

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y AGENTES
INDUCTORES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LACASAS**

YENNY ANDREA ZAPATA MARIN

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

ESCUELA DE INGENIERÍAS

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

TESIS DE GRADO

MEDELLÍN

2013

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y AGENTES
INDUCTORES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LACASAS**

YENNY ANDREA ZAPATA MARIN

Tesis de grado para optar al título de ingeniero químico

Director

MABEL MILENA TORRES TABORDA

Magister en biotecnología

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

ESCUELA DE INGENIERÍAS

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

TESIS DE GRADO

MEDELLÍN

2013

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Medellín, Agosto de 2013

DEDICATORIA

A Dios,

A mi madre y familia.

AGRADECIMIENTOS

El autor de este trabajo expresa sus más sentidos agradecimientos a:

A mi madre Nora Elena Marin por su amor y apoyo incondicional, por el esfuerzo y la determinación. Por estar siempre.

La magister en biotecnología Mabel Milena Torres por su apoyo y colaboración durante este proceso, debo destacar su disponibilidad y paciencia como factor fundamental que permitió la culminación de este trabajo.

La Universidad tecnológica del Chocó, en nombre de Mabel Torres por su colaboración en el cultivo del microorganismo.

Al centro de investigación CIBIOT por el apoyo en esta investigación.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

A mi familia y amigos por su apoyo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	10
1. MARCO TEÓRICO	14
1.1 LACASAS	14
1.1.1. Descripción	14
1.1.2. MECANISMO	15
1.1.3. APLICACIONES	16
1.2 HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA	18
1.2.1 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	19
1.3 PRODUCCIÓN DE LACASAS	21
1.3.1 Fermentación en estado sólido	22
1.3.2 Fuente De Nitrógeno	23
1.3.3 Inductores	24
1.3.4 Biorreactores	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1. MICROORGANISMO	27
4.2. SUSTRATO	27
4.3. FERMENTACIÓN	27
4.4. EXTRACCIÓN	29
4.5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	30
4.6. ENSAYO EN UN BIORREACTOR DE COLUMNA	30
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS	31

5.1.	CARACTERIZACIÓN DEL SUSTRATO	31
5.2.	CRECIMIENTO DE PYCNOPORUS SANGUINEUS	32
5.3.	FERMENTACIONES	33
5.3.1	Ensayos preliminares	33
5.3.2	Diseño de experimentos	37
5.4.	PRODUCCIÓN DE LACASA EN UN BIORREACTOR DE COLUMNA	46
6.	CONCLUSIONES	50
7.	RECOMENDACIONES	51
8.	BIBLIOGRAFÍA	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de la mecánica de las reacciones catalizadas por las lacasas en ausencia (a) y en presencia (b) y (c) de mediadores químicos (Riva, 2006). ...	16
Figura 2 <i>Pycnoporus sanguineus</i> tomada del centro de ciencias biológicas UFSC	21
Figura 3 Comparación de la colonización de <i>Pycnoporus sanguineus</i> en aserrín para los ensayos A, B, C y D	34
Figura 4 Actividad lacasa. A,B,C y D son los ensayos preliminares. A, Sln de sales; B, Sln de sales +Ext.Lev; C, Sln de sales +Ext.Lev+CuSO ₄ y D , Sln de sales +Ext.Lev+EtOH.....	35
Figura 5 Gráfico de Pareto Actividad lacasa.	39
Figura 6 Comparación entre los datos predichos y los calculados	42
Figura 7 Superficie de respuesta estimada	43
Figura 8 Actividad vs % extracto de levadura	44
Figura 9 Actividad vs CuSO ₄	45
Figura 10 Biorreactor de columna. a, exterior; b, estructura interna.	47
Figura 11 Canastas interiores biorreactor a los 15 días de fermentación.....	48

RESUMEN

En esta investigación se realizaron fermentaciones en estado sólido durante once días, utilizando *Pycnoporus sanguineus* como microorganismo y aserrín como sustrato. Se evaluó la producción de lacasa con la presencia o ausencia de extracto de levadura, así como con dos inductores, etanol y sulfato de cobre; posteriormente se evaluó el efecto de la concentración de extracto de levadura y CuSO_4 en la producción de la enzima. De los 2 inductores evaluados se encontró que el sulfato de cobre presentó los mejores resultados. Se determinó que el sulfato de cobre a una concentración mayor a 0,2mM disminuye la producción de lacasa, mientras que el extracto de levadura la aumenta.

Las condiciones que permitieron obtener una máxima actividad de lacasa de 0.806 U/l para los intervalos evaluados en este experimento fueron: concentración de extracto de levadura 1,7% y concentración de CuSO_4 0,2mM.

PALABRAS CLAVES: LACASAS, PYCNOPORUS SANGUINEUS, FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO, INDUCTOR.

INTRODUCCIÓN

El mercado enzimático ha tenido un crecimiento considerable en los últimos años, en el 2010, según la BCC, por sus siglas en inglés (Business Communications Company), el mercado se valoraba en \$ 3,1 mil millones de dólares. La BCC proyecta que este mercado crezca a una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR, por sus siglas en inglés) del 9,1% hasta alcanzar los \$ 6 mil millones para el año 2016 (Dewan, 2011). Lo que indica que el mercado mundial de enzimas industriales ha sido prácticamente inmune a las recientes variaciones en la economía global y ha tenido un crecimiento moderado (Global Industry Analysts, Inc., 2011).

Algunos factores que impulsan el crecimiento del mercado son las nuevas tecnologías enzimáticas que buscan mejorar la productividad y reducir los costos de producción, y el creciente interés de los consumidores en la sustitución de productos petroquímicos con otros compuestos orgánicos, como las enzimas. Empresas de los sectores textiles, productores de piensos, fabricantes de detergentes, las compañías farmacéuticas y fabricantes de cosméticos se han convertido en los principales consumidores de estas biomoléculas (Global Industry Analysts, Inc., 2011). Las enzimas provenientes de hongos en particular, son de interés en procesos biotecnológicos.

Entre las principales enzimas fúngicas se encuentran las lignolíticas como la lignina peroxidasa (LiP), manganeso-peroxidasa (MnP) y las lacasas; estas últimas han sido consideradas como las enzimas más importantes de este grupo enzimático (Liu, y otros, 2009) ya que pueden oxidar dímeros fenólicos de la lignina, mediante el uso de intermediarios naturales, como el fenol y el ácido 4-hidroxibenzoico o intermediarios sintéticos y pueden oxidar compuestos de la lignina que no son oxidados por la LiP (Litthauer, Van Vuuren, Van Tonder, &

Wolfaardt, 2007). Esto lleva a que los estudios sobre microorganismos productores de lacasas se hayan intensificado en los últimos años (K.N. Niladevi, 2009). La obtención de lacasas está relacionada con los hongos de pudrición blanca de la madera como el *Pycnoporus sanguineus*. Este hongo crece generalmente sobre madera latifoliada (Ulloa & Herrera, 1994), además de otros compuestos lignolíticos que provienen de la agroindustria tales como granos o subproductos de granos. La utilización de este tipo de residuos agroindustriales resulta muy útil pues disminuye los costos de obtención de sustrato y elimina un problema ambiental causado por la disposición de estos residuos sólidos (Rosales, Rodríguez Couto, & Sanroman, 2002).

La participación de la lacasa en el mercado enzimático se da en los tres sectores de éste; alimentos y bebidas, técnicas y otras. Su potencial biotecnológico y expectativas de mercado, se deben a su especificidad de acción en los diversos campos de las aplicaciones industriales (Loera, Pérez, Barbosa, & Villaseñor, 2006). En Colombia la producción de esta enzima no se realiza industrialmente lo que implica la importación de ésta de países como Estados Unidos, incrementando su costo comercial. En el mercado un gramo de lacasa puede oscilar entre 80 USD y 210 USD de acuerdo al microorganismo productor y a la actividad que presente. Casas comerciales como Sigma-Aldrich reportan valores para un gramo de lacasa obtenida a partir de *Pleurotus ostreatus* de 209.50 USD con una actividad mayor a 4 U/mg, mientras que a partir de *Trametes versicolor* oscila entre 87.30 USD y 100.50 USD siendo la primera de una actividad mayor a 0.5 U/mg y la segunda de una actividad mayor a 10 U/mg (Sigma).

Las lacasas pueden emplearse en la oxidación de compuestos fenólicos presentes en los tintes y en presencia de sistemas mediadores (2,6 dimetoxifenol, vanilina), también podrían oxidar compuestos no fenólicos (Osma cruz, 2009). Además las lacasas tienen otras aplicaciones en la industria textil, como la tintura de lanas, blanqueamiento de algodón, terminado del Denim. Y en otros sectores

económicos como la industria papelera para el bio-blanqueamiento de pulpas de papel, desintoxicación de sustancias recalcitrantes (Papinutti, Diorio, & Forchiassin, 2003); la industria de alimentos, en la modificación del color de bebidas y alimentos, descontaminación de aguas, bio-remediación de aceites; la industria química en la síntesis de algunos productos (Rodríguez Couto & Toca Herrera, 2006), en la desintoxicación de xenobióticos, fabricación de detergentes y la transformación de antibióticos y esteroides, entre otros (Loera, Pérez, Barbosa, & Villaseñor, 2006). Lo que fundamenta la investigación en el campo de la producción y la optimización de la enzima lacasa en Colombia, puesto que estas industrias pertenecen al campo de acción de la economía del país.

Al realizar una fermentación es importante determinar los parámetros en los cuales la lacasa tenga su mayor actividad, y debido a que la actividad enzimática de las lacasas depende del tipo de microorganismo utilizado para su producción, el sustrato, la temperatura, el pH, la fuente de nitrógeno, entre otros. Asimismo, la producción de esta puede ser considerablemente estimulada por la presencia de inductores. Se hace necesario encontrar los valores óptimos de los parámetros antes mencionados, para incrementar la actividad de la lacasa. En estudios preliminares utilizando aserrín como sustrato y *Pycnoporus sanguineus* como microorganismo para la producción de lacasas, Moreno determinó algunas de las condiciones de operación de las fermentaciones, tales como pH de 8, humedad del 80% y temperatura ambiente. Para estas condiciones se encontró una actividad enzimática de lacasa de 2.22 U/L cultivando el microorganismo en aserrín (Moreno, 2011)

La producción de lacasa puede ser considerablemente estimulada por la presencia de inductores. Principalmente se pueden encontrar compuestos fenólicos aromáticos o relacionados con la lignina o los derivados de esta, así como algunos alcoholes otra opción es el cobre que aunque es un compuesto no

lignolítico hace parte de la estructura de la enzima (Loera, Pérez, Barbosa, & Villaseñor, 2006).

El objetivo de este trabajo es la evaluación de la incidencia de inductores como el CuSO_4 y el etanol, y de la fuente de nitrógeno extracto de levadura sobre la producción de las lacasas por parte de *Pycnoporus sanguineus* utilizando aserrín como sustrato.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 LACASAS

1.1.1. Descripción

Las Lacasas (bencenediol: oxidorreductasa de oxígeno, EC 1.10.3.2) pertenecen a un grupo de oxidasas de polifenoles (Baldrian, 2006) que contienen 4 átomos de cobre y catalizan la oxidación de un amplio espectro de compuestos fenólicos y sustratos no fenólicos, usando oxígeno molecular como electrón aceptor, el cual es reducido a agua (Ding, 2010).

Esta enzima es una de las pocas enzimas que han sido estudiadas desde finales del siglo XIX. Se encontró por primera vez en los exudados de *Rhus vernicifera*, el árbol de la laca japonesa. Unos años más tarde se encontró también en los hongos. Aunque son conocidas desde hace mucho tiempo, las lacasas, atrajeron una atención considerable sólo después del comienzo de los estudios de degradación enzimática de la madera por medio de los hongos de pudrición blanca (Baldrian, 2006).

Las lacasas pueden ser producidas por plantas superiores, bacterias y hongos. En plantas ha sido encontrada en árboles, nabos, manzanas, espárragos, papas, peras y otros vegetales. En las bacterias en especies como *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lavendulae*, *S. cyaneus*, *Marinomonas mediterranea*, y *Streptomyces psammoticus*. En hongos las lacasas han sido aisladas de ascomicetos, deuteromicetos y basidiomicetos (Niladevi, Sukumaran, & Prema, 2007), (Meza, Lomascolo, Casalot, Sigoillot, & Auria, 2005), (E. Rosales, 2002), (Rodríguez Couto & Sanromán, 2005). Los roles que desempeñan las lacasas en este tipo de microorganismos son: la morfogénesis de cuerpos

fructíferos y la degradación de lignina, convirtiendo compuestos fenólicos en compuestos menos tóxicos (Ding, 2010).

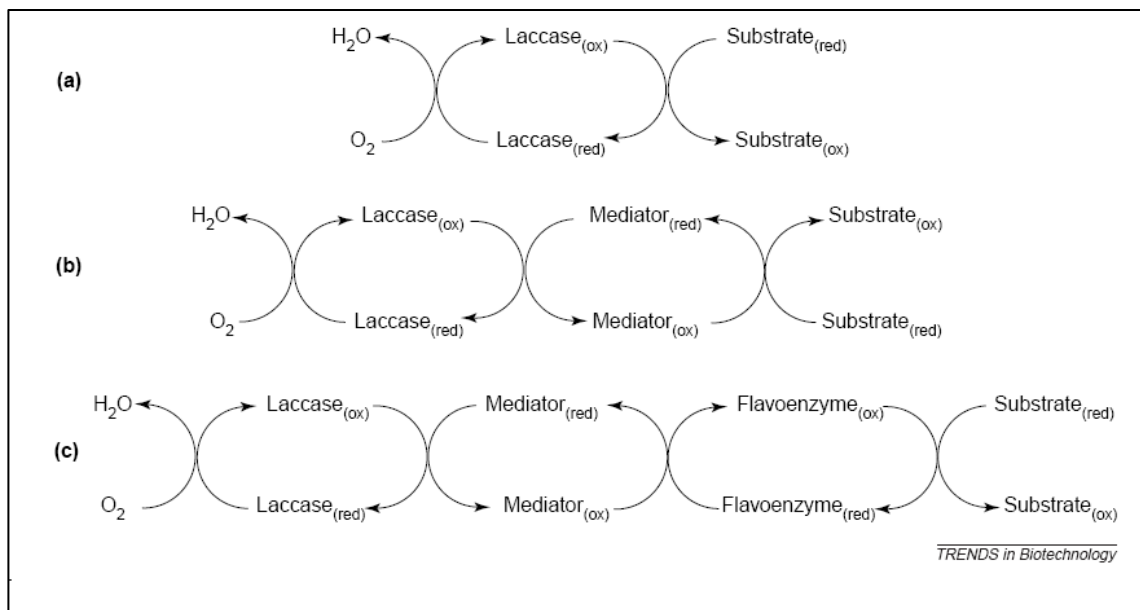
1.1.2. Mecanismo

Las lacasas poseen 4 átomos de cobre (o en algunos casos 3) distribuidos en un dominio mononuclear (T1), que tiene una coordinación trigonal con dos histidinas y una cisteína y otro dominio trinuclear (T2/T3) (Osma Cruz, 2009). Inicialmente el sustrato (lignina o polifenoles) se une al sitio T1 donde el sustrato reductor se enlaza y empieza su reducción monoelectrónica en su correspondiente radical reactivo, estos radicales reactivos pueden producir dímeros, oligómeros y polímeros. Del T1 los electrones se transfieren al dominio trinuclear T2/T3, que actúa como receptor final en el cual se enlaza la molécula de oxígeno que se reduce a 2 moléculas de agua (Adinarayana Kunamneni, 2007), (Riva, 2006). La Figura 2a muestra la mecánica de las reacciones catalizadas por las lacasas.

A menudo los sustratos de interés no pueden ser oxidados directamente por las lacasas, ya sea porque los sustratos son muy grandes para penetrar en el sitio activo de la enzima o porque tienen un potencial de redox particularmente alto.

Las lacasas son capaces de oxidar también compuestos no fenólicos mediante el uso de químicos mediadores los cuales son compuestos que actúan como sustratos intermediarios para las lacasas, cuyos radicales oxidados son capaces de interactuar con el compuesto objetivo, una gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos como el alquil β - glucósido y los alcoholes bencílicos. La Figura 2b y 2c muestran el esquema y un ejemplo de cómo funcionan los mediadores (Riva, 2006), (Rodríguez Couto & Sanromán, 2005).

Figura 1 Esquema de la mecánica de las reacciones catalizadas por las lacasas en ausencia (a) y en presencia (b) y (c) de mediadores químicos (Riva, 2006).



Fuente: Riva, Sergio. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *TRENDS in Biotechnology*, 2006; p. 224

1.1.3. Aplicaciones

La amplia variedad de sustratos que pueden ser degradados por las lacasas las hace útiles para diferentes procesos biotecnológicos tales como bio-blanqueamiento, degradación de tintes y la remoción de compuestos fenólicos, xenobióticos, entre otros compuestos aromáticos (Niladevi, Sukumaran, & Prema, 2007). En la industria papelera las lacasas son una alternativa para la deslignificación de las pulpas de madera porque son capaces de degradar la lignina sin afectar a la celulosa. Además son utilizadas para procesos de bioblanqueamientos de las pulpas, decolorar y desintoxicar efluentes generados por la industria de pulpa y papel. (Meza, Lomascolo, Casalot, Sigoillot, & Auria,

2005), (Rodríguez Couto & Toca Herrera, 2006). El tratamiento con lacasas es menos contaminante debido a que se evita la producción de Cl_2 y Cl_2O (Camareroa, y otros, 2004).

En la industria textil las lacasas son preferidas ya que pueden ser utilizadas en la degradación de tintes de diversas estructuras químicas, incluidos los tintes sintéticos, lo que las hace útiles para el tratamiento de las aguas residuales (Rodríguez Couto & Toca Herrera, 2006). Los mecanismos utilizados para la remoción de tintes como la adsorción, precipitación, coagulación-floculación, oxidación química, filtración y fotodegradación pueden ser muy costosos, poco eficientes o pueden generar grandes cantidades de lodos (Tychanowicz, Zilly, Marques de Souza, & Peralta, 2003). También son útiles en el blanqueamiento de algunos textiles y en el terminado del Denim (Pazarlioğlu, Sarişikb, & Telefoncua, 2004).

Las lacasas tienen un prometedor campo de acción en la industria de alimentos, allí son utilizadas para modificar la apariencia de comidas y bebidas (Rodríguez Couto & Toca Herrera, 2006), en el proceso de horneado, en la estabilización del vino y en los procesos de clarificación (Minussi, Pastore, & Durán, 2002) para modificar las propiedades reológicas de las masas provenientes de la harina de trigo (Selinheimoa, Kruusa, Bucherta, Hopiab, & Autio, 2005) y para la mejora de parámetros sensoriales al reducir sabores desagradables de los alimentos (Minussi, Pastore, & Durán, 2002).

Las lacasas también son útiles para mejorar la producción de etanol combustible, para el análisis de medicamentos, para distinguir entre la morfina y la codeína (Mayera & Staplesb, 2002). Recientemente han encontrado aplicaciones en campos como el diseño de celdas de biosensores y biocombustibles (Kunamneni, Bastelleros, Plou, & Alcalde, 2007).

1.2 HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA

Los hongos degradadores de madera pueden ser separados por su metabolismo en dos grupos principales, los hongos de pudrición café y los de pudrición blanca de la madera. Los hongos de pudrición café destruyen y metabolizan sólo la hemicelulosa y celulosa. Pueden modificar la estructura de la lignina, pero realmente no la pueden metabolizar como fuente de carbono (Kunstmann, 2004). Los hongos de pudrición blanca (HPB) degradan selectivamente la lignina (elemento cementante de las fibras) (Catalán, 2004), produciendo al final una madera con una apariencia blanquecina (Vera, 2006).

Los hongos de pudrición pertenecen al grupo de hongos superiores denominados Basidiomicetos. (Kunstmann, 2004), que comprende cientos de especies que causan pudrición en coníferas y latifoliadas en todo el mundo. La producción de enzimas del tipo fenol-oxidasas es lo que distingue a los hongos de pudrición blanca de los demás basidiomicetos degradadores de madera. Son los únicos organismos que poseen la capacidad de degradar lignina completamente en CO_2 y H_2O . La degradación de la lignina mediante estos hongos ocurre principalmente durante el metabolismo secundario por medio de enzimas extracelulares oxidativas ligninolíticas, metabolitos de bajo peso molecular y especies reactivas de oxígeno, con el objetivo de mineralizar la lignina para tener acceso a la molécula de celulosa que utilizan como fuente de carbono (Carolina Arboleda Echavarría, 2010). Bajo condiciones ligninolíticas, los HPB producen enzimas extracelulares como las peroxidasas y las oxidasas y un metabolito secundario (veratril alcohol) (Vera, 2006).

Las enzimas más importantes que actúan directa o indirectamente sobre la lignina son la lignina peroxidasa (LiP), la manganeso peroxidasa (MnP) y la lacasa. Estas tres enzimas pueden actuar con mediadores de bajo peso molecular para posibilitar la oxidación de la lignina. Algunos hongos de pudrición blanca

producen las tres enzimas, algunas sólo dos, y algunos, al parecer, sólo una (Cullen, 1998). Por ejemplo, Cullen y Kersten (1996) y Hammel (1996) mencionan que no se detecta lacasa en la actividad enzimática de *Phanerochaete chrisosporium*. Y Srebotnik et al. (1997), establecieron que *Ceriporiopsis subvermispora* no utiliza LiP para degradar lignina (Kunstmann, 2004).

1.2.1 *Pycnoporus sanguineus*

Pycnoporus es un hongo filamentoso perteneciente a los basidiomicetos, ha sido estudiado principalmente por su capacidad para degradar lignina. La clasificación taxonómica del *Pycnoporus sanguineus* se puede observar en la Tabla 1. Este hongo ha sido de especial interés debido a su capacidad de oxidación y degradación de diferentes compuestos de estructura molecular compleja. Los metabolitos primarios y secundarios que produce el género *Pycnoporus* exhiben características diferenciales dependientes de cada especie y condiciones de cultivo. Las especies más estudiadas han sido principalmente *P. cinnabarinus*, *P. coccineus* y *P. sanguineus* (Acosta-Urdapilleta, y otros, 2010).

Tabla 1 Clasificación taxonómica del *Pycnoporus sanguineus*

Dominio	Eucariota
Reino	Hongo
Subreino	Dicaria
Clase	Bacidiomicetos
Subclase	Agaricomycetidos
Orden	Poliporales
Familia	Poliporacea
Género	<i>Pycnoporus</i>
Nombre científico	<i>Pycnoporus sanguineus</i>

Fuente: GBIF España, En: Real Jardín Botánico Madrid. [En Línea]. <Disponible en: http://zipcodezoo.com/Fungi/P/Pycnoporus_sanguineus/>

Pycnoporus sanguineus también llamado *Polyporus sanguineus*, es un hongo de pudrición blanca capaz de secretar diversas enzimas extracelulares, entre ellas invertasas, tirosinasas, α -amilasas, β -glucosidasas, xilanasas, lignina peroxidasa, Mn peroxidasa, lacasas y exo-poly-galacturonasa (L. Acosta-Urdapilleta, 2010). Su nombre viene del griego Pycnós, compacto, denso apretado, muy junto, muy cerrado. Y del póros, poro, vía, camino por el aspecto de los poros del himenóforo. Usualmente es de color cinabarino a rojo-naranja.

Pycnoporus sanguineus, crece generalmente sobre madera latifoliada, raras veces sobre coníferas (Ulloa & Herrera, 1994). Usualmente sobre troncos caídos, principalmente en zonas expuestas (soleadas) y alteradas, incluso sobre troncos quemados en regiones tropicales aunque puede encontrarse también en áreas subtropicales y cálido-templadas del este de América del Norte y Asia (China, Taiwan, el este de Rusia, Japón, el norte de Tailandia y Vietnam) (Mata H & Soto, 2004). Tiene una vistosa fructificación semicircular dispuesta en repisa, de color rojo anaranjado y de consistencia parecida al corcho cuando está fresco. La superficie es aterciopelada cuando muy joven y lisa cuando adulto, algunas veces rugosa, rojo anaranjado brillante cuando está húmedo y anaranjado rojizo a anaranjado amarillento cuando está muy seco. No posee pie o estípite, ya que se adhiere lateralmente a la madera. Las esporas son blancas cuando están agrupadas (Mata H & Soto, 2004).

Los trabajos reportados en la literatura sobre *P. sanguineus* utilizan cepas de este hongo para la caracterización de varias isoformas de lacasas en medios de extracto de malta, medio basal, melazas diluidas, medio líquido con colorantes, entre otros (Acosta-Urdapilleta, y otros, 2010). Además de la producción enzimática en África, Asia y algunas tribus indígenas de América Latina le han atribuido características medicinales (Mata H & Soto, 2004).

Figura 2 *Pycnoporus sanguineus* tomada del centro de ciencias biológicas UFSC



Fuente: (L.) Murrill, Fotos, Laboratorio de Micología UFSC.[Enlínea].<Disponible en <http://www.ccb.ufsc.br/bot/micologia/fotos.html> >

1.3 PRODUCCIÓN DE LACASAS

La producción de lacasas por microorganismos se realiza a través de fermentación en estado sólido (FES) y fermentación sumergida, y aunque la fermentación sumergida es la más utilizada industrialmente, la FES ofrece muchas ventajas sobre la fermentación sumergida, tales como: mejor productividad debido a una mayor producción de biomasa, mayores rendimientos de producto en más cortos periodos de tiempo, menores vertimientos de agua, menores requerimientos de energía y medios de fermentación más simples, mejor circulación de oxígeno, simula el hábitat natural de los hongos y menos esfuerzos en los procesos aguas abajo del sistema. Además la FES ofrece la posibilidad de usar subproductos y desechos de la industria de alimentos y agrícola como

materias primas, haciendo el proceso más eficiente y económico (Niladevi, Sukumaran, & Prema, 2007) (Viniegra-González, Favela-Torres, Aguilar, Rómero-Gomez, Díaz-Godínez, & Augur, 2003), (Meza, Lomascolo, Casalot, Sigoillot, & Auria, 2005), (Rodríguez Couto & Sanroman, 2005). Estudios realizados sobre el análisis en los costos de producción de lacasa muestran que la enzima producida por fermentación en estado sólido tiene un precio final más bajo que los obtenidos cuando se cultiva bajo condiciones de fermentación sumergida. Además, el escalado de la FES disminuyó en alrededor de 4 - veces el precio final de la lacasa producida; mostrando, de acuerdo con Johann y Osma (2011), un precio promedio final de 7 céntimos de Euro por unidad de las fermentaciones sumergidas, en comparación con 0,44 y 0,11 céntimos de Euro por Unidad de las fermentaciones en estado sólido a escala de matraz y en la escala de biorreactores, respectivamente (Osma, Toca-Herrera, & Rodríguez-Couto, 2011).

1.3.1 Fermentación en estado sólido

La FES se define como un proceso de fermentación que ocurre en ausencia parcial o total de agua libre, en el cual se emplea ya sea un soporte natural o inerte como material sólido. La selección de un soporte adecuado para llevar a cabo la fermentación es esencial, pues el éxito del proceso depende de esto. Los factores más importantes para tener en cuenta al seleccionar un soporte son tamaño de partícula, porosidad y composición química. Además el costo y la disponibilidad son criterios de gran importancia.

Los materiales de la FES se pueden clasificar en 2 grandes grupos: materiales inertes que solo funcionan como un lugar de enlace o soporte para los microorganismos y los materiales no inertes que además proveen algunos nutrientes a los microorganismos. Estos últimos, debido a su doble rol, son llamados sustratos y soportes. Estos materiales están típicamente compuestos de

almidón o compuestos lignocelulósicos y provienen de la agroindustria, tales como granos o subproductos de granos. El uso de esta clase de sustratos ayuda a resolver problemas económicos y ambientales causados por la eliminación de estos productos. La composición de este tipo de sustrato debe seleccionarse de acuerdo a la enzima que se desea producir, pues el sustrato puede contener sustancias que actúan como inductores para la obtención de la enzima (Rodríguez Couto & Sanroman, 2005). Además del sustrato se deben tener en cuenta otros aspectos en la fermentación como la temperatura, el pH, y el uso de inductores (Kunamneni, Bastelleros, Plou, & Alcalde, 2007).

1.3.2 Fuente de Nitrógeno

Se ha demostrado que las fuentes de nitrógeno juegan un papel importante en la síntesis de lacasa por hongos de pudrición blanca (Osma, Rodríguez Couto, & Toca Herrera, 2007). Se ha reportado una mayor producción de lacasa utilizando los medios de cultivo ricos en nitrógeno, en lugar de los medios de cultivo con nitrógeno limitado que son generalmente empleados para la inducción de las oxidorreductasas (Kunamneni, Bastelleros, Plou, & Alcalde, 2007), según Eggert la actividad de lacasa en *P. chrysosporium* fue sólo detectable bajo un alto contenido de nitrógeno de 24 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Eggert, Temp, & Eriksson, 1996). Amezcua, Castillo y otros utilizaron *Pleurotus ostreatus* para la producción de lacasa utilizando peptona, extracto de levadura y triptona como fuente de nitrógeno (Amezcua Castillo, Granados Baeza, & Tinoco Valencia, 2009).

Elisashvili y otros han demostrado que adicionando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al medio de cultivo se aumenta los niveles de actividad de la lacasa en *Cerrena unicolor* (Elisashvili, Parlar, Kachlishvili, Chichua, Bakradze, & Kokhraidze, 2001), mientras Kaal y otros han demostrado que la producción de lacasa en *Lentinus edodes* y *Pleurotus ostreatus* ha sido aumentada por la fuente orgánica de nitrógeno, peptona (Kaal, Field, & Joyce, 1995).

1.3.3 Inductores

Estudios realizados muestran que la producción de lacasas puede ser considerablemente estimulada por la presencia de inductores, principalmente se pueden encontrar compuestos fenólicos aromáticos o relacionados con la lignina o los derivados de ésta, otra opción es el cobre que aunque es un compuesto no lignolítico hace parte de la estructura de la enzima (Loera, Pérez, Barbosa, & Villaseñor, 2006).

En un estudio realizado por Daljit y Paramjit utilizaron *D. avida*, *P. brevispora*, *P. radiata* y *Polyporus sanguineus* para la producción de lacasas, evaluaron tres medios de cultivo diferentes y adicionaron varios suplementos (alcohol veratrílico, guayacol, paja de trigo, paja de arroz y bagazo de caña de azúcar) para evaluar la producción de lacasas. El efecto de estos en la producción de lacasa es variado, depende del microorganismo y del medio de cultivo utilizado. En general el alcohol veratrílico, guayacol, bagazo de caña de azúcar y paja de trigo resultaron ser excelentes inductores de lacasa. Por ejemplo el alcohol veratrílico aumentaba la producción de lacasa hasta doscientas veces en *P. radiata* (Daljit & Paramjit, 2001).

Moldes y colaboradores reportaron una actividad de 22.55 kU/l en la producción de lacasa con *Trametes hirsuta*, utilizando la tiamina y el sulfato cúprico como suplemento de cobre para inducir la producción de la lacasa (Moldes, Gallego, Rodriguez Couto, & Sanromán, 2002). También se encuentra en la literatura la producción de lacasa a partir de *Pycnoporus cinnabarus*, utilizando bagazo de caña, obteniendo una actividad máxima de 90 U/g, utilizando etanol gaseoso como inductor a una concentración óptima de 7 g/m³ (Meza, Lomascolo, Casalot, Sigoillot, & Auria, 2005).

1.3.4 Biorreactores

En los procesos de fermentación el biorreactor proporciona el ambiente adecuado para el crecimiento y la actividad del microorganismo, garantizando la formación del producto deseado. Algunos parámetros a tener en cuenta para la elección del biorreactor son la temperatura, el pH, la aireación, contenido de humedad, agitación y la resistencia del microorganismo al movimiento, y la transferencia de masa (Rodríguez Couto & Sanroman, 2005).

Para evaluar el efecto de las condiciones de operación sobre la capacidad de decoloración de efluentes contaminados con colorantes y su correlación con la actividad enzimática de la lacasa Fernández utilizó un reactor tipo columna de burbujeo. El reactor se inoculó con 9 g de biomasa y se aireó con $1000 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ se obtuvo una decoloración del 97%, que equivale a 292 ppm del colorante; con una actividad lacasa de 3.7 U L^{-1} . Se obtuvieron mejores resultados en el reactor debido a que la transferencia de oxígeno es más eficiente que a nivel de erlenmeyer (Fernández, Henao, Pedroza-Rodríguez, & Quevedo-Hidalgo, 2009).

Algunos de los reactores empleados en la producción de lacasa por FES son los biorreactores de lecho empacado y bandejas.

Los biorreactores de lecho empacado están compuestos de una columna enchaquetada llena de microorganismo y sustrato. Aire húmedo es inyectado de modo continuo (Rodríguez Couto & Sanroman, 2005). Para la producción de lacasas en una fermentación en estado sólido con *Pycnoporus cinnabarus*, Meza y otros utilizaron un reactor de columna empacado con bagazo de caña, impregnado con la solución de sales y minerales e inoculado con *P. cinnabarinus*, y evaluaron el efecto de etanol gaseoso obteniendo una actividad máxima de 90 U/g (Meza, Lomascolo, Casalot, Sigoillot, & Auria, 2005).

Los biorreactores de bandeja consisten en bandejas planas, donde los sistemas de biopartículas (sustrato, microorganismos, etc.) se ubican, formando una capa de 1.5 o 2 centímetros de grosor. El biorreactor se mantiene en una cámara a temperatura constante con aireación pasiva (Rodriguez Couto & Sanroman, 2005). Osma Cruz utilizó un biorreactor de bandeja para la producción de lacasas en una fermentación en estado sólido con *Trametes pubescens* usando cáscaras de semillas de girasol como soporte-sustrato, para estos ensayos se obtuvieron actividades máximas de lacasa de alrededor de 40.000 U/L (Osma cruz, 2009).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MICROORGANISMO

El hongo *Pycnoporus sanguineus* fue donado por la Universidad Tecnológica del Chocó y se mantuvo en cajas de Petri con agar Sabouraud (Merck) a 4°C en el Laboratorio de microbiología del CIBIOT. Antes de la fermentación se incubó en una cámara de humedad durante dos semanas en bolsas con sorgo estéril.

4.2. SUSTRATO

Para las fermentaciones fue utilizado como sustrato aserrín, obtenido de la transformación de diferentes árboles maderables (roble) en el taller Gildardo Maderas de la ciudad de Medellín.

Para la caracterización del sustrato se determinó su contenido de humedad utilizando una balanza PRECISA GRAVIMETRICS AG Serie XM 10SE y se determinó el contenido de lignina Klasson eliminando tanto los extractivos acuosos como los orgánicos. Para esto se realizó una extracción acuosa y luego una extracción orgánica utilizando una mezcla etanol-tolueno (1:2), para finalmente realizar la determinación de lignina mediante dos hidrólisis consecutivas, utilizando ácido sulfúrico en la primera hidrólisis y agua en la segunda (Velasquéz Jimenez, 2002).

4.3. FERMENTACIÓN

Para la producción de lacasa se empleó como medio de cultivo 7 g de aserrín estéril en un reactor estático de 250mL al cual se adicionaron 15 mL de una solución de sales KH_2PO_4 (0.2%), MgSO_4 (0.05%) y NH_4Cl (0.75g/L) que además

contenía extracto de levadura y un inductor, de acuerdo al diseño de experimentos. El pH de la solución de sales se ajustó a un valor de 8 y se complementó con agua destilada para llegar a un porcentaje de humedad del 80%. El sistema fue inoculado utilizando aproximadamente 0.7g de *Pycnoporus sanguineus* sembrado en sorgo. La fermentación fue realizada durante 11 días a una temperatura de 25°C y en oscuridad.

Previamente al diseño de experimentos se realizaron una serie de ensayos para determinar el comportamiento de la producción de lacasa con la presencia o ausencia de extracto de levadura y de un inductor (etanol o cobre), tal como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2 Ensayos previos

Ensayo	Sln de sales	Ext levadura (1,5%)	CuSO ₄ (0,4mM)	Etanol (3%)
A	x			
B	x	x		
C	x	x	x	
D	x	x		x

Para la determinación de las condiciones óptimas de producción de lacasa se evaluó el efecto del contenido de la fuente de nitrógeno (extracto de levadura) y la concentración de un inductor sobre la actividad enzimática de la lacasa mediante un diseño de experimentos de superficie de respuesta 2² estrella rotatable y ortogonal. Para esto se efectuaron 16 ensayos con dos réplicas, ver Tablas 3 y 4. El análisis del diseño se realizó utilizando el software Statgraphics 5.0.

Tabla 3 Diseño de experimentos de superficie de respuesta 2² estrella rotatable y ortogonal. Donde 1,4 y -1,4 son puntos estrella; 0,0 el nivel central y 1,0 y -1,0 son los niveles superior e inferior, respectivamente.

Inductor	-1,4	-1	0	1	1,4
Ex. Lev (%)	0,3	0,5	1	1,5	1,7
Cobre (mM)	0,1	0,2	0,4	0,6	0,7

Tabla 4 Diseño de experimentos

Ensayo	Extracto de levadura (%)	CuSO ₄ (mM)
1	1	0,4
2	1,7	0,4
3	1,5	0,2
4	0,5	0,6
5	1	0,7
6	1	0,4
7	1	0,4
8	0,3	0,4
9	1	0,4
10	0,5	0,2
11	1	0,4
12	1	0,4
13	1,5	0,6
14	1	0,1
15	1	0,4
16	1	0,4

4.4. EXTRACCIÓN

La extracción de lacasa se realizó de acuerdo al proceso propuesto por Niladevi y colaboradores. El contenido de cada reactor de 250 mL se extrajo con 100 mL de agua destilada a 24°C. La suspensión se llevó a un agitador a 200 rpm por 1 hora, el líquido se centrifugó a 6000 rpm durante 20 minutos y se separó el

sobrenadante para luego ser filtrado. Se almacenó a 4°C para la medición de actividad (Niladevi, Sukumaran, & Prema, 2007).

4.5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad de la lacasa se determinó mediante el monitoreo de la oxidación de 0.25 mL de ABTS (0.45 mM) en una solución buffer de fosfato de sodio 100mM (pH 6) a 420 nm durante 1 minuto, utilizando un espectrofotómetro PERKIN ELMER *Precisely*. Lambda 25 UV/VIS Spectrometer. Se definió una unidad de actividad enzimática como 1 μ M de ABTS oxidado por minuto. Para calcular la actividad enzimática se usó un coeficiente de absorción de $3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Kumar, Kirupha, Periyaraman, & Sivanesan, 2011).

4.6. ENSAYO EN UN BIORREACTOR DE COLUMNA

Para llevar a cabo la fermentación en el reactor de columna se preparó una semana antes un preinóculo en aserrín en un reactor estático de 250 ml, tal como se prepararon las fermentaciones del diseño de experimentos y con las concentraciones de extracto de levadura y sulfato de cobre que permitieron obtener una máxima actividad de lacasa para los intervalos evaluados en el diseño de experimentos.

El biorreactor consta en su interior de 4 canastas, la fermentación se lleva a cabo a las mismas condiciones del preinóculo, ubicando 20 g de aserrín por canasta. El sistema fue inoculado utilizando aproximadamente 3 g de preinóculo. La fermentación fue realizada durante 15 días a una temperatura de 25°C y en oscuridad. El biorreactor cuenta con suministro de vapor para mantener las condiciones de humedad, el agua se mantuvo a 30°C.

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En esta investigación se realizaron inicialmente una serie de ensayos preliminares para determinar el comportamiento de la producción de lacasa con la presencia o ausencia del extracto de levadura, así como con los dos inductores, etanol y cobre.

Una vez seleccionado el inductor se realizó un diseño de experimentos de superficie respuesta para determinar el efecto de la concentración del inductor, sulfato de cobre, y de la fuente de nitrógeno, extracto de levadura, sobre la producción de lacasa a partir de *Pycnoporus sanguineus* utilizando aserrín como sustrato.

Previamente se caracterizó el aserrín para comprobar que las características de éste fueran favorables para el crecimiento del microorganismo y la producción de lacasas.

5.1. CARACTERIZACIÓN DEL SUSTRATO

Para la caracterización del aserrín se determinaron el contenido de humedad y el contenido de lignina Klasson. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Caracterización del aserrín

Caracterización	Aserrín
% Humedad	17,96
% E. Acuosos	7,22
%E. Orgánicos	2,17
% L. Klasson	31,05

Durante la caracterización del aserrín se encontró una humedad de 17,96%, este valor se encuentra cercano a los reportados en la literatura entre 7.4% y 16.3% (Cea Muñoz, 2003).

Durante la determinación del contenido de lignina se obtuvo un porcentaje de extractivos acuosos de 7,22% y de los extractivos orgánicos de 2,17%. Los extractivos acuosos corresponden a sustancias como sales minerales, almidón, galactanas, sustancias pépticas, colorantes y algunos azúcares y los extractivos orgánicos corresponden a ceras, grasas, resinas, aceites y taninos (Velasquéz Jimenez, 2002).

Se encontró un porcentaje de lignina Klasson de 31%, este valor se encuentra cercano a los reportados en la literatura entre 20% y 32% (Rodríguez Couto & Sanroman, 2005) (Álvarez Godoy, De Carvalho Rodrigues, Martins Alves, & Álvarez Lazo, 2007). Este contenido de lignina superior al 15% hace del aserrín un sustrato que promueve la producción de lacasas (Moldes, Gallego, Rodríguez Couto, & Sanromán, 2003).

5.2. CRECIMIENTO DE PYCNOPORUS SANGUINEUS

El hongo *Pycnoporus sanguineus* fue donado por la Universidad Tecnológica del Chocó y se mantuvo en agar Sabouraud, posteriormente se incubó en una cámara de humedad durante dos semanas en bolsas con sorgo estéril. En esos 15 días el microorganismo logró invadir completamente el sustrato. Este cultivo madre fue utilizado como inóculo para las fermentaciones.

Una vez inoculado el sorgo en el aserrín se observó una invasión lenta del *Pycnoporus sanguineus* durante los primeros 5 días de cultivo, después del quinto

día se observó un crecimiento acelerado y una colonización prácticamente completa a los 11 días.

Este comportamiento está acorde con lo reportado por Acosta-Urdapilleta y otros, quienes llevaron a cabo el estudio del crecimiento del *Pycnoporus sanguineus* en diferentes sustratos sólidos. La cepa que emplearon de *Pycnoporus sanguineus* (HEMIM-51) fue capaz de crecer a nivel micelial sobre todos los sustratos evaluados (granos de trigo, paja de avena, aserrines de encino y pino) presentando un micelio denso y de coloración blanca. A partir del día 20, las bolsas empleadas para el cultivo estaban cubiertas por el micelio, con menor crecimiento en el centro de la muestra (Acosta-Urdapilleta, y otros, 2010). Un fenómeno similar ocurrió durante el presente trabajo al observarse un mayor crecimiento del microorganismo en la superficie del sustrato (aserrín).

5.3. FERMENTACIONES

5.3.1 Ensayos preliminares

Para los ensayos preliminares mostrados en la Tabla 2 se realizaron 4 fermentaciones cada una con dos replicas para evaluar el efecto de la adición de extracto de levadura e inductores como sulfato de cobre y etanol.

Las diferencias en el aspecto de las fermentaciones se presentan en la Figura 3, donde se compara la colonización del microorganismo en los 4 ensayos previos, luego de 11 días de fermentación. En todos los casos se observa crecimiento del microorganismo; sin embargo, el ensayo B y C presentan un crecimiento más abundante, homogéneo y una coloración más fuerte del *Pycnoporus*.

Figura 3 Comparación de la colonización de *Pycnoporus sanguineus* en aserrín para los ensayos A, B, C y D



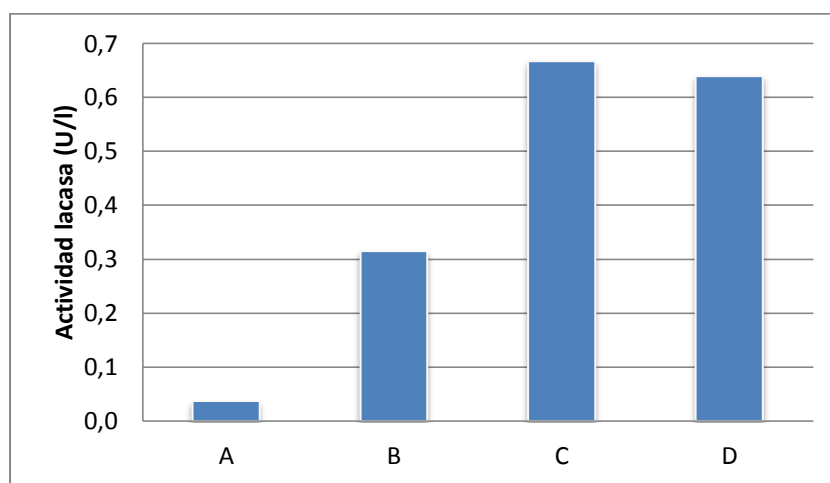
Las diferencias en el crecimiento se pueden explicar debido a las características que presentan los diferentes ensayos. El ensayo A, el cual no contiene ni inductor ni extracto de levadura presenta una menor producción de pigmento (cinabarina).

Moreno realizó fermentaciones con *Pycnoporus sanguineus* y aserrín, en las que también se observó un crecimiento acelerado y una colonización prácticamente completa del aserrín a los 11 días de fermentación. También observó un crecimiento abundante, homogéneo y un color vivo utilizando extracto de levadura a una concentración de 1,5% (Moreno, 2011).

De igual forma, Vikineswary y otros evaluaron la producción de lacasas de *Pycnoporus sanguineus* en aserrín de caucho, y reportaron los primeros signos de crecimiento a los dos o tres días después de la inoculación. También encontraron un cambio en la coloración del micelio de blanco a naranja rojizo y la completa colonización del hongo a los 11 días de fermentación (Vikineswary, Abdullah, Renuvathani, Sekaran, Pandey, & Jones, 2005).

En los ensayos preliminares se puede observar (Figura 4) que el aumento en la producción de lacasas del ensayo B con respecto al A es de aproximadamente el 750%. El aumento del ensayo C con respecto al B es del 110%. Y el aumento del ensayo D con respecto al B es del 100%. Debido a estos resultados se seleccionó el CuSO_4 como el inductor para el diseño de experimentos.

Figura 4 Actividad lacasa. A,B,C y D son los ensayos preliminares. A, Sln de sales; B, Sln de sales +Ext.Lev; C, Sln de sales +Ext.Lev+ CuSO_4 y D , Sln de sales +Ext.Lev+EtOH



El incremento en la actividad de la lacasa por la adición del extracto de levadura (Ensayo B con respecto al ensayo A) obedece a que el nitrógeno estimula el

crecimiento de los microorganismos y por tanto su disponibilidad facilita la síntesis de proteínas. Kachlishvili y otros analizaron el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de las lacasas utilizaron 4 microorganismos diferentes *Funalia trogii*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus dryinus*, y *P. tuberregium*, 2 sustratos diferentes: cascarilla de trigo y hojas de árboles y cuatro fuentes de nitrógeno distintas: peptona, nitrato de amonio, sulfato de amonio y nitrato de potasio. Encontraron que en general la adición de nitrógeno estimula un mayor crecimiento de los microorganismos comparado con los experimentos realizados sin fuente de nitrógeno. Cuando usaron hojas de árboles como sustrato, con *Lentinus edodes* como microorganismo obtuvieron la máxima actividad de las lacasas, 20 U/g, con la peptona o el sulfato de amonio como fuente de nitrógeno (Kachlishvili, Penninckx, Tsiklauri, & Elisashvili, 2005).

Para el ensayo suplementado con etanol y extracto de levadura se encontró un incremento en la actividad de la lacasa que puede atribuirse a los aumentos de permeabilidad de la membrana que facilitan la secreción de proteínas, la prevención de la polimerización de compuestos monoaromáticos, que pueden inducir la actividad de la lacasa o la inducción indirecta de la síntesis de la lacasa a través de un estrés oxidativo. El efecto inductor del etanol depende entre muchos factores del microorganismo y la concentración utilizada. Por ejemplo, Meza y otros reportan que la producción de lacasa, a partir de *Pycnoporus cinnabarus*, en bagazo de caña, utilizando etanol gaseoso como inductor a una concentración de 7 g/m³ tuvo un aumento de 45 veces con respecto a la obtenida en el medio de control. Obteniendo una actividad máxima de 90 U/g (Meza, Lomascolo, Casalot, Sigoillot, & Auria, 2005).

Así mismo, Manavalan y colaboradores encontraron un incremento en la producción de lacasa de 6.5 veces utilizando etanol al 1% en un cultivo de *G.lucidum* después de 15 días de incubación. . Además observaron que la producción de lacasa se podía mejorar mediante la variación de la concentración

de etanol, encontraron incrementos hasta de 14.1 veces más para medios de cultivo suplementados con 3% (v / v) de etanol, para porcentajes superiores (5%) el crecimiento celular se vio gravemente inhibido, y la producción de la lacasa decreció significativamente (Manavalan, Manavalan, Thangavelu, & Heese, 2013). En la presente investigación se utilizó una concentración de 3% (v / v) y se obtuvo el doble de actividad enzimática con respecto al medio de control.

Para el caso del sulfato de cobre, se encontró un incremento en la actividad enzimática de 110% para sistemas suplementados con 0,4mM de CuSO_4 . De acuerdo con Moreno y Ospina, el cobre, presentado como CuSO_4 , es un inductor de la actividad enzimática de las lacasas ya que hace parte de la estructura de la enzima. Esta inducción se da por una regulación a nivel transcripcional pues los niveles de mRNA aumentan en presencia de cobre (Moreno Sandoval & Ospina, 2008). Vaidyanathan y otros realizaron fermentaciones con diferentes microorganismos entre ellos el *Pleurotus ostreatus* y utilizaron el CuSO_4 como inductor. Analizaron el efecto del inductor sobre la producción enzimática y encontraron que el aumento de la producción de lacasa con el sulfato de cobre se daba de un 60 a un 80% (Kumar, Kirupha, Periyaraman, & Sivanesan, 2011). Estos valores se encuentran cercanos al aumento de 110% reportado en este trabajo.

5.3.2 Diseño de experimentos

Se realizó un diseño de experimentos de superficie respuesta 2^2 estrella rotatable ortogonal para evaluar el efecto de la concentración de extracto de levadura (0,3%; 0,5%;1%;1,5%;1,7%) y el CuSO_4 (0,1mM; 0,2 mM; 0,4mM; 0,6nM; 0,7mM) sobre la producción de lacasas (representada como actividad enzimática). los resultados se pueden ver en la Tabla 6.

Tabla 6 Actividad de lacasas

Ensayo	Extracto de levadura (%)	CuSO ₄ (mM)	Actividad (U/l)
1	1,0	0,4	0,287
2	1,7	0,4	0,093
3	1,5	0,2	0,574
4	0,5	0,6	0,019
5	1,0	0,7	0,380
6	1,0	0,4	0,185
7	1,0	0,4	0,213
8	0,3	0,4	0,241
9	1,0	0,4	0,065
10	0,5	0,2	0,370
11	1,0	0,4	0,032
12	1,0	0,4	0,093
13	1,5	0,6	0,111
14	1,0	0,1	0,194
15	1,0	0,4	0,148
16	1,0	0,4	0,069

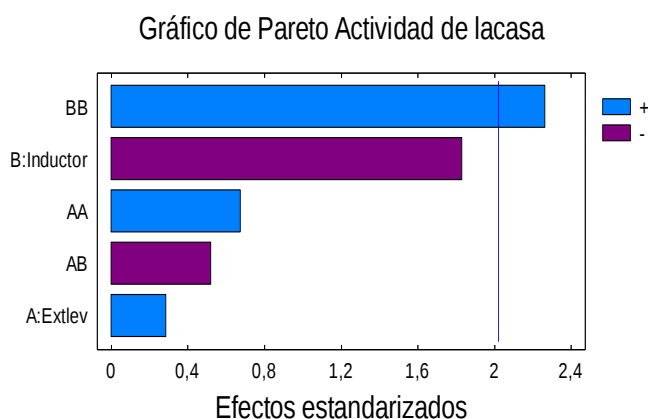
Se encontró que de las variables evaluadas solo la relación CuSO₄ - CuSO₄, tiene un efecto significativo positivo sobre la actividad enzimática. Para establecer el tipo de efecto de cada variable se calcularon los efectos estimados y las interacciones, tal como se muestra en la Tabla 7. También se muestra el error estándar de cada uno de los efectos, los cuales se basan en el error total con 40 grados de libertad.

Tabla 7 Efectos estimados

Efectos estimados	
average	0,137 +/- 0,037
A:Extlev	0,022 +/- 0,075
B:Inductor	-0,138 +/- 0,075
AA	0,051 +/- 0,075
AB	-0,056 +/- 0,106
BB	0,171 +/- 0,075

El gráfico de Pareto (Figura 5) también ilustra los efectos significativos de las variables sobre la actividad enzimática ubicados en orden decreciente de significancia.

Figura 5 Gráfico de Pareto Actividad lacasa.



Para observar la significancia estadística de los efectos se puede ver la Tabla 8, la cual muestra el análisis de la varianza para la actividad enzimática para cada uno de los efectos estimados.

Tabla 8 Análisis de la varianza para la producción de las lacasas con aserrín

Fuente	SC	DF	MC	F	P
A:Extlev	0,003	1	0,003	0,08	0,775
B:Inductor	0,115	1	0,115	3,35	0,075
AA	0,016	1	0,016	0,46	0,503
AB	0,009	1	0,009	0,27	0,605
BB	0,176	1	0,176	5,13	0,029
blocks	0,053	2	0,027	0,78	0,466
Error total	1,368	40	0,034		

Se observa la significación estadística de cada efecto mediante la comparación de la media cuadrática contra una estimación del error experimental. En este caso, solo 1 efecto tiene el valor de p inferior a 0,05, lo que indica que es significativamente diferente de cero en el nivel de confianza del 95,0%. El estadístico R-cuadrado indica que el modelo incorporado explica el 21,34% de la variabilidad en la Actividad. El R-cuadrado ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferentes números de variables independientes, es 11,98%. Lo que muestra la baja relación entre las variables utilizadas, concentración de extracto de levadura y sulfato de cobre, que se puede deber a la dispersión de los datos obtenidos. El error estándar de estimación muestra que la desviación estándar de los residuos es 0,1849. El error absoluto medio (MAE) de 0,1309 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) comprueba los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que aparecen en el archivo de datos. Dado que el valor P es menor que 0,05, hay una indicación de la posible correlación serial.

La matriz de correlación, Tabla 10, muestra el alcance de la desconexión entre los efectos.

Tabla 9 matriz de correlación para los efectos estimados

	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
(1)Promedio	1	0	0	-0,5	0	-0,5	0	0
(2)A:Ext.Lev	0	1	0	0	0	0	0	0
(3)B:Inductor	0	0	1	0	0	0	0	0
(4)AA	-0,5	0	0	1	0	0	0	0
(5)AB	0	0	0	0	1	0	0	0
(6)BB	-0,5	0	0	0	0	1	0	0
(7)Bloque	0	0	0	0	0	0	1	-0,5
(8)Bloque	0	0	0	0	0	0	-0,5	1

Un diseño perfectamente ortogonal mostraría una matriz diagonal con 1 en la diagonal y 0 fuera de la diagonal. Cualquiera de los términos distintos de cero fuera de la diagonal implica que las estimaciones de los efectos correspondientes a la fila y la columna estarán correlacionadas. Dado que uno o más de los pares son mayores o iguales a 0.5, es difícil separar los efectos unos de otros a la hora de analizar los datos.

Utilizando los datos experimentales de la actividad de las lacasas se calcularon los coeficientes de regresión para la actividad, buscando un modelo que pueda describir el comportamiento de ésta (Ver Tabla 10).

Tabla 10 Coeficientes de regresión para la actividad

Coeficientes de regresión para la actividad	
Constante	0,136708
A:Ext.Lev	0,0108616
B:Inductor	-0,0691299
AA	0,0255209
AB	-0,0278333
BB	0,0855212

La Tabla 10 y la Ecuación 1 muestran los coeficientes de regresión para la actividad y la ecuación de regresión que se ha instalado en los datos. La ecuación del modelo ajustado es

$$Actividad = 0,137 + 0,011 * E - 0,069 * I + 0,025 * E^2 - 0,028 * E * I + 0,085 * I^2$$

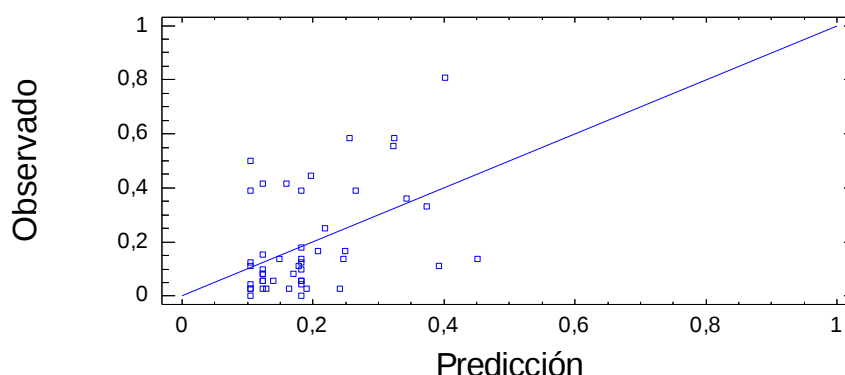
Donde

E Concentración de extracto de levadura

I Concentración de inductor (CuSO₄)

Los valores de las variables se especifican en sus unidades originales. En la Figura 6 se puede observar el gráfico de la comparación entre el modelo ajustado y los datos observados, se puede observar la dispersión de los datos, dando como resultado que el modelo propuesto no se ajuste a los datos experimentales.

Figura 6 Comparación entre los datos predichos y los calculados



La Tabla 11 muestra la combinación de niveles de los factores que maximiza la actividad sobre la región indicada.

Objetivo: Maximizar actividad de lacasa

Valor máximo: 0,53

Tabla 11 Respuesta optimizada

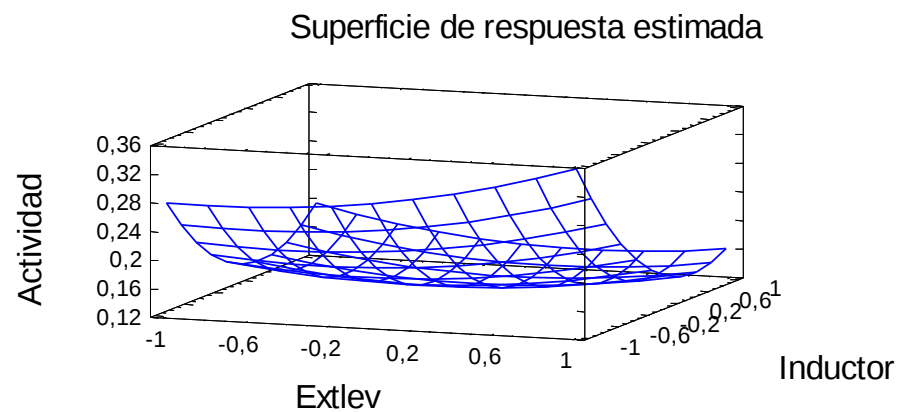
Factor	Bajo	Alto	Optimo
Ext. Lev	-1,4	1,4	1,4
CuSO ₄	-1,4	1,4	-1,4

Los valores de 1,4 y -1,4 corresponden a los puntos estrellas superior e inferior respectivamente. Para los intervalos evaluados en este experimento las

condiciones óptimas corresponden a una concentración de extracto de levadura de 1,7% y de CuSO_4 de 0,2mM.

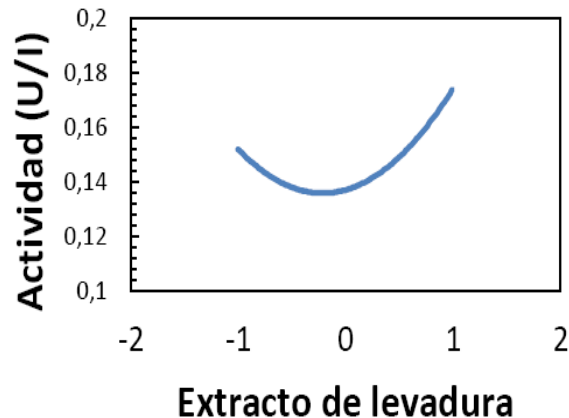
Estas condiciones se pueden observar en el gráfico de Superficie de respuesta estimada, Figura 7, donde se observa un ligero elevamiento en la concentración máxima de extracto de levadura y mínima de inductor.

Figura 7 Superficie de respuesta estimada



También se observa la influencia positiva del extracto de levadura sobre la producción de las lacasas, evidenciado en un aumento en la actividad enzimática, es decir a medida que aumenta la concentración del extracto de levadura se genera una mayor producción enzimática. La Figura 8 ilustra este comportamiento gráficamente.

Figura 8 Actividad vs % extracto de levadura

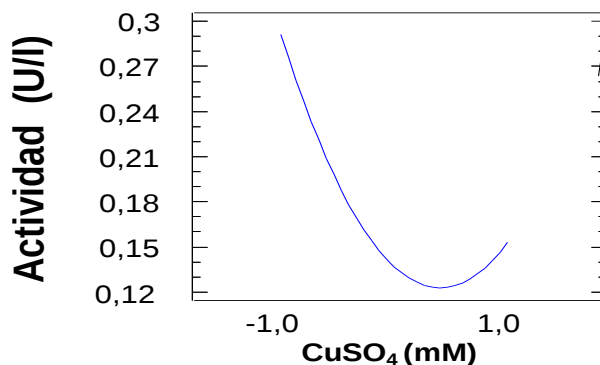


Este incremento en la producción de la actividad enzimática con la adición de extracto de levadura obedece a que el nitrógeno estimula el crecimiento de los microorganismos (Kachlishvili, Penninckx, Tsiklauri, & Elisashvili, 2005) y por tanto su disponibilidad facilita la síntesis de proteínas. Medeiros y otros realizaron un diseño de experimentos para estudiar la influencia de cinco variables en la producción de la lacasa de *P. ostreatus*. Entre estas variables se encuentra la concentración de extracto de levadura. Los resultados indican que el aumento de la concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo contribuyó a un aumento de la producción de lacasa. Los más altos niveles de actividad de la lacasa en el medio de cultivo se produjeron a valores de pH inicial de 6,0 y 6,5 y en presencia de 0,63% y 0,25% de extracto de levadura respectivamente. (Medeiros, Bento, Nunes, & Oliveira, 1999), en este trabajo se reporta el más alto nivel de actividad de la lacasa en presencia de 1,7% de extracto de levadura.

El incremento en la concentración de CuSO_4 , por su parte, ejerció un efecto negativo sobre la producción de las lacasas, evidenciado en una disminución en la actividad enzimática, es decir al pasar del nivel inferior al nivel superior de cobre,

se observó un decremento en la actividad enzimática, de hecho la mayor actividad enzimática 0,57 U/l se presentó a una concentración de 0,2 mM de CuSO_4 . La Figura 9 ilustra este comportamiento gráficamente.

Figura 9 Actividad vs CuSO_4



En los ensayos previos se observó que la adición de cobre producía un incremento significativo en la actividad enzimática con respecto al medio de control (ensayo B) y se ha reportado en otras investigaciones que contribuye a la estabilidad de la enzima y al aumento de la actividad catalítica. De acuerdo con Baldrian, el efecto positivo del cobre en la producción de lacasas se ha evidenciado en microorganismos como el *Trametes versicolor*, *Pleurotus sajor-caju*, *Polyporus ciliatus*, entre otros (Baldrian, 2003).

Sin embargo, la concentración de éste es un factor limitante y específico de cada microorganismo, ya que altas concentraciones tanto de cobre como de residuos ligninocelulósicos pueden afectar la cantidad de biomasa fúngica y el crecimiento micelial del hongo con la concomitante disminución en la producción de sus metabolitos (Arboleda & Mejía, 2010). Por ejemplo en el estudio realizado por Manavalan y otros con *G. lucidum* utilizando sulfato de cobre (CuSO_4) como inductor la producción de lacasa fue significativamente mayor con un valor de 1,5

Uml⁻¹ cuando el medio de cultivo fue modificado con CuSO₄ 0,4 mM, mientras que cuando se adicionó CuSO₄ 0,3 mM el aumento se vio disminuido a 1,2 Uml⁻¹ al igual que con CuSO₄ 0,5 mM a 1,02 Uml⁻¹ (Manavalan, Manavalan, Thangavelu, & Heese, 2013).

Niladevi y otros encontraron resultados similares a los presentados en esta investigación cuando evaluaron el efecto de la fuente de nitrógeno y el sulfato de cobre en la producción de lacasa con *Streptomyces psammoticus*, llegando a la conclusión que la producción de la lacasa aumenta con el incremento de la concentración de extracto de levadura y la disminución de la concentración de CuSO₄. A mayor nivel de extracto de levadura (0.5%) el efecto de diferentes niveles de la concentración de CuSO₄ en la producción de enzima era poco, mientras que a niveles más bajos de concentración de extracto de levadura disminuir el nivel de CuSO₄ daba como resultado un mejor rendimiento de la enzima. Estos investigadores obtuvieron un rendimiento máximo enzimático cuando la concentración de extracto de levadura era de 0,3% y la concentración de CuSO₄ de 2 mM. Indicaron que el mantenimiento de un nivel más bajo de CuSO₄ fue favorable para la producción de lacasa y esto se debía a que los niveles más altos de sulfato de cobre son tóxicos para la mayoría de los microorganismos (Niladevi, Sukumaran, & Prema, 2007).

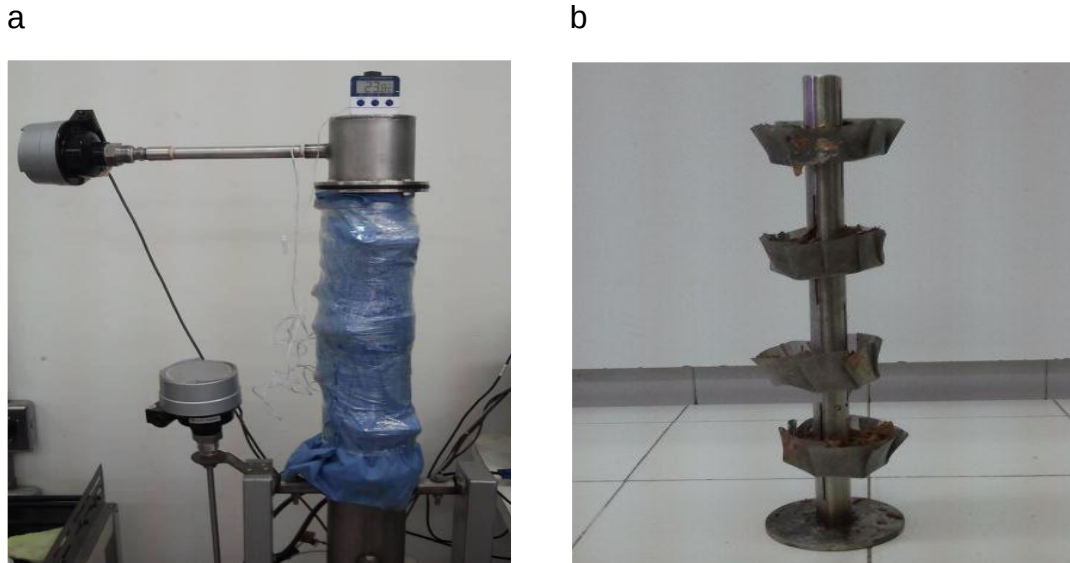
El efecto negativo del cobre también puede estar asociado a la interacción con ácidos nucleicos, alteración de los sitios activos de ciertas enzimas y la oxidación de componentes de membrana (Moreno Sandoval & Ospina, 2008).

5.4. PRODUCCIÓN DE LACASA EN UN BIORREACTOR DE COLUMNA

Con las condiciones que se muestran en la Tabla 12, las cuales corresponden a las condiciones que permitieron obtener una máxima actividad de lacasa para los intervalos evaluados en el diseño de experimentos, se realizó una fermentación

en un biorreactor de columna para observar el comportamiento del crecimiento de *Pycnopus sanguineus*. Para llevar a cabo esta fermentación se preparó una semana antes un preinóculo en aserrín en un reactor estático de 250 ml, tal como se prepararon las fermentaciones del diseño de experimentos y con las concentraciones de extracto de levadura y sulfato de cobre de la Tabla 11. La fermentación se realizó durante 15 días. El biorreactor se muestra en la Figura 10.

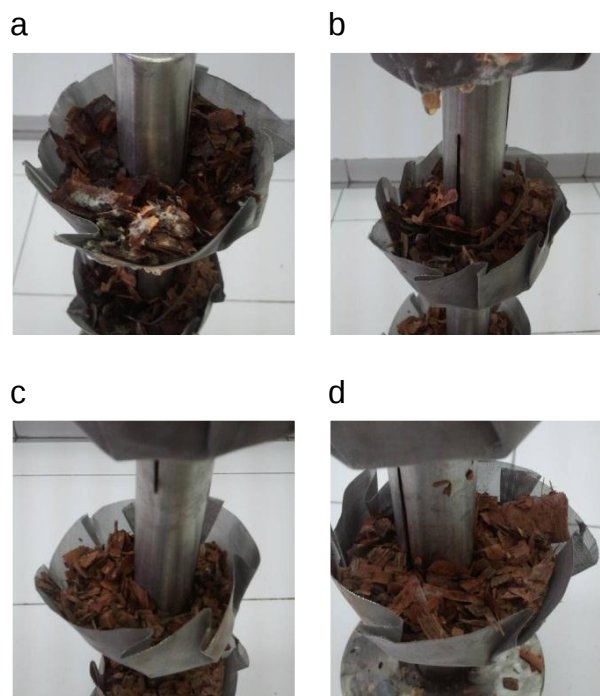
Figura 10 Biorreactor de columna. a, exterior; b, estructura interna.



Como se observa en la Figura 10b el biorreactor consta en su interior de 4 canastas donde se deposita el aserrín estéril con la solución de sales y el microorganismo. La fermentación se lleva a cabo a las mismas condiciones del preinóculo, ubicando 14 g de aserrín por canasta. El biorreactor cuenta con suministro de vapor para mantener las condiciones de humedad, el agua se mantuvo a 30°C.

En la Figura 11 se pueden observar las canastas interiores del biorreactor a los 15 días de fermentación. Como se observa en las imágenes el crecimiento del microorganismo se limitó a la canasta superior (Figura 11a); sin embargo, no se observa una invasión del microorganismo en el aserrín como se observaba en los sistemas estáticos utilizados en las fermentaciones anteriores. En la canasta superior se observa una acumulación de agua producto de los condensados del vapor ascendente, en las canastas siguientes se observa una pérdida de humedad del sustrato. En las canastas siguientes (Figura 11 b, c y d) no se observa crecimiento de *Pycnoporus sanguineus*.

Figura 11 Canastas interiores biorreactor a los 15 días de fermentación.



En este trabajo no se reportan datos de actividad de lacasa para la fermentación en el biorreactor debido a que no se dio en ninguno de los casos una colonización del sustrato. Sin embargo, en la literatura se encuentran datos de actividad de

lacasa en biorreactores de bandeja. Osma Cruz evaluó la producción de lacasas en una fermentación en estado sólido con *Trametes pubescens* usando cáscaras de semillas de girasol como soporte-substrato, obteniendo actividades máximas de lacasa de 30.000 U/L. Posteriormente, el proceso se escaló a biorreactores de bandeja (volumen de trabajo 150 mL) obteniendo actividades máximas de lacasa de alrededor de 40.000 U/L. (Osma cruz, 2009).

4. CONCLUSIONES

El aserrín tiene un contenido de humedad de 17.96% y un contenido de lignina de 31.05%

El extracto de levadura al 1,5% como fuente de nitrógeno aumenta la producción de lacasas en un 750%.

El CuSO_4 como inductor utilizado en una concentración de 0,4mM aumenta la actividad de la lacasa en un 110%. Mientras que el etanol utilizado en una concentración de 3% (v/v) aumenta la actividad de la lacasas en un 100%.

La concentración del extracto de levadura ejerce un efecto positivo en la producción enzimática, el punto máximo se dio a la concentración más alta utilizada 1,7%.

El CuSO_4 como inductor de la actividad enzimática de las lacasas, ejerce un efecto negativo a concentraciones superiores a 0,2mM.

Las condiciones que permitieron obtener una máxima actividad de lacasa de 0.806 U/l para los intervalos evaluados en este experimento fueron: concentración de extracto de levadura 1,7% y concentración de CuSO_4 0,2 mM.

5. RECOMENDACIONES

Se recomienda probar nuevas técnicas de extracción y condiciones para el análisis de la actividad, para observar si se obtienen mejores resultados a los expuestos en esta investigación.

Se recomienda analizar el sustrato antes y después de la etapa de fermentación para determinar el porcentaje de lignina degradado por el microorganismo y su incidencia en la actividad de la lacasa.

Se recomienda ampliar el rango de la concentración de los inductores para encontrar un punto máximo que beneficie la actividad de la lacasa.

Se recomienda realizar ensayos en el biorreactor de columna variando la temperatura y controlando la humedad en todo el biorreactor para analizar el crecimiento del *Pycnoporus sanguineus* en este.

Se recomienda realizar ensayos posteriores a la obtención de la lacasa en alguna de sus aplicaciones para analizar la efectividad de la enzima.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Urdapilleta, L., Paz, G. A., Rodríguez, A., Adame, M., Salgado, D., Salgado, J., y otros. (2010). *Pycnoporus sanguineus*, un hongo con potencial biotecnológico. *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. , 531-562.
- Adinarayana Kunamneni, A. B. (2007). Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological Applications . *FORMATEX* , 233-245.
- Álvarez Godoy, E., De Carvalho Rodrigues, J. C., Martins Alves, A. M., & Álvarez Lazo, D. (2007). ESTUDIO DEL CONTENIDO Y LA CALIDAD DE LA LIGNINA. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 9(2), 179-188.
- Amezcuca Castillo, F., Granados Baeza, M. J., & Tinoco Valencia, J. R. (2009). ESTUDIO DE LAS CONDICIONES HIDRODINÁMICAS DEL CULTIVO DE *Pleurotus ostreatus* CP50 EN FERMENTADOR DE 10L. *XVIII Seminario sobre Residencias Profesionales en el Área de Ingeniería Química Bioquímica*.
- Arboleda, C., & Mejia , A. I. (2010). Inducción de la actividad de lacasa en *Ganoderma* sp. y actividad antioxidante de su biomasa. *Revista Cubana de Farmacia*, 44.
- Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(1), 78-91.
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiol Review*, 30, 215-242.

- Camareroa, S., García, O., Vidal, T., Colomb, J., del Río, J. C., Gutiérrez, A., y otros. (2004). Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system .
- Carolina Arboleda Echavarría, A. I. (2010). Inducción de la actividad de lacasa en *Ganoderma* sp. y actividad antioxidante de su biomasa. *Revista Cubana de Farmacia*, 44(4), 519-532.
- Catalán, D. A. (2004). Evaluación técnico-económica de la aplicación de hongos de pudrición blanca (hpb) en pulpaje kraft . *Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero Forestal, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales*.
- Cea Muñoz, H. R. (2003). Caracterización de astillas y aserrín para una planta de tableros de partículas en Valdivia. *Tesis* . Valdivia, Chile.
- Cullen, T. K. (1998). Enzymology and Molecular Genetics of Wood Degradation by White-Rot Fungi . *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*, 273-307.
- Daljit, S. A., & Paramjit, K. G. (2001). Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. *Bioresource Technology* , 89-91.
- Dewan, S. S. (Enero de 2011). *bcc Research*. Recuperado el 20 de mayo de 2012, de Enzymes in Industrial Applications: Global Markets: <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030f.html>
- Ding, X. L. (2010). Effect of Cu^{2+} , Mn^{2+} and aromatic compounds on the production of laccase isoforms by *Coprinus comatus*. *Mycoscience*, 51, 68-74.

- E. Rosales, S. R. (2002). New uses of food waste: application to laccase production by *Trametes Hirsuta*. *Biotechnology Letters*, 24, 701–704.
- Eggert, C., Temp, U., & Eriksson, K.-E. L. (1996). The Ligninolytic System of the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterization of the Laccase. *Applied And Environmental Microbiology*, 1151–1158.
- Elisashvili, V., Parlar, H., Kachlishvili, E., Chichua, D., Bakradze, M., & Kokhraidze, N. (2001). Ligninolytic activity of Basidiomycetes grown under submerged and solid-state fermentation on plant raw material (sawdust of grapevine cuttings). *Adv Food*, 117-123.
- Fernández, J., Henao, L., Pedroza-Rodríguez, A., & Quevedo-Hidalgo, B. (2009). Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5. *Revista Colombiana de Biotecnología*.
- Global Industry Analysts, Inc. (9 de 02 de 2011). *Vocus/PRWEB*. Recuperado el 9 de 08 de 2011, de http://www.prweb.com/releases/industrial_enzymes/proteases_carbohydases/prweb8121185.htm
- K.N. Niladevi, R. N. (2009). Optimization of laccase production from a novel strain—*treptomyces psammoticus* using response surface methodology. *Microbiological Research* , 164 , 105—113.
- Kaal, E., Field, J., & Joyce, T. (1995). Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen sufficient media. *Bioresour Technol*, 133–139.
- Kachlishvili, E., Penninckx, M. J., Tsiklauri, N., & Elisashvili, V. (2005). Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot

- basidiomycetes under solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* , 1205-1215.
- Kumar, V. V., Kirupha, S. D., Periyaraman, P., & Sivanesan, S. (2011). Screening and induction of laccase activity in fungal species and its application in dye decolorization. *African Journal of Microbiology Research*, 1261 - 1267.
- Kunamneni, A., Bastelleros, A., Plou, F. P., & Alcalde, M. (2007). Fungal laccase-a versatile enzyme for biotechnological applications.
- Kunstmann, J. M. (2004). Determinación de factores ambientales para el crecimiento de dos hongos (*Lentinus edodes* y *Stereum hirsutum*) y su acción biodegradante sobre la madera de *Pinus radiata* y *Eucalyptus globulus*). *Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero Forestal, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales*.
- L. Acosta-Urdapilleta, G. A.-P.-V. (2010). *Pycnoporus sanguineus*, un hongo con potencial biotecnológico . *Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo*, 189-220.
- Litthauer, D., Van Vuuren, M. J., Van Tonder, A., & Wolfaardt, F. W. (2007). Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC108). *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 563–568.
- Liu, L., Lin, Z., Zheng, T., Lin, L., Zheng, C., Lin, Z., y otros. (2009). Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. *Enzyme and Microbial Technology*, 44, 426–433.
- Loera, C. O., Pérez, P. M., Barbosa, R. J., & Villaseñor, O. F. (2006). Laccases. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, 323-340.
- Manavalan, T., Manavalan, A., Thangavelu, K. P., & Heese, K. (2013). Characterization of optimized production, purification and application of

- laccase from *Ganoderma lucidum*. *Biochemical Engineering Journal* , 106–114.
- Mata H, M., & Soto, S. (9 de 3 de 2004). *Instituto Nacional de Biodiversidad*. Recuperado el 29 de 10 de 2011, de Especies de Costa Rica: <http://darnis.inbio.ac.cr/FMPro?-DB=UBIpub.fp3&-lay=WebAll&-Format=/ubi/detail.html&-Op=bw&id=6085&-Find>
- Mayera, A. M., & Staplesb, R. C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60 , 551–565.
- Medeiros, M., Bento, A., Nunes, A., & Oliveira, S. (1999). Optimization of some variables that affect the synthesis of laccase by *Pleurotus ostreatus*. *Bioprocess Engineering* , 483-487.
- Meza, J. C., Lomascolo, A., Casalot, L., Sigoillot, J. C., & Auria, R. (2005). Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar-cane.
- Meza, J. C., Lomascolo, A., Casalot, L., Sigoillot, J.-C., & Auria, R. (2005). Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar-canebagasse: Influence of ethanol vapours as inducer. *Process Biochemistry*, 40 , 3365–3371.
- Minussi, R. C., Pastore, G. M., & Durán, N. (2002). Potential applications of laccase in the food industry.
- Moldes, D., Gallego, P., Rodríguez Couto, S., & Sanromán, A. (2002). Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid.
- Moldes, D., Gallego, P., Rodríguez Couto, S., & Sanromán, A. (2003). Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsuta*. *Biotechnology Letters*, 25, 491–495.

- Moreno Sandoval, N., & Ospina, X. A. (2008). Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro reactivo 5 empleando pleurotus ostreatus inmovilizado en fique. Bogota: pontificia universidad javeriana 2008.
- Moreno, N., & Torres-Taborda, M. (2011). Producción de lacasas por fermentación en estado sólido a partir del Pycnoporus sanguineus. Medellín.
- Niladevi, K. N., Sukumaran, R. K., & Prema, P. (2007). Utilization of rice straw for laccase production by Streptomyces psammoticus in solid state fermentation. *J Ind Microbiol Biotechno*, 34, 665–674.
- Niladevi, K. N., Sukumaran, R., & Prema, P. (2007). Utilization of rice straw for laccase production by streptomyces psammoticus in solid-state fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34, 665–674.
- Osma cruz, j. f. (2009). Production of laccases by the white-rot fungus trametes pubescens for their potential application to synthetic dye treatment.
- Osma Cruz, J. F. (2009). PRODUCTION OF LACCASES BY THE WHITE-ROT FUNGUS TRAMETES PUBESCENS FOR THEIR POTENTIAL APPLICATION TO SYNTHETIC DYE TREATMENT. *Tesis*, 67. Tarragona.
- Osma, J. F., Rodriguez Couto, S., & Toca Herrera, J. L. (2007). *Effect of different organic nitrogen sources on laccase production by Trametes pubescens*.
- Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., & Rodríguez-Couto, S. (2011). Cost analysis in laccase production. *Journal of Environmental Management*, 1-6.
- Papinutti, V., Diorio, L., & Forchiassin, F. (2003). Production of laccase and manganese peroxidase by Fomes sclerodermeus grown on wheat bran.
- Pazarlıoğlu, N. K., Sarişikb, M., & Telefoncua, A. (2004). Laccase: production by Trametes versicolor and application to denim washing.

- Riva, S. (mayo de 2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *TRENDS in Biotechnology*, 24 (5), 219-226.
- Rodriguez Couto, S., & Sanroman, M. A. (2005). Application of solid state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical engineering Journal*, 22, 211–219.
- Rodríguez Couto, S., & Sanromán, M. Á. (2005). Coconut flesh: a novel raw material for laccase production by *Trametes hirsuta* under solid-state conditions. Application to Lissamine Green B decolourization. *Journal of food engineering*.
- Rodriguez Couto, S., & Toca Herrera, J. L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccase: A review.
- Rosales, E., Rodríguez Couto, S., & Sanroman, A. (2002). New uses of food waste: application to laccase production by *Trametes*. *Biotechnology Letters*, 24, 701-704.
- Selinheimo, E., Kruusa, K., Buchert, J., Hopia, A., & Autio, K. (2005). Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs.
- Sigma. (s.f.). *sigma-aldrich*. Recuperado el 4 de 10 de 2011, de http://www.sigmaaldrich.com/catalog/Lookup.do?N5=All&N3=mode+matchpartialmax&N4=laccase&D7=0&D10=laccase&N1=S_ID&ST=RS&N25=0&F=PR
- Tychanowicz, G. K., Zilly, A., Marques de Souza, C. G., & Peralta, R. M. (2003). Decolourisation of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonarius*. 39, 855-859.

- Ulloa, M., & Herrera, T. (1994). Pycnoporus. En *Etimología e iconografía de géneros de hongos* (pág. 229).
- Velasquéz Jimenez, J. A. (28 de Febrero de 2002). Producción de tableros de fibras a partir de Miscanthus sinensis. *Tesis Doctoral*. Tarragona, España.
- Vera, R. A. (2006). Medios de cultivo líquidos para el desarrollo de inoculos de hongos de pudrición blanca aplicables en biopulpaje kraft. *Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero en Maderas, Universidad de Chile, Facultad de Ciencia*.
- Vikineswary, S., Abdullah, N., Renuvathani, M., Sekaran, M., Pandey, A., & Jones, E. (2005). Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by Pycnoporus sanguineus.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., Romero-Gomez, S. d., Díaz-Godínez, G., & Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 157–167.