultrasonido por 5 minutos y 10 minutos de agitación a 800 rpm en placa de agitación magnética, con posterior filtración al vacío. Los extractos líquidos fueron almacenados en viales a 4 °C durante una semana; todas las actividades enzimáticas evaluadas en estudio fueron determinadas por triplicado.

La actividad de la lacasa (E.C.1.10.3.2) se determinó utilizando 50 µL de extracto enzimático y 0,5 mM de ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato)) en solución 0,1 M de buffer de acetato de sodio con un pH de 3,6 como sustrato según el método de Paszczyński and Crawford [26], leyendo el aumento de absorbancia a 420 nm ($\epsilon_{420}=36/\text{mM cm}$) luego de tres minutos de reacción a 30°C. Una unidad de actividad LAC (U) fue definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 µmol de ABTS en 1 minuto.

La actividad de la manganeso peroxidasa (E.C.1.11.1.13) se determinó con 100 µL de extracto enzimático utilizando como sustrato una solución al 0,01% de rojo fenol en buffer de succinato de sodio 0,1 M con un pH de 4,5 y sulfato de manganeso (0,22 g/L), con peróxido de hidrógeno 0,2 mM como iniciador de la reacción, la cual se detuvo luego de 10 minutos con la adición de NaOH 5 N para leer el incremento de absorbancia a 610 nm ($\epsilon_{610}=22/\text{mM cm}$). Una unidad de actividad MnP (U) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 µmol de rojo fenol en 1 minuto [27].

La actividad de la endo β -D-1,4-xilanasas (E.C.3.2.1.8) se determinó utilizando como sustrato una suspensión de xilano 0,2% en buffer de acetato de sodio 50 mM con un pH de 4,8, incubada a 50°C con 100 µL de extracto enzimático por 30 minutos [28]. La reacción se interrumpió con la adición de ácido dinitrosalicílico (DNS). Los azúcares reductores liberados por las reacciones de las hidrolasas sobre los sustratos indicados fueron determinados por el método del DNS a 540 nm de longitud de onda [29]. Una unidad de actividad enzimática (U) fue definida como la producción de una 1 µmol de azúcares

reductores en 1 minuto. Para la curva de calibración se utilizó xilosa X1500 (SIGMA, EUA).

Cuantificación de biomasa y análisis químicos

El contenido de biomasa fúngica en los medios sólidos se estimó indirectamente mediante la determinación del componente estructural de la quitina, la N-acetil-D-glucosamina (NAGA) de acuerdo con el método de [30] en las muestras de sustrato colonizadas con *T. versicolor* en cada uno de los tiempos definidos de proceso. Las muestras de sustrato se secaron a 105°C por 24 horas, luego se sometieron a hidrólisis ácida con HCl 6 N por cuatro horas a 100°C. Se realizó una curva patrón con una solución de NAGA. Para la cuantificación de la biomasa se midió el contenido de NAGA por gramo de micelio del hongo de estudio, cultivándolo en medio líquido. El desarrollo del micelio en medio líquido se realizó en matraces de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo con la siguiente formulación (en g/L): glucosa 30, extracto de levadura 6, MgSO₄·H₂O 0,5, K₂HPO₄ 0,5 y CaCl₂ 0,1. El tiempo de fermentación para el crecimiento del hongo fue de 10 días a 25°C y 100 rpm de agitación. La quitina fue extraída mediante hidrólisis con HCl 6 N por tres horas. La determinación de la biomasa y los análisis químicos para este estudio se realizaron por triplicado.

Se determinaron los componentes de la fibra (hemicelulosa y lignina) de los sustratos de cada una de las formulaciones en siete tiempos durante los 14 días de incubación, así como la fracción soluble, empleando los resultados de la determinación de fibras detergente neutra, ácida y lignino-ácida. La medición se realizó a muestras secas y molidas de sustrato; cada muestra se sometió a tres hidrólisis en serie (cada una de 75 min): hidrólisis con lauril sulfato de sodio, hidrólisis en solución de bromuro de amonio en ácido sulfúrico 1 N, e hidrólisis con ácido sulfúrico al 72% (p/v). Al finalizar cada hidrólisis, las muestras fueron lavadas con acetona y secadas a 105°C hasta peso constante [31]. Para la determinación de azúcares reductores se realizó un extracto en una relación 1:3 de muestra seca del medio de cultivo colonizado en cada tiempo de incubación en agua destilada con asistencia de 5 min de ultrasonido y posterior agitación por 10 minutos y filtración al vacío. A los extractos obtenidos se les determinó el contenido de azúcares reductores por el método del DNS (Miller, 1959). Los porcentajes de degradación de las fibras fueron calculados al finalizar los catorce días de cultivo considerando la cantidad de cada polímero degradado (diferencia entre su concentración inicial y final) en relación con su concentración inicial.

Análisis estadístico

Se realizó un diseño experimental multifactorial a 4 vías con un nivel de significancia del 95%. Se empleó el programa Statgraphics versión 18 (Stargraphics Technologies, Inc., EUA) para realizar un análisis de varianza multifactorial con cuatro factores. El primer factor correspondió al contenido de CuSO_4 con dos niveles (0,08% y 0,16%), el segundo factor correspondió al contenido de MnSO_4 (0,05% y 0,1%), el tercer factor al contenido de CaCO_3 (0% y 2%) y el cuarto factor fue el tiempo a siete niveles (0, 2, 4, 7, 9, 11 y 14 días de incubación); las variables de respuesta fueron las actividades enzimáticas MnP, LAC y ENX, contenido de lignina y hemicelulosa (en mg/g ss), producción de biomasa (en $\mu\text{NAGA/g ss}$) y producción y consumo de azúcares reductores (en mg/g ss). La masa de los medios de cultivo fue de 2 kg para cada formulación, empacados en bolsas de 200 g.

Modelamiento matemático

Se utilizó el software Matlab® 2016 (MathWorks, EUA) para la solución del modelo matemático del proceso de fermentación en estado sólido propuesto en este trabajo y que consta de siete ecuaciones diferenciales ordinarias. Al programa se le suministraron los valores experimentales y los valores supuestos (iniciales) de los parámetros. La resolución del sistema de ecuaciones diferenciales se realizó mediante la función ODE45 que utiliza un método variable de Runge-Kutta. Los valores de los parámetros finales se estimaron mediante la función Fmincon. La función objetivo a minimizar se definió como la suma de cuadrados de los residuos entre los datos experimentales y los calculados por el modelo.

Resultados y discusión

Producción de enzimas ligninolíticas y xilanasas

Los mayores títulos enzimáticos obtenidos para cada enzima no se presentaron en el mismo día de fermentación, ni tampoco se visualizó una tendencia constante en el tiempo para las enzimas estudiadas. No obstante, los valores obtenidos de actividades enzimáticas sí conservaron un comportamiento similar con respecto a los valores máximos y mínimos durante los 14 días de cultivo. Para el caso específico de la lacasa, los mayores títulos enzimáticos obtenidos para las ocho formulaciones se alcanzaron durante los días 7 y 11 de la fermentación, mientras el descenso de la actividad lacasa ocurrió a partir del día 11 de fermentación (Ver Figura 1). Por otro lado, el comportamiento de la MnP dista significativamente de la LAC, ya que durante el cultivo todas las formulaciones mantuvieron intervalos de actividad enzimática muy similares sin obtener títulos enzimáticos altos, la medida experimental de esta enzima arrojó dos o más valores máximos de actividad en los 14 días de incubación en todas las formulaciones (Ver Figura 2). Posteriormente, los datos experimentales no

mantuvieron la tendencia en la disminución de la actividad enzimática a partir del día 11 de incubación.

La actividad enzimática de la endo β -D-1,4-xilanasa medida en este trabajo mantuvo un comportamiento similar durante todo el tiempo de la fermentación para las ocho formulaciones evaluadas. La actividad de esta enzima exhibió sus mayores títulos en los días 9 y 11 de incubación. Al igual que ocurrió con las ligninasas evaluadas, esta enzima mostró una disminución en su actividad enzimática a partir del día 11 de fermentación. La actividad ENX presentó diferencias estadísticamente significativas para los factores cobre (valor-p = 0,0193) y manganeso (valor p = 0,0163) evaluados individualmente. Teniendo en cuenta el comportamiento de los valores experimentales obtenidos de las actividades enzimáticas de LAC, MnP y ENX, se infiere que la mayor variación de la actividad enzimática del hongo se presentó entre los días 2 y 11 de incubación. Sin embargo, este período no se debe asumir como constante en la producción de enzimas lignocelulolíticas, ya que se debe tener en cuenta que los procesos de fermentación en estado sólido se rigen por diferentes condiciones de operación lo cual influye directamente en la expresión genética de estas enzimas. Un aspecto que se debe considerar en el análisis de la información obtenida es que el tiempo de fermentación es relativamente corto en comparación con otros estudios, donde los tiempos de producción de enzimas lignocelulolíticas pueden llegar hasta 50 días de cultivo dependiendo del organismo de estudio y del medio de cultivo empleado [32].

Se han planteado diferentes hipótesis para explicar el comportamiento ascendente y descendente de los títulos enzimáticos de las enzimas lignocelulolíticas. Es posible que el método en la obtención de los extractos enzimáticos es una de las causas que genera la disminución en las actividades enzimáticas. La actividad catalítica de estas enzimas se puede ver seriamente afectada dada su sensibilidad a diferentes factores físico-químicos y biológicos como la alteración del pH, cambios de temperatura, fuerzas mecánicas y contaminación de los extractos [33]. Sin embargo, las desviaciones estándar de los datos obtenidos no son muy grandes en la mayoría de los tiempos de muestreo como se observa en las barras de error de las Figuras 1 y 2. Otras posibles causas de la variabilidad de estos títulos enzimáticos son las alteraciones que se presentan en el proceso de fermentación; entre estos cambios, se puede considerar la pérdida de humedad en el medio de cultivo, así como la transformación química que sufren los sustratos ya que es posible que exista una nueva producción de metabolitos y sustancias que alteren la síntesis y la expresión de las enzimas lignocelulolíticas [32].

Efecto de la adición de cobre, manganeso y calcio sobre la producción de ligninasas y xilanasas

Los datos experimentales obtenidos de las actividades enzimáticas mostraron el efecto estimulante de la interacción de los iones de Cu^{+2} , Mn^{+2} y Ca^{+2} suministrados al medio de cultivo para la producción de lacasa y MnP en comparación con el tratamiento control (F0) el cual fue formulado sin la adición de cobre, manganeso y calcio (ver Tabla 2). Para el caso de la lacasa, el análisis estadístico mostró que la interacción de los tres factores correspondientes al contenido de las tres sales tuvo una influencia estadísticamente significativa (valor-p = 0,043) sobre la producción de esta enzima. Cabe destacar que el mayor título enzimático de lacasa se obtuvo para el medio F5, el cual fue adicionado con los mayores porcentajes de las sales de cobre y manganeso (0,16% CuSO_4 y 0,1% MnSO_4) y sin adición de CaCO_3 ; esta máxima actividad enzimática de lacasa obtenida en los medios se alcanzó en un período de tiempo más corto en comparación con el tratamiento de control, donde su mayor título enzimático se alcanzó en el día 14 de incubación.

El efecto inductor de la interacción de uno o más metales cuando fueron suministrados a los medios de cultivo para la producción de enzimas ligninolíticas ha sido evaluado por otros autores. [34] observaron un efecto estimulante del Cu^{+2} cuando se incrementaron los valores en la producción de lacasa, MnP y LiP del hongo *Phlebia radiata* cultivado en estado semi-sólido durante 32 días de incubación. Los títulos enzimáticos reportados por estos autores en el día 14 de incubación fueron cinco veces mayores para LiP y lacasa que los obtenidos en los tratamientos sin presencia de metales. Los resultados obtenidos en este trabajo con respecto al comportamiento de la lacasa coinciden con los reportados por otros autores quienes reportaron el aumento en la producción de lacasas y peroxidases fúngicas cuando sus medios de cultivo en estado sólido fueron suplementados con Cu^{+2} y Cd^{+2} como moduladores de la actividad enzimática ligninolítica [35, 36].

El efecto del carbonato de calcio evaluado como factor independiente en la producción de MnP arrojó diferencias estadísticamente significativas (valor-p = 0,0302). Por otra parte, los medios de cultivo que fueron formulados con 0,08% de CuSO_4 y 2% de CaCO_3 (medios F4 y F8) mostraron diferencias estadísticamente significativas (valor-p = 0,0374) en la producción de MnP en comparación con los demás medios de cultivo. La interacción entre los factores CuSO_4 y CaCO_3 estimuló ligeramente la inducción de la MnP extracelular de *T. versicolor*, ya que se logró duplicar su actividad enzimática en comparación con las actividades enzimáticas obtenidas en los cultivos formulados sin adición de las sales utilizadas en este estudio (medio F0). El análisis estadístico realizado no mostró que la variación estudiada en la concentración de manganeso influyera sobre la producción de MnP, opuesto a lo que se esperaba. Los mayores títulos para esta enzima se alcanzaron con

las formulaciones suplementados con 0,08% de sulfato de cobre, y esta actividad enzimática se vio favorablemente afectada con la interacción entre el carbonato de calcio y el sulfato de cobre. Investigaciones recientes para otros hongos obtuvieron resultados similares a los encontrados en este trabajo respecto al comportamiento de la MnP. De acuerdo con Meehnian, et al. [37], la actividad de la MnP en un cultivo en estado sólido de *Daedalea flavida* no se indujo con la adición de sulfato de manganeso 0,1 mM y los títulos enzimáticos de MnP no sobrepasaron a los obtenidos con el medio de cultivo de control, mientras que la producción de LAC mostró una tendencia en aumento durante los 21 días de fermentación estudiados. El objetivo de adicionar sulfato de manganeso a los medios de cultivos es aumentar la disponibilidad del Mn⁺² en el ambiente favoreciendo las condiciones de síntesis de MnP. Si bien se ha encontrado un estudio que soporta esta estrategia [38], aún se deben definir cuáles son las concentraciones de MnSO₄ que favorecen la inducción de la MnP y los rangos de pH óptimos para potenciar la actividad de esta enzima. Se debe resaltar que este trabajo no sólo estudio la influencia de los metales en la síntesis de enzimas lignocelulolíticas, sino que también se estudió la posible influencia de la interacción del cobre, manganeso y calcio como posibles inductores de este consorcio enzimático. Aunque en la literatura disponible hay evidencia científica del papel inductor de las sales de cobre y manganeso para la obtención de enzimas ligninolíticas, hace falta profundizar el análisis de la acción sinérgica que existe entre el carbonato de calcio y las sales de cobre y manganeso, así como el porcentaje de participación en los medios de cultivo de cada una de estas sustancias.

Un aspecto relevante en el comportamiento de la MnP es que su máxima actividad se obtuvo finalizando el tiempo de incubación. Por lo tanto, se debe considerar la realización de un estudio donde el tiempo de fermentación sea superior al planteado en este trabajo. De igual forma, se debe tener en cuenta que existen varias limitantes que obstaculizan la medida experimental de esta enzima. Se encontró que el comportamiento de MnP en esta investigación mantiene la tendencia con el de otros trabajos de investigación. Por ejemplo, Fujian and Zuohu [39] no obtuvieron títulos enzimáticos altos de MnP hasta después del décimo día de incubación; posteriormente la actividad de esta enzima decayó drásticamente y se mantuvo hasta finalizar el tiempo de los ensayos. Estos autores lograron aislar y purificar por medio de un tren de operaciones unitarias a escala de laboratorio cinco isoenzimas de MnP obtenidas con *Phanerochaete chrysosporium*. Lo anterior consolida la hipótesis propuesta en un trabajo previo [6] en donde se sugiere que, durante los procesos de fermentación en estado sólido, la variabilidad en las actividades enzimáticas podría explicarse por la posible síntesis y excreción al medio de varias isoenzimas de MnP en el tiempo lo que no permite diferenciar la actividad enzimática entre las enzimas secretadas por el organismo o las inducidas por los efectos de los metales mediadores.

La evaluación de la interacción del contenido de cobre, manganeso y calcio adicionados a los medios de cultivo no implicó una influencia directa sobre la síntesis de la endo β -D-1,4-xilanasa. La variación en los datos obtenidos para la actividad enzimática de esta xilanasa en las ocho formulaciones estudiadas no fue estadísticamente significativa. No obstante, la contribución individual de la adición de cobre y manganeso (como factores del diseño experimental) en las concentraciones estudiadas en este trabajo sí mostraron una significancia estadística medida como valor-p de 0,019 y 0,016 respectivamente, no así en el caso del carbonato de calcio. De este modo, se demuestra el posible efecto mediador de los iones de manganeso y cobre sobre la síntesis de esta xilanasa extracelular cuando fueron suministrados al medio de cultivo con un porcentaje de 0,08% de CuSO_4 o de 0,05% de MnSO_4 . Gurpreet, et al., [40] demostraron el efecto inductor del sulfato de cobre sobre la producción de xilanasa en fermentación en estado sólido por medio de *Aspergillus niger*; cuando el medio de cultivo fue suplementado con 1 Mm/kg de esta sal, se logró maximizar la actividad enzimática de la xilanasa en comparación con otros tratamientos evaluados. No obstante, es importante resaltar que, aunque se encuentran reportes de estudios relacionados con la acción de algunas sales y minerales en la síntesis de enzimas lignocelulolíticas, no se encontraron estudios que evaluaran la interacción de sales de sulfato de cobre, sulfato de manganeso y carbonato de calcio para potencializar la producción de estas enzimas.

En la Tabla 2 se muestran los picos máximos de actividad de las tres estimas estudiadas, así como el día de incubación en el que se alcanzaron los mayores títulos para cada una de las formulaciones durante los 14 días de incubación del hongo *T. versicolor*. De acuerdo con los datos de esta tabla, la producción de enzimas lignocelulolíticas fue favorecida por la adición de carbonato de calcio, sulfato de cobre y sulfato de manganeso. En particular, las formulaciones adicionadas con CaCO_3 , CuSO_4 y MnSO_4 permitieron obtener mayores actividades enzimáticas ligninolíticas (LAC y MnP) en comparación con el medio de control (F0). Los títulos enzimáticos más importantes para LAC se alcanzaron en los medios F5 (11,96 U/g ss) y F8 (8,36 U/g ss), los cuales contenían los mayores niveles de las sales mencionadas. Esto ratifica la importancia de los iones de Cu^{+2} , Mn^{+2} y Ca^{+2} como promotores en la inducción de estas enzimas ligninolíticas. Este estudio logró demostrar no solo la acción sinérgica que ejercen estos metales para la inducción de la síntesis de estas enzimas, sino también el logro de mayores títulos enzimáticos en menor tiempo de incubación en comparación con el tratamiento de control donde sus máximas actividades enzimáticas fueron alcanzadas en los últimos días de la fermentación. El grado de contribución del CaCO_3 en la síntesis de ligninasas fue determinante no solo en interacción con los iones de Mn^{2+} para las actividades LAC y MnP obtenidas en el medio F8 (2% CaCO_3 y 0,1 de MnSO_4), sino también como factor independiente en la síntesis de MnP. La información de la Tabla 2 permite observar que la adición de manganeso y

cobre no tienen un efecto inductor sobresaliente en la síntesis de ENX, teniendo en cuenta que el mayor título enzimático se alcanzó con el tratamiento de control para el día 14 de incubación. Asimismo, se logró determinar que entre mayor sea la concentración de estas sales en las formulaciones evaluadas, menor es la actividad enzimática de ENX que se obtiene.

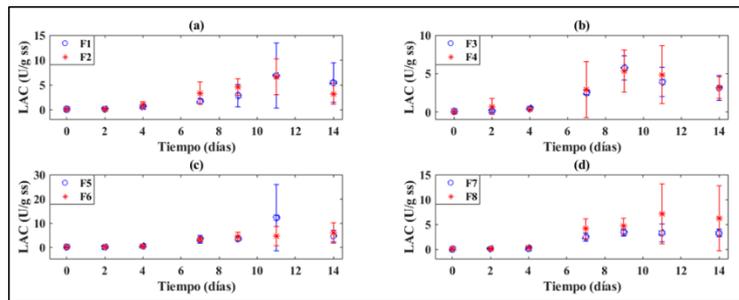
Tabla 2. Máximas actividades enzimáticas (U/g ss) de *T. versicolor* para ocho formulaciones suplementadas con CuSO₄, MnSO₄ y CaCO₃

Formulación	F0	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
LAC (U/g ss)	3,24	6,74	6,50	5,63	5,19	11,96	5,84	8,14	8,36
Día de máx. actividad	14	11	11	9	9	11	14	11	14
MnP (U/g ss)	1,09	1,03	1,10	0,61	0,87	1,26	0,80	1,29	1,32
Día de máx. actividad	14	14	14	7	11	14	11	14	14
ENX (U/g ss)	5,36	2,63	1,77	1,89	1,56	1,30	1,64	1,18	1,13
Día de máx. actividad	14	9	2	2	4	11	11	4	9

Fuente: Elaboración propia

La significancia estadística de las interacciones entre los factores evaluados con respecto al comportamiento de LAC y MnP permite inferir la influencia conjunta que ejercen los metales cobre y manganeso con el carbonato de calcio en los medios de cultivos al inducir la síntesis de estas dos ligninasas. En enzimología es conocida la influencia del cobre y del manganeso para favorecer la acción catalítica de la lacasa y la MnP [41]. Estudios preliminares han demostrado que la lacasa sintetizada por *Trametes sp.* posee propiedades diferentes en comparación con lacasas sintetizadas por otros hongos de podredumbre blanca. Las diferencias más relevantes a destacar son la termoestabilidad, resistencia a la alcalinidad o acidez extrema y tolerancia a los disolventes orgánicos y a la presencia de metales pesados [42, 43]. La lacasa es una fenol-oxidasa capaz de catalizar la oxidación de un amplio espectro de sustancias fenólicas y aromáticas por medio de la reducción del oxígeno molecular como aceptor de electrones reduciéndolo hasta agua [44]. La lacasa contiene cuatro átomos de cobre. El cobre tipo I es el encargado de darle el color azul característico a la enzima y de su potencial redox dependerá la eficiencia catalítica de la misma. También el cobre tipo I participa en el sitio activo donde se lleva a cabo la oxidación de los sustratos, y el cobre tipo III es donde ocurre la reducción del oxígeno molecular hasta agua [45].

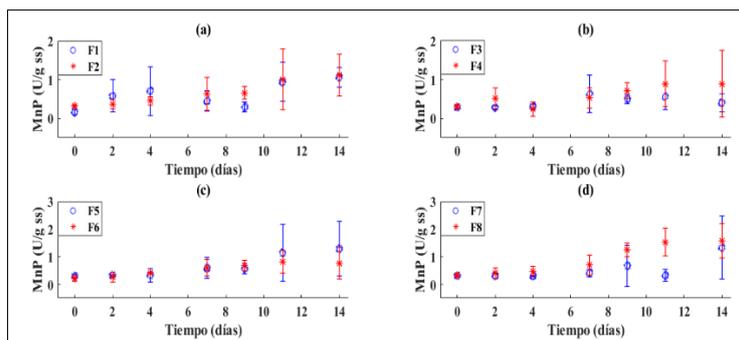
Figura 1. Progreso de la actividad lacasa (LAC) del hongo *T. versicolor* sobre ocho formulaciones de sustratos durante 14 días de fermentación en estado sólido. (a): F1-F2, (b): F3-F4, (c): F5-F6, (d): F7-F8. ss—sólido seco



Fuente: Elaboración propia

Son diversos los factores que pueden inducir la síntesis de LAC, pero teniendo en cuenta el rol que cumplen los átomos de cobre y la estructura de esta ligninasa, se ha sugerido que la adición de algunos metales en los medios de cultivo influye sobre el proceso de transcripción genética incrementando la producción de esta enzima [46, 47, 48].

Figura 2. Progreso de la actividad manganeso-peroxidasa (MnP) del hongo *T. versicolor* sobre ocho formulaciones de sustratos durante 14 días de fermentación en estado sólido. (a): F1-F2, (b): F3-F4, (c): F5-F6, (d): F7-F8. ss—sólido seco



Fuente: Elaboración propia

Existe evidencia científica de la presencia de promotores sensibles a metales en genes de enzimas ligninolíticas, lo cual indica que la presencia de algunos metales como cobre y manganeso en el medio de cultivo pueden actuar estabilizando o activando el procesamiento y tráfico de la información genética del ARN mensajero que codifica la información para la síntesis de una nueva proteína [8, 20, 49, 50]. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la adición de manganeso (evaluado como factor independiente) no realiza ningún tipo de inducción sobre las actividades enzimáticas ligninolíticas en el rango de concentraciones estudiado. Contrario a lo esperado, la presencia de manganeso en los medios analizados influyó la

activación y expresión de la lacasa, teniendo en cuenta que el mayor título enzimático de las dos ligninasas analizadas durante los ensayos de fermentación correspondió a esta enzima. El medio F5 fue el que mayor actividad enzimática presentó con un valor de 11,96 U/g ss en el día 11 de la fermentación, mientras que los títulos enzimáticos de MnP no fueron mayores a 1,32 U/g ss (ver Tabla 2).

Si bien los medios de cultivos suplementados con las tres sales estudiadas influenciaron positivamente la secreción de las ligninasas, la endoxilanasas medida en estos ensayos no pareció ser inducida por la interacción de los factores evaluados. La endo β -D-1,4-xilanasas hidroliza al xilano, el segundo polisacárido natural más abundante del material lignocelulósico [51]. En los últimos años, ha aumentado el interés en la producción de hemicelulasas por fermentación en estado sólido empleando residuos agroindustriales con alto contenido de material lignocelulósico, debido a los rendimientos más altos en tiempos más cortos de fermentación y la disponibilidad de residuos como sustratos más baratos comparada con la fermentación sumergida. Por lo tanto, la presencia de xilanasas en el coctel enzimático es muy importante para alterar el xilano y facilitar el acceso a la celulosa. Por este motivo, diferentes grupos de investigación se centran en potenciar no solo la producción de enzimas ligninolíticas, sino también la obtención de hemicelulasas con el fin de alcanzar una acción sinérgica y degradar eficientemente los polímeros lignocelulósicos. Para verificar el comportamiento enzimático de la endoxilanasas, se realizó la comparación de las actividades enzimáticas de los ocho tratamientos evaluados con respecto al sustrato testigo, encontrándose que los mayores títulos de ENX fueron obtenidos sin la adición de sales de manganeso y cobre. Luego del medio F0, la mayor actividad enzimática de endoxilanasas fue obtenida en la formulación F1 (2,63 U/g ss) alcanzada a los nueve días del proceso de fermentación. Por lo tanto, de este trabajo se infiere que la suplementación de los sustratos con sales de cobre y manganeso puede alterar también los títulos enzimáticos de hidrolasas como las endoxilanasas.

Efecto de la adición de sales de cobre, manganeso y calcio sobre la producción de biomasa y la degradación de lignina y hemicelulosa

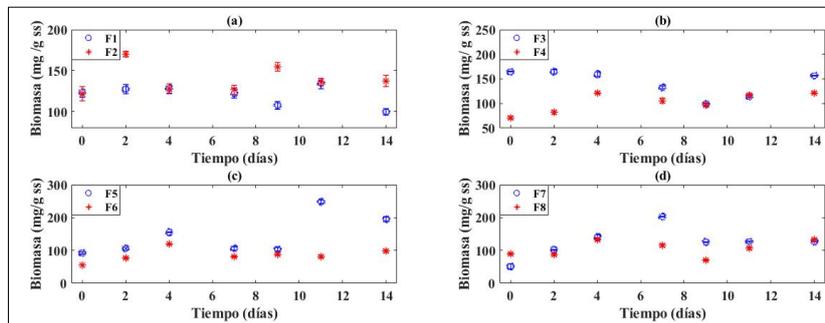
La adición de sales de manganeso, cobre y calcio a los medios de cultivo presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al crecimiento micelial del hongo *T. versicolor* cuantificado indirectamente a través de la determinación de NAGA. Los datos obtenidos que mostraron diferencias estadísticamente significativas para la producción de biomasa fúngica fueron las formulaciones suplementadas con 2% de CaCO₃, 0,08% de CuSO₄ y 0,1% de MnSO₄ (valor-p = 0,0076). Asimismo, la producción de biomasa mostró diferencias estadísticamente significativas (valor-p = 0,006) en todas las formulaciones a las que se les adicionó el 2% de carbonato de

calcio. En la Figura 3 se muestra el progreso en el tiempo del crecimiento micelial durante los 14 días de fermentación para las ocho formulaciones estudiadas. La mayor producción de biomasa se registró para el medio F5 en el día 11 de la fermentación con un valor de 248,2 mg/g ss.

En el presente trabajo se evaluó la degradación de la lignina y la hemicelulosa (ver Figuras 4 y 8) presentes en los sustratos formulados considerando la suplementación con sales de manganeso, cobre y calcio. El análisis estadístico de la degradación de lignina se vio influenciado por la interacción de la adición de cobre, manganeso y calcio cuando las sales respectivas fueron suministrados a los medios de cultivos (valor $p=0,013$). Se puede inferir que la degradación de la lignina para este estudio se generó especialmente en los sustratos suplementados con el sulfato cúprico, ya que los mayores títulos enzimáticos obtenidos correspondieron a la lacasa. Así, el mayor porcentaje de degradación de lignina y hemicelulosa se obtuvo para la formulación F7 con 42,5% y 32,5% respectivamente.

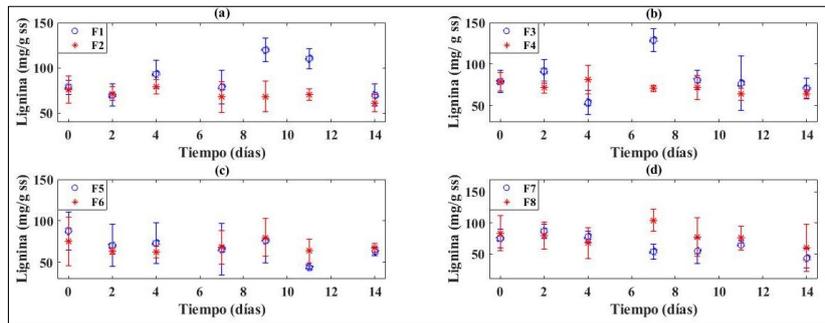
El comportamiento de los azúcares reductores en las ocho formulaciones evaluadas en este trabajo mostró un balance entre su formación y su consumo como se observa en la Figura 5. La adición de las sales de cobre, manganeso y calcio no mostró diferencias significativas estadísticamente para ninguna de las formulaciones bajo estudio. Es importante señalar que en los procesos de fermentación en estado sólido de materiales lignocelulósicos con *T. versicolor*, los azúcares reductores corresponden al producto de la degradación enzimática que realizan estos hongos sobre los polisacáridos presentes en el medio de cultivo [6].

Figura 3. Producción de biomasa del hongo *T. versicolor* en ocho formulaciones de sustrato durante 14 días de fermentación en estado sólido. (a): F1-F2, (b): F3- F4, (c): F5-F6, (d): F7-F8. ss—sólido seco



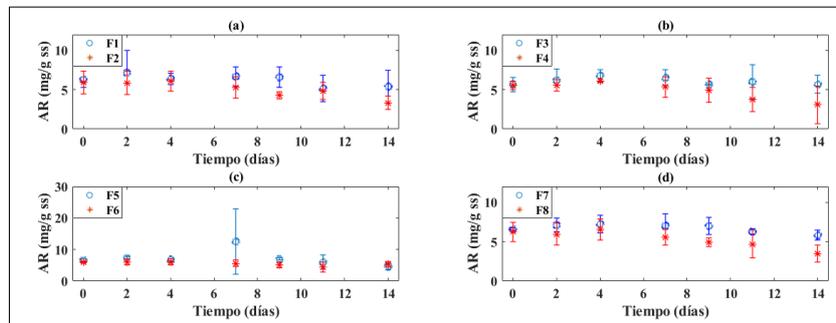
Fuente: Elaboración propia

Figura 4. Degradación de lignina del hongo *T. versicolor* sobre ocho formulaciones de sustratos durante 14 días de fermentación en estado sólido. (a): F1-F2, (b): F3-F4, (c): F5-F6, (d): F7-F8. ss—sólido seco



Fuente: Elaboración propia

Figura 5. Perfil en el tiempo de la concentración de azúcares reductores (AR) del hongo *T. versicolor* en ocho formulaciones de sustrato durante 14 días de fermentación en estado sólido. (a): F1-F2, (b): F3-F4, (c): F5-F6, (d): F7-F8. ss—sólido seco



Fuente: Elaboración propia

Modelamiento matemático

La síntesis de enzimas lignocelulolíticas por hongos de la podredumbre blanca implica varios procesos como la absorción de nutrientes, la degradación de materiales contenidos en el medio de cultivo, la producción de biomasa celular, la excreción de metabolitos secundarios y la producción y consumo de agua, entre otros [52]. Algunos estudios han descrito modelos cinéticos para diferentes tipos de fermentación [53]; la mayoría de ellos se centran en la fermentación sumergida ya que los fenómenos involucrados en estos sistemas son actualmente más conocidos que en el caso de las fermentaciones en estado sólido. En este último tipo de cultivo, la heterogeneidad de los sustratos y de las materias primas es una de las principales limitantes que se deben abordar para obtener modelos matemáticos más precisos y aplicables en diferentes procesos biológicos como la degradación de residuos lignocelulósicos por hongos de pudrición

blanca. Pocos estudios han abordado los modelos matemáticos aplicados a los bioprocesos en estado sólido con hongos de la podredumbre blanca, así como las posibles modificaciones que se deben realizar a las expresiones matemáticas existentes a fin de simular de manera más precisa los fenómenos que ocurren en los procesos de fermentación en estado sólido con macromicetos [6].

Uno de los objetivos de este trabajo fue encontrar la mejor formulación suplementada con sales de cobre, manganeso y calcio para la producción de enzimas ligninolíticas y la degradación y consumo de la lignina y la hemicelulosa. Con base en los datos experimentales obtenidos de actividades enzimáticas, degradación de lignina y consumo de hemicelulosa durante la fermentación en estado sólido con el hongo *T. versicolor* durante 14 días de cultivo, se seleccionó un modelo matemático conformado por siete ecuaciones diferenciales ordinarias (Tabla 3) desarrollado en un trabajo previo [6] para hongos de pudrición blanca y aplicado al proceso de obtención de enzimas lignocelulolíticas. El modelo matemático considera los pasos más relevantes del proceso de fermentación en estado sólido como la formación de biomasa, la síntesis de enzimas y la degradación del material lignocelulósico. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos del modelamiento para el medio F7, ya que fue el que mostró el mejor comportamiento respecto a la degradación de los sustratos basados en materiales lignocelulósicos.

El modelo matemático seleccionado incluye la descripción de producción de la biomasa y tres enzimas lignocelulolíticas (LAC, MnP y ENX), azúcares reductores como producto intermedio consumido durante la misma fermentación, consumo de hemicelulosa y degradación de lignina. El modelo seleccionado consignado en la Tabla 4 para la descripción de la biomasa es la ecuación (1), la cual corresponde a la ecuación logística modificada por Mitchell, et al. [54]. Para describir la variación de los azúcares reductores en el tiempo se seleccionó la ecuación (2) que incluye un factor que afecta la derivada de la velocidad de producción de biomasa; los azúcares reductores son considerados un producto de la fermentación que es consumido por el mismo hongo como fuente de energía y su variación se ajustó más a la velocidad de formación de la biomasa que a la concentración de la biomasa misma. Para la degradación de lignina y el consumo de hemicelulosa en el tiempo de fermentación, se propusieron las ecuaciones (3) y (6) cuyo planteamiento se realizó en función de las concentraciones de las enzimas específicas responsables de la degradación de cada uno de los sustratos. La variación de las actividades xilanolítica (ENX) y ligninolíticas (LAC y MnP) fueron propuestas en dependencia de la concentración del sustrato específico y de la velocidad de producción de la biomasa con un factor de inhibición provocado por la concentración de azúcares reductores en el medio en el caso de la endoxilanasas, mientras que para las dos ligninasas el factor de inhibición fue afectado por la misma concentración de lignina en

el medio, como se observa en las ecuaciones (4), (5) y (7). La inhibición de las enzimas ligninolíticas puede deberse a sustancias intermedias producidas durante la fermentación o probablemente por concentraciones muy altas de lignina [55]. Aunque aún no hay certeza de ello, los datos experimentales obtenidos en este trabajo mostraron una posible inhibición de las ligninasas y como no se determinaron productos intermedios durante el desarrollo de la fermentación, se asumió una inhibición por sustrato, en este caso por lignina. Los parámetros de cada una de las ecuaciones consignadas en la Tabla 3 se presentan en la Tabla 4, así como la nomenclatura de cada una de las variables del modelo.

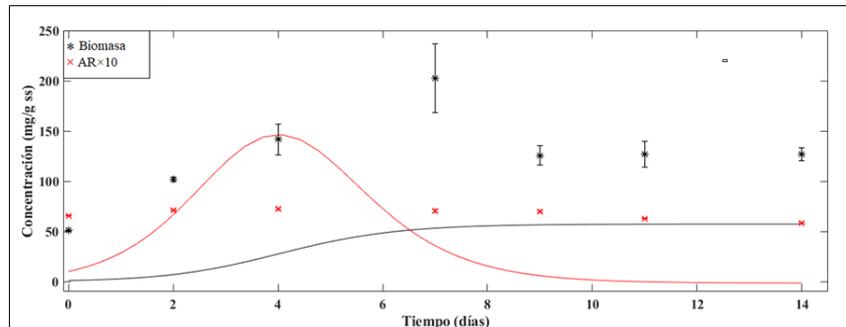
La fermentación en estado sólido es un proceso heterogéneo que se ve afectado además por las condiciones ambientales. La dificultad que representa la determinación del crecimiento de la biomasa, el consumo de los sustratos y la imposibilidad de determinar todas las sustancias intermedias que pueden generarse como producto de las reacciones bioquímicas durante las fases de incubación ha dificultado la descripción de los procesos de fermentación en estado sólido y su escalamiento cuando se pretende aplicar estos procesos en producción industriales de alguna sustancia de interés [56, 57, 58, 59]. Adicionalmente las materias primas utilizadas para el crecimiento y desarrollo de los hongos de pudrición blanca son bastante heterogéneas, compuestas principalmente del complejo lignocelulósico.

Los hongos basidiomicetos como *T. versicolor* contienen quitina en su pared celular. Debido a que en los procesos de fermentación en estado sólido no es posible determinar directamente la cantidad de biomasa, se determinó el contenido de quitina a través de la cuantificación de N-acetil-D-glucosamina (NAGA) en todos los tiempos de la fermentación. Además, se le determinó el contenido de NAGA al micelio seco de *T. Versicolor* obtenido a partir del cultivo líquido, obteniendo como resultado 12,05% (p/p). Estos porcentajes de NAGA fueron utilizados para calcular la cantidad de biomasa de los sustratos sólidos en cada uno de los tiempos de fermentación; los datos de biomasa así obtenidos fueron reemplazados para la determinación de los parámetros de la ecuación (1). En la Tabla 4 se relacionan los valores de los parámetros del modelo cinético, así como las concentraciones iniciales respectivas.

En la Figura 6 se representan las curvas calculadas por el modelo matemático para el crecimiento celular de la biomasa junto con el perfil en el tiempo de los azúcares reductores, así como los datos experimentales correspondientes. Como se puede observar, el ajuste de los datos es aceptable ya que las curvas del modelo reflejan la tendencia del comportamiento de los datos experimentales. Se debe tener en cuenta que el modelo describe la producción y consumo de los azúcares reductores como una sustancia intermedia del proceso de fermentación en estado

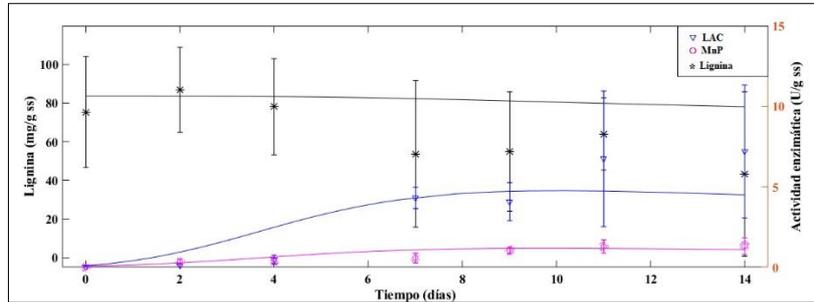
sólido. En la Figura 7 se presentan las curvas calculadas por el modelo matemático para la degradación de lignina y producción de las correspondientes enzimas ligninolíticas (LAC y MnP), así como los datos experimentales respectivos. El ajuste de los datos fue completamente satisfactorio para MnP y lignina y satisfactorio para lacasa. Finalmente, en la Figura 8 se describe la producción de ENX y el consumo de hemicelulosa durante la fermentación en estado sólido con *T. versicolor*. El ajuste de los datos de la hemicelulosa fue completamente satisfactorio. Sin embargo, la curva calculada por el modelo matemático para ENX no obtuvo un ajuste satisfactorio con respecto a los datos experimentales correspondientes a esta enzima. Evidentemente, la expresión planteada para el comportamiento de la actividad ENX no logró describir de manera aceptable la tendencia de los datos experimentales, por lo que se debe mejorar a fin de alcanzar el ajuste de los datos para esta enzima; esta labor se abordará en un trabajo futuro. Por otro lado, el tiempo de fermentación para este estudio es relativamente corto comparado con otros trabajos donde se empleó *T. versicolor* cultivado sobre residuos agroindustriales para la producción de enzimas lignocelulolíticas. El modelo matemático propuesto en esta investigación fue probado para las ocho formulaciones cultivadas en estado sólido con *T. versicolor*, lo que le confiere suficiente validez, en términos generales, a la representación de los datos experimentales por el modelo matemático propuesto.

Figura 6. Perfil en el tiempo de la producción de biomasa y azúcares reductores para *T. versicolor* cultivado en la formulación F7. Las curvas continuas fueron calculadas por el modelo seleccionado



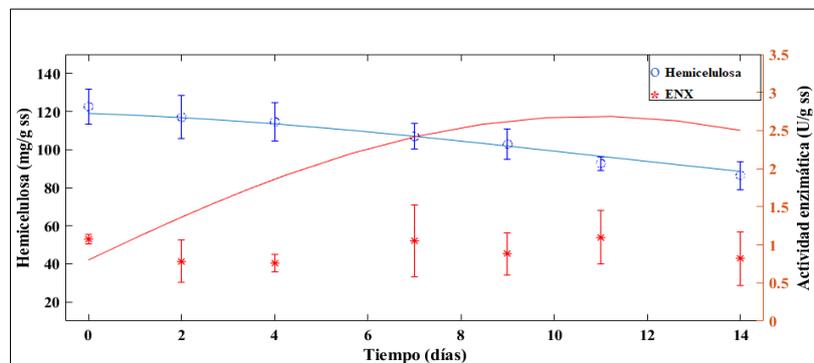
Fuente: Elaboración propia

Figura 7. Perfil en el tiempo de la producción de MnP y lacasa y de la degradación de lignina para *T. versicolor* cultivado en la formulación F7. Las curvas continuas fueron calculadas por el modelo seleccionado



Fuente: Elaboración propia

Figura 8. Perfil en el tiempo de la producción de endoxilanasas y del consumo de hemicelulosa para *T. versicolor* cultivado en la formulación F7. Las curvas continuas fueron calculadas por el modelo seleccionado



Fuente: Elaboración propia

Aunque existen numerosas investigaciones previas acerca de la producción de actividades enzimáticas lignocelulolíticas por diversos hongos de pudrición blanca, la degradación de materiales lignocelulósicos y la formación de productos intermedios en procesos de fermentación en fase sólida [60, 61, 62, 63, 64] se requiere todavía mayor información sobre las cinéticas de formación de biomasa, producción de enzimas, consumo de nutrientes y degradación de la lignina que permitan la descripción del proceso global y posterior escalado para la obtención de los productos de interés comercial como los que se plantean en este estudio. En la literatura disponible sobre procesos de fermentación en estado sólido con macromicetos de pudrición blanca para la degradación o consumo de las componentes de la biomasa lignocelulósica (celulosa, hemicelulosa y lignina) y la producción de enzimas lignocelulolíticas, no se logró encontrar la aplicación o el planteamiento de modelos matemáticos que intenten describir estos complejos fenómenos,

por lo que los resultados del análisis cinético mediante la descripción matemática propuesta en el presente trabajo y en el artículo previo [6] representan una novedad en la descripción de este tipo de procesos. Para futuras trabajos, es necesario incluir compuestos intermediarios que son producidos y consumidos durante las diferentes etapas del proceso de fermentación, los cuales juegan un rol muy importante en los procesos metabólicos. Asimismo, se deben considerar factores del proceso de fermentación en estado sólido como la remoción de calor, la transferencia de masa y la tasa de aireación, los cuales tienen un grado de incidencia importante en la posible síntesis e inducción de enzimas con interés industrial.

Tabla 3. Modelo matemático para la descripción de formación de biomasa fúngica, azúcares reductores, enzimas ligninolíticas y xilanas, consumo de hemicelulosa y degradación de lignina

Ecuación	Número	Descripción
$\frac{dC_b}{dt} = \mu_m \cdot C_b \left[1 - \left(\frac{C_b}{C_{bm}} \right)^n \right]$	(1)	Biomasa (C_b)
$\frac{dC_{AR}}{dt} = q_p \cdot \mu_m \cdot \frac{dC_b}{dt} \cdot \left[1 - (n+1) \cdot \left(\frac{C_b}{C_{bm}} \right)^n \right]$	(2)	Azúcares reductores (AR)
$\frac{dC_L}{dt} = -k_L \cdot C_{LAC} \cdot C_{MnP}$	(3)	Lignina (L)
$\frac{dC_{LAC}}{dt} = k_{LAC} \cdot \frac{dC_b}{dt} \cdot C_L - \mu_{LAC} \cdot C_L$	(4)	Lacasa (LAC)
$\frac{dC_{MnP}}{dt} = k_{MnP} \cdot \frac{dC_b}{dt} \cdot C_L - \mu_{MnP} \cdot C_L$	(5)	Manganeso peroxidasa (MnP)
$\frac{dC_{HM}}{dt} = -k_{HM} \cdot C_{ENX}$	(6)	Hemicelulosa (HM)
$\frac{dC_{ENX}}{dt} = k_{ENX} \cdot C_{HM} \cdot \frac{dC_b}{dt} - \mu_{ENX} \cdot C_{AR}$	(7)	Endoxilanas (ENX)

Fuente: Elaboración propia

Tabla 4. Parámetros del modelo matemático presentado en la Tabla 3

Parámetros	Descripción	Valor
μ_m	Velocidad específica de crecimiento de la biomasa, en día ⁻¹	1,3287
C_{bm}	Concentración de biomasa máxima, en mg/g ss	160,99
n	$n < 1$, el organismo es relativamente sensible a la auto-inhibición y ésta ocurre para valores muy bajos de C_b $n = 1$, ecuación logística	0,8199

	$n > 1$, el organismo es relativamente resistente a la auto-inhibición y esto ocurre solo cuando $C_b \approx C_{bm}$	
C_{b0}	Concentración de biomasa, en mg/g ss	50,555
q_p	Coeficiente de producción de azúcares reductores, en mg×día/mg	0,1946
C_{AR0}	Concentración inicial de azúcares reductores, en mg/g ss	2,000
k_L	Coeficiente de degradación de lignina, en mg×g ss/(día×U ²)	0,70
k_{LAC}	Coeficiente de producción de lacasa, en U×g ss/(mg×mg)	0,0090
μ_{LAC}	Coeficiente de inhibición para lacasa, en U/(mg×día)	0,0086
k_{MnP}	Coeficiente de producción de MnP, en U×g ss/(mg×mg)	0,000118
μ_{MnP}	Coeficiente de inhibición para MnP, en U/(mg×día)	0,0011
C_{L0}	Concentración inicial de lignina, en mg/g ss	70,01
C_{LAC0}	Actividad inicial de lacasa, en U/g ss	0,95
C_{MnPO}	Actividad inicial de MnP, en U/g ss	0,62
k_{HM}	Coeficiente de consumo de hemicelulosa, en mg/día×U	1,1886
k_{ENX}	Coeficiente de producción de endoxilanasas, en U×g ss/(mg×mg)	0,002451
μ_{ENX}	Coeficiente de inhibición para endoxilanasas, en U/(mg×día)	0,03563
C_{HM0}	Concentración inicial de hemicelulosa, en mg/g ss	130,526
C_{ENX0}	Actividad inicial de endoxilanasas, en U/g ss	0,50

Fuente: Elaboración propia

Conclusiones

Los niveles independientes de las sales de manganeso y cobre que favorecieron la producción de enzimas ligninolíticas fueron: 0,08% CuSO₄ para la producción de manganeso peroxidasa y 0,1% MnSO₄ para la producción de lacasa. Aunque los resultados obtenidos en este trabajo permitieron conocer la alta influencia que la participación independiente de los metales tiene sobre la producción de enzimas ligninolíticas, se pudo demostrar que el efecto inductor que ejercen los metales sobre la síntesis de enzimas ligninolíticas se ve potenciado con la interacción entre las sales de sulfato de manganeso (II) y cobre (II) con el carbonato de calcio dentro de los rangos de concentraciones evaluados. No obstante, se determinó que la interacción de los niveles más altos de CuSO₄, MnSO₄ y CaCO₃ no representan un efecto inductor importante sobre la síntesis de LAC y MnP, por lo que se deben continuar los estudios enfocados a la determinación de las concentraciones óptimas que maximicen cada una de estas actividades en el caso del hongo *T. versicolor*. En este sentido, este trabajo ofrece importantes datos de partida en la búsqueda de un medio de cultivo óptimo suplementado con sales de cobre, manganeso y calcio. Se destaca la importancia de adicionar al medio de cultivo CaCO₃ para aumentar la producción de MnP y LAC en los cultivos en estado sólido con este hongo. La adición del carbonato de calcio favoreció la producción de títulos enzimáticos altos en ambas enzimas ligninolíticas. En particular, se identificó un posible efecto estimulante en la producción de ligninasas cuando se adiciona carbonato de calcio con al menos un nivel alto de algunas de las dos sales estudiadas de manganeso o de cobre, ya que esta interacción permite disminuir el tiempo de producción de enzimas en comparación con el medio

sin adición de sales donde los títulos enzimáticos más altos se alcanzan en los dos últimos días de cultivo. Las actividades enzimáticas obtenidas para ENX han sugerido que la adición de las sales de sulfato de cobre y sulfato de manganeso y su interacción con carbonato de calcio no ejercen un rol importante en la producción de esta enzima.

Con respecto a la degradación de lignina y el consumo de hemicelulosa, la fermentación del medio F7 permitió alcanzar una mayor degradación parcial de estos polímeros (42,5% y 32,5%, respectivamente). Se infiere que las altas actividades enzimáticas oxidativas (ligninolíticas) obtenidas durante los 14 días de fermentación con la formulación F7 sustentan el porcentaje de degradación de la lignina, teniendo en cuenta que *T. versicolor* es uno de los basidiomicetos con mayor efectividad en la degradación de este polímero. No obstante, determinar productos intermedios originados por la acción de las enzimas medidas, u otras enzimas no evaluadas y sus productos, contribuiría a una interpretación más elaborada de los complejos fenómenos que ocurren durante el crecimiento de los macromicetos como *T. versicolor* en los sustratos lignocelulósicos. Por lo tanto, en futuros estudios se recomienda determinar la dinámica de producción de una mayor cantidad de enzimas lignocelulolíticas producidas por el hongo evaluado, así como de los posibles inhibidores que puedan generarse durante el proceso cuando se suplementan los medios sólidos en los que crece *T. versicolor* con sales de cobre, manganeso y carbonato de calcio.

Finalmente, el modelo matemático aplicado en este trabajo mostró un ajuste satisfactorio en términos generales de los datos experimentales que describen los procesos de cultivo de *T. versicolor* con materiales lignocelulósicos por fermentación en estado sólido. Este modelo tiene el potencial de brindar información valiosa para el desarrollo de futuros paquetes tecnológicos para la producción de enzimas lignocelulolíticas con hongos de podredumbre blanca.

Referencias bibliográficas

1. G. Saratale, R. Saratal, S. Ghodake, Y. Jiang, J. Change, H.-S. Shin, et al., "Solid state fermentative lignocellulolytic enzymes production, characterization and its application in the saccharification of rice waste biomass for ethanol production: An integrated biotechnological approach", *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, vol. 76, pp. 51-58, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.03.027>
2. F. Gassara-Chatti, S. Brar, C. M. Ajila, M. Verma, R. D. Tyagi, and J. R. Valero, "Encapsulation of ligninolytic enzymes and its application in clarification of juice", *Food Chemistry*, vol. 137, pp. 18-24, 2013. DOI: [10.1016/j.foodchem.2012.09.083](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.083)

3. S. Fatemeh, S. Reihani, and D. Kianoush, "Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: A review", *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 37, pp. 34–40, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.11.005>
4. B. Chang and Y. Chang, "Biodegradation of toxic chemicals by *Pleurotus eryngii* in submerged fermentation and solid-state fermentation", *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, vol. 49, pp. 175-181, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2014.04.012>
5. M. Alcalde, "Engineering the ligninolytic enzyme consortium", *Trends in Biotechnology*, vol. 33, pp. 155-162, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.12.007>
6. S. Montoya, Ó. Sánchez, and L. Levin, "Production of lignocellulolytic enzymes from three white-rot fungi by solid-state fermentation and mathematical modeling", *African Journal of Biotechnology*, vol. 14, pp. 1304-1317, 2015. DOI: 10.5897/AJB2014.14331
7. G. Borges, J. Agnezia, L. Bastos, L. Borchardt, T. Shimosakai, P. Waldir, et al., "Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 17, pp. 1–6, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.10.019>
8. M. Fonseca, M. Tejerina, S. S, A. Afanasiuk, E. Giorgio, M. Barchuk, et al., "Preliminary studies of new strains of *Trametes* sp. from Argentina for laccase production ability", *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 47, pp. 287–297, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.002>
9. A. Knežević, M. Stajić, J. Vukojević, and I. Milovanović, "The effect of trace elements on wheat straw degradation by *Trametes gibbosa*", *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 96, pp. 152-156, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.10.004>
10. S. Montoya, C. Orrego, and L. Levin, "Growth, fruiting and lignocellulolytic enzyme production by the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake)", *World Journal Microbiol Biotechnol*, vol. 28, pp. 1533-1541, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-011-0957-2>
11. D. Paz and M. Hernández, "Purificación y caracterización parcial de la enzima xilanasa a partir del preprado comercial Novoban 240", *Cultivos Tropicales*, vol. 21, pp. 27-31, 2000. DOI: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215024005>
12. S. Banakar and B. Thippeswamy, "Isolation and partial purification of fungal ligninolytic enzymes from the forest soil fungi isolated from

- Bhadra Wildlife Sanctuary", *Frontiers in Biology*, vol. 9, pp. 291-299, 2014. DOI: 10.1007/s11515-014-1319-x
13. W.-H. Chen and P.-C. Kuo, "Torrefaction and co-torrefaction characterization of hemicellulose, cellulose and lignin as well as torrefaction of some basic constituents in biomass", *Energy*, vol. 36, pp. 803-811, 2011. DOI: 10.1016/j.energy.2010.12.036
 14. G. Dávila and R. Vázquez, "Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales", *Mensaje Bioquímico*, vol. 30, pp. 29-55, 2006. DOI: <https://www.researchgate.net/publication/259781277>
 15. M. Fonseca, E. Shimizu, P. Zapata, and L. Levin "Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina)", *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 46, pp. 534–539, 2010. DOI: 10.1016 / j.enzmictec.2009.12.017
 16. P. Lew, B. Yao, and J. Yun, "Lignin biodegradation with laccase-mediator systems", *Frontiers in Energy Research*, vol. 2, pp. 1-13, 2014. DOI: 10.3389/fenrg.2014.00012
 17. P. Zucca, A. Rescigno, A. Olianias, S. Maccioni, F. Solla, and E. Sanjust, "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*, vol. 68, pp. 216–222, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.008>
 18. D. Mate and M. Alcalde, "Laccase engineering: From rational design to directed evolution", *Biotechnology Advances*, vol. 33, pp. 25-40, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.007>
 19. T. Senthivelan, J. Kanagaraj, and R. Panda, "Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: An eco-friendly approach - A review", *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 21, pp. 19-38, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12257-015-0278-7>
 20. L. Levin, E. Malignani, and A. Ramos, "Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates", *Bioresource Technology*, vol. 101, pp. 4554–4563, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.102>
 21. L. Munk, M. Andersen, and A. Meyera, "Influence of mediators on laccase catalyzed radical formation in lignin", *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 116, pp. 48-56, 2018. DOI: 10.1016 / j.enzmictec.2018.05.009
 22. H. Patel, A. Gupte, and S. Gupte, "Effect of different culture conditions and inducers on production of laccases by a basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid

- state fermentation", *BioResources*, vol. 4, pp. 268-284, 2009. DOI: <http://ncsu.edu/bioresources>
23. B. Song, J. Ye, F. Sossah, C. Li, D. Li, L. Meng, et al., "Assessing the effects of different agro-residue as substrates on growth cycle and yield of *Grifola frondosa* and statistical optimization of substrate components using simplex-lattice design", *AMB Express*, vol. 8, pp. 46-57, March 23 2018. DOI: 0.1186 / s13568-018-0565-8.
 24. P. Sangsurasak, M. Nopharatana, and D. Mitchell, "Mathematical modeling of the growth of filamentous fungi in solid-state fermentation", *Journal Science Industrial Resources*, vol. 55, pp. 333-342, 1996. DOI: 10.1007 / 10_2014_299.
 25. G. Viccini, D. Mitchell, S. Boit, J. Gern, A. Da Rosa, and R. Costa, "Analysis of growth kinetic profiles in solid-state fermentation", *Food Technology and Biotechnology Advances*, vol. 39, pp. 271-294, 2001. DOI: 579.24:57.037:582.28
 26. A. Paszczyński and R. L. Crawford, "Degradation of azo compounds by ligninases from *Phanerochaete chrysosporium* Involment of veratryl alcohol", *Biochemistry Biophysic*, vol. 178, pp. 1056-1063, 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)90999-N](https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)90999-N)
 27. A. Paszczyński, E. M. Cadena, and V. B. Huyn, "Manganese peroxidase of *Phanerochaete Chrysosporium*: purification", *Methods enzymol*, vol. 161, pp. 264-270, 1988
 28. N. J. Nelson, " A photometric adaptation of the Somogyi method for the detrmination of glucose", *Journal Biochemistry*, vol. 153, pp. 375-380, 1944. DOI: <http://www.jbc.org/>
 29. G. L. Miller, "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Analytical Chemistry*, vol. 31, pp. 426-428, 1959. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
 30. C. Plassard, D. Mousain, and L. Salsac, "Estimation of mycelial growth of basidiomycetes by means of chitin determination", *Phyfochemistry*, vol. 21, pp. 345-348, 1982. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)95263-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)95263-4)
 31. P. Leterme and F. Estrada, "Análisis de alimentos y forrajes protocolos de laboratorio," Universidad Nacional de Colombia sede Palmira2010.
 32. S. Ozcirak and U. Ozturk, "Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*", *Annals of Agrarian Science*, vol. 15, pp. 273-277, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aasci.2017.04.003>

33. W. Schneidera, R. Fontana, S. Mendonçab, F. Gonçalves, A. Pinheiro, and M. Camassola, "High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources", *Process Biochemistry*, vol. 69, pp. 1-11, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.03.005>
34. M. Makela, T. Lundel, L. Hattaka, and K. Hild, "Effect of copper, nutrient nitrogen, and wood-supplement on the production of lignin-modifying enzymes by the white-rot fungus *Phlebia radiata*", *Fungal Biology*, vol. 117, pp. 62-70, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.11.006>
35. C. Lu, L. Chao, and R. Liu, "Effect of common metal ions on the rate of degradation of 4-nitrophenol by a laccase-Cu²⁺ synergistic system", *Journal of Environmental Management*, vol. 113, pp. 1-6, 2012. DOI: [10.1016 / j.jenvman.2012.08.023](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.08.023)
36. C. Feng, G. Zeng, D. Huang, S. Hu, M. Zhao, C. Lai, et al., "Effect of ligninolytic enzymes on lignin degradation and carbon utilization during lignocellulosic waste composting", *Process Biochemistry*, vol. 46, pp. 1515-1520, 2011. DOI: [10.1016/j.procbio.2011.01.038](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.038)
37. H. Meehnian, A. Jana, and M. Jana, "Effect of particle size, moisture content, and supplements on selective pretreatment of cotton stalks by *Daedalea flavida* and enzymatic saccharification", *Biotech*, vol. 6, pp. 235-248, 2016. DOI: [10.1007/s13205-016-0548-x](https://doi.org/10.1007/s13205-016-0548-x)
38. D. Knop, J. Ben-Ari, T. Salame, D. Levinson, O. Yarden, and Y. Hadar, "Mn²⁺ deficiency reveals a key role for the *Pleurotus ostreatus* versatile peroxidase (VP4) in oxidation of aromatic compounds", *Applied Microbiology Biotechnology*, vol. 98, pp. 6795–6804, 2014. DOI: [10.1007 / s00253-014-5689-4](https://doi.org/10.1007 / s00253-014-5689-4)
39. X. Fujian and L. Zuohu, "Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate", *Bioresource Technology*, vol. 80, pp. 149-151, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00082-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00082-7)
40. D. Gurpreet, K. Surinder, K. Satinder, and V. Mausam, "Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation", *Industrial Crops and Products*, vol. 38, pp. 6-13, 2012. DOI: [10.1016/j.indcrop.2011.12.036](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.036)
41. S. Wang, Q. Chen, M. Zhu, F. Xue, W. Li, T. Zhao, et al., "An extracellular yellow laccase from white rot fungus *Trametes* sp. F1635 and its mediator systems for dye decolorization", *Biochimie*,

vol. 148, pp. 46-54, 2018/05/01/ 2018. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.02.015>

42. D. Daâssi, H. Zouari-Mechichi, A. Prieto, M. Martínez, M. Nasri, and T. Mechichi, "Purification and biochemical characterization of a new alkali-stable laccase from *Trametes* sp. isolated in Tunisia: role of the enzyme in olive mill waste water treatment", *World Microbiol Biotechnol*, vol. 29, pp. 2145-2155, 2013. DOI: 10.1007 / s11274-013-1380-7
43. J. Yan, J. Niu, D. Chen, Y. Chen, and C. Irbis, "Screening of *Trametes* strains for efficient decolorization of malachite green at high temperatures and ionic concentrations", *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 87, pp. 109-115, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.11.009>
44. J. S. Kerovuo, S. Haremza, O. Koch, T. Habicher, D. Robertson, G. Desantis, *et al.*, "Laccases for pulp bio-bleaching", Canada 2661882. Patent, 2015.
45. V. Faraco, P. Giardina, and G. Sannia, "Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters", *Microbiology*, vol. 149, pp. 2155–2162, 2003
46. S. Afreen, R. Anwer, R. K. Singh, and T. Fatma, "Extracellular laccase production and its optimization from *Arthrospira maxima* catalyzed decolorization of synthetic dyes", *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 25, pp. 1446-1453, 2018/11/01/ 2018. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.015>
47. W. S. Hernández, C. Caudillo, P. Salazar, and K. Macías, "Influence of iron and copper on the activity of laccases in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*", *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 49, pp. 269-275, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.002>
48. S. Afreen, R. Anwer, R. Singh, and T. Fatma, "Extracellular laccase production and its optimization from *Arthrospira maxima* catalyzed decolorization of synthetic dyes", *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 25, pp. 1446-1453, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.015>
49. V. Shaha, P. Dobiášová, P. Baldrianb, F. Nerud, A. Kumar, and S. Seal, "Influence of iron and copper nanoparticle powder on the production of lignocellulose degrading enzymes in the fungus *Trametes versicolor*", *Journal of Hazardous Materials*, vol. 178, pp. 1141–1145, 2010. DOI: 10.1016 / j.jhazmat.2010.01.141
50. F. Kuhara and P. Papinutti, "Optimization of laccase production by two strains of *Ganoderma lucidum* using phenolic and metallic

- inducers", *Revista Argentina de Microbiología*, vol. 46 (2), pp. 144-149, 2014. DOI: 10.1016 / S0325-7541 (14) 70063-X
51. N. Paganini, J. Pereira, E. Gomes, R. Da Silva, A. Araújo, H. Ferreira, et al., "Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse", *Industrial Crops and Products*, vol. 122, pp. 66–75, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.022>
52. N. Casas, P. Blánquez, and V. Sarrà, "Mathematical model for dye decoloration and laccase production by *Trametes versicolor* in fluidized bioreactor", *Biochemical Engineering Journal*, vol. 80, pp. 45–52, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.09.010>
53. C. Perez, F. Casciadori, and J. Thoméo, "Strategies for scaling-up packed-bed bioreactors for solid-state fermentation: The case of cellulolytic enzymes production by a thermophilic fungus", *Chemical Engineering Journal*, vol. 361, pp. 1142-1151, 2019/04/01/ 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.12.169>
54. D. Mitchell, O. Von, and N. Krieger, "Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors", *Biochemical Engineering Journal*, vol. 13, pp. 137-147, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00126-2](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00126-2)
55. R. P. Tengerdy and G. Szakacs, "Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation", *Biochemical Engineering Journal*, vol. 13, pp. 169-179, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00129-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00129-8)
56. P. R. Moreira, E. Almeida, F. Malcata, and J. Cardoso, "Lignin transformation by a versatile peroxidase from a novel *Bjerkandera* sp. strain", *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 59, pp. 234-238, 2007. DOI: 10.1016/j.ibiod.2006.11.002
57. M. Pal, A. Calvo, M. Terron, and A. E. Gonzalez, "Solid-state fermentation of sugarcane bagasse with *Flammulina velutipes* and *Trametes versicolor*", *World Journal Microbiology Biotechnology*, vol. 11, pp. 541-545, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00286370>
58. A. Pandey, C. Soccol, and D. Mitchell, "New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products", *Process Biochemistry*, vol. 35, pp. 1153–1169, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7)
59. A. Sarikaya and M. Ladisch, "An Unstructured Mathematical Model for Growth of *Pleurotus ostreatus* on Lignocellulosic Material in Solid-State Fermentation Systems", *Applied Biochemistry and*

Biotechnology, vol. 62, pp. 72-85, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02787985>

60. M. Meagher, B. Tao, J. Chow, and P. Reilly, "Kinetics and subsite mapping of β -D-xylobiose and D-xylose producing *Aspergillus niger* endo- β -1,4-D-xylanase", *Carbohydrates Resources*, vol. 173, pp. 273-283, 1988
61. D. A. Mitchell, O. F. Von meien, N. Krieger, and F. D. Dalsenter, "A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation", *Biochemical Engineering Journal*, vol. 17, pp. 15-26, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00120-7](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00120-7)
62. L. Levin, C. Herrmann, and V. Papinutti, "Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology", *Biochemical Engineering Journal*, vol. 39, pp. 207-214, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.09.004>
63. J. Arciniégas, M. Camacho, E. Duarte y A. Naranjo, "Medición del desempeño de la red de suministros de medicamentos en un hospital público de tercer nivel en la ciudad de Bogotá, a través del cuadro de mando integral", *Ingeniare*, vol. 12, n°, 20, pp. 75-90, 2016
64. L. Levin, M. Carabajal, M. Hofrichter, and R. Ullrich, "Degradation of 4-nitrophenol by the white-rot polypore *Trametes versicolor*", *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 107, pp. 174-179, 2016