

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



“PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LINGNOLÍTICAS CON *Trametes polyzona* LMB TM5 MEDIANTE LA FERMENTACIÓN POR ADHESIÓN A SUPERFICIE EMPLEANDO RESIDUOS DE BOLAINA BLANCA”

Presentada por:

PAOLA FINETTI CASANOVA

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGA

Lima – Perú

2022

La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LINGNOLÍTICAS CON *Trametes
polyzona* LMB TM5 MEDIANTE LA FERMENTACIÓN POR
ADHESIÓN A SUPERFICIE EMPLEANDO RESIDUOS
DE BOLAINA BLANCA”**

Presentada por:

PAOLA FINETTI CASANOVA

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dra. Doris Elizabeth Zúñiga Dávila
PRESIDENTE

Dr. Víctor Juan Meza Contreras
MIEMBRO

Blgo. Roberto Ramos Chaupin
MIEMBRO

Ph.D. Gretty Katherina Villena Chávez
ASESORA

M.Sc. Yvette Ludeña Hinojosa
Co Asesora

La presente tesis fue financiada por INNOVATE PERU, en el marco del proyecto “Uso de residuos de la transformación de Bolaina blanca para la producción de enzimas celulolíticas para uso textil” a través del CONTRATO N° 063-INNOVATE PERU - IAPIP-2017

DEDICATORIA

A mi familia que me apoya en todo momento

A mis amigos que me motivaron a sustentar esta tesis

Al gato Wiskas que me enseñó salir de la matrix y saca siempre lo mejor de mí

AGRADECIMIENTOS

- Al Profesor Marcel Gutiérrez por permitirme ser parte del equipo del LMB.
- A mi asesora Gretty Villena por su apoyo y orientación durante la realización de la tesis.
- A mi co-asesora Yvette Ludeña por su ayuda en la elaboración de la tesis y el manuscrito.
- Al Profesor Víctor Meza Contreras que forma parte de mi jurado de tesis, sin embargo ya no se encuentra más con nosotros.
- A todo el equipo del Laboratorio de Micología y Biotecnología “Marcel Gutiérrez - Correa” por hacer tan amena mi estancia durante los tres años que estuve formándome como investigadora.
- A mí misma por nunca rendirme, por siempre estar allí para mí.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Fermentación por Adhesión a Superficies.....	4
2.2. Enzimas ligninolíticas producidas por hongos de podredumbre blanca	5
2.2.1 Lacasas.....	6
2.2.3 Manganeso Peroxidasa	6
2.2.3 Lignina Peroxidasa	7
2.3 Inmovilización de microorganismos en perlas de alginato	7
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN	9
3.2 MATERIALES	9
3.3 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	10
3.3.1 Preparación del inóculo	10
3.3.2 Preparación del medio de Fermentación por Adhesión a Superficies.....	11
3.3.3 Estandarización del medio de fermentación por adhesión a superficie.....	12
3.3.4 Cinética de degradación de lignina insoluble de la Bolaina blanca	13
3.3.5 Cinética de producción de enzimas lignolíticas durante el proceso de deslignificación	13
3.3.6 Inmovilización del micelio de <i>Trametes polyzona</i> LMB TM5 en una matriz de alginato.....	13
3.3.7 Ensayo de actividad enzimática de lacasas.....	14
3.3.8 Ensayo de actividad enzimática de manganeso peroxidasa.....	14
3.3.9 Ensayo de determinación de lignina peroxidasa	15
3.3.10 Determinación de Proteína Soluble	15
3.3 DISEÑO ESTADÍSTICO.....	15

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
4.1 ESTANDARIZACIÓN DEL MEDIO DE FERMENTACIÓN POR ADHESIÓN A SUPERFICIE PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS EMPLEANDO <i>Trametes polyzona</i> LMB TM5.....	17
4.1.1 Efecto del tamaño de partícula y de la fuente de nitrógeno en la producción de enzimas.....	17
4.1.2 Efecto de la concentración de inóculo inicial en la producción enzimática.....	21
4.1.3 Efecto de la concentración de CuSO ₄ en la producción de Lacasas.....	23
4.2 DEGRADACIÓN DE LIGNINA Y PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS CON <i>Trametes polyzona</i> LMB TM5 EN EL MEDIO DE FERMENTACIÓN ESTANDARIZADO	26
4.3 PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS DEL INÓCULO DE <i>Trametes polyzona</i> LMB TM5 INMOVILIZADO EN PERLAS DE ALGINATO EN LA FERMENTACIÓN POR ADHESIÓN A SUPERFICIE (FAS) PREVIAMENTE ESTANDARIZADO.....	31
V. CONCLUSIONES	36
VI. RECOMENDACIONES	37
VII. BIBLIOGRAFÍA	38
VIII. ANEXOS.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Peso seco de las diferentes concentraciones de inóculo de <i>Trametes polyzona</i> LMB TM5 evaluados en el proceso de fermentación por adhesión a superficie con tamaños de partícula de 0.5 mm y torta de soya como fuente nitrogenada	21
Tabla 2: Parámetros de productividad de Lacasas producidas por <i>Trametes polyzona</i> LMBTM5 en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado	28
Tabla 3: Parámetros de productividad de manganeso peroxidasa producida por <i>Trametes polyzona</i> LMBTM5 en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado.	28
Tabla 4: Parámetros de productividad de lignina peroxidasa producidas por <i>Trametes polyzona</i> LMBTM5 en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado.	28
Tabla 5: Cuantificación de la pérdida de peso y la tasa de degradación de lignina de Bolaina blanca de 0.5 mm durante un tiempo de incubación de 15 días con <i>Trametes polyzona</i> LMBTM5 en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado.	30
Tabla 6: Parámetros de productividad de lacasas, manganeso y lignina peroxidasa a las 360 horas de incubación, producidas por las perlas de alginato, deshidratadas y células libres de <i>Trametes polyzona</i> LMB TM5 en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado.	33
Tabla 7: Parámetros de productividad de Lacasas producidas por las perlas de alginato deshidratadas de <i>Trametes polyzona</i> LMB TM5 y almacenadas a 25°C durante 24, 120 y 240 h.	35
Tabla 8: Parámetros de productividad de Manganeso peroxidasa producidas por las perlas de alginato deshidratadas de <i>Trametes polyzona</i> LMB TM5 y almacenadas a 25°C durante 24, 120 y 240 h.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de lacasas durante la fermentación por Adhesión a Superficies con <i>Trametes polyzona</i> LMB TM5 conteniendo residuos de Bolaina blanca con tamaños de partícula de 0.5, 2.0 y 3.35 mm, suplementado con torta de soya o nitrato de amonio como fuente de nitrógeno.....	18
Figura 2. Producción de manganeso peroxidasa durante la fermentación por Adhesión a Superficies con <i>Trametes polyzona</i> LMB TM5 conteniendo residuos de Bolaina blanca con tamaños de partícula de 0.5, 2.0 y 3.35 mm, suplementado con torta de soya o nitrato de amonio como fuente de nitrógeno.....	19
Figura 3. Producción de lignina peroxidasa durante la fermentación por Adhesión a Superficies con <i>Trametes polyzona</i> LMB TM5 conteniendo residuos de Bolaina blanca con tamaños de partícula de 0.5, 2.0 y 3.35 mm, suplementado con torta de soya o nitrato de amonio como fuente de nitrógeno.....	20
Figura 4. Producción de lacasas empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partícula de Bolaina blanca de 0.5 mm y torta de soya como fuente de nitrógeno.....	21
Figura 5. Producción de manganeso peroxidasa empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partícula de Bolaina blanca de 0.5 mm y torta de soya como fuente de nitrógeno.	22
Figura 6. Producción de lignina peroxidasa empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partícula de Bolaina blanca de 0.5 mm y torta de soya como fuente de nitrógeno.	22

Figura 7. Producción de Lacasas empleando diferentes concentraciones de CuSO ₄ 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con un tamaño de partícula de 0.5 mm y torta de soya como fuente de nitrógeno.....	25
Figura 8. Producción de Manganese peroxidasa empleando diferentes concentraciones de CuSO ₄ 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con un tamaño de partícula de 0.5 mm y torta de soya como fuente de nitrógeno.....	25
Figura 9. Producción de Lignina peroxidasa empleando diferentes concentraciones de CuSO ₄ 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con un tamaño de partícula de 0.5 mm y torta de soya como fuente de nitrógeno.....	26
Figura 10. Producción de lacasas, manganese y lignina peroxidasa del medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado de <i>Trametes polyzona</i> LMB TM5.	27
Figura 11. Degradación de lignina insoluble llevada a cabo por <i>Trametes polyzona</i> LMB TM5 en cultivos de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizados.	30
Figura 12. Producción de lacasas, manganese y lignina peroxidasa utilizando perlas de alginato, perlas de alginato deshidratadas y células no inmovilizadas en un cultivo de la Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado a las 360 h.	31

|

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Con el análisis factorial se calculan, a partir de una matriz de observaciones y variables, unas nuevas variables (indicadas como factores, o dimensiones) que explican y resumen la información distribuida en la matriz original de datos. Se calculan tantos factores cuantas son las variables originarias, de los cuales pero solo los 2-3 primeros tienen un valor descriptivo, debido al mayor porcentaje de varianza que explican. Por eso, se pueden usar los dos primeros factores para describir las relaciones entre las observaciones (cada número en los gráficos corresponde a una muestra o medida), observando cómo estas se separan recíprocamente o se agrupan, en un solo plan factorial.....	48
Anexo 2: Comparación de la producción de lacasas empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente de nitrógeno.....	57
Anexo 3: Producción de manganeso peroxidasa empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente de nitrógeno.....	59
Anexo 4: Producción de lignina peroxidasa empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente de nitrógeno.	61
Anexo 5: Producción de Lacasas empleando diferentes concentraciones de CuSO ₄ 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente nitrogenada.	63

Anexo 6: Producción de manganeso peroxidasa empleando diferentes concentraciones de CuSO ₄ 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente nitrogenada.....	65
Anexo 7: Producción de Lignina peroxidasa empleando diferentes concentraciones de CuSO ₄ 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente nitrogenada.....	67
Anexo 8: Producción de lacasas, manganeso y lignina peroxidasa del medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado de <i>Trametes polyzona</i> LMB TM5.....	69
Anexo 9: Degradación de lignina insoluble llevada a cabo por <i>Trametes polyzona</i> LMB TM5 en cultivos de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado.	71
Anexo 10: Producción enzimática de lacasas y manganeso peroxidasa de las perlas de alginato de <i>Trametes polyzona</i> LMB TM5 en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado.	72
Anexo 11: Producción de lacasas, manganeso y lignina peroxidasa utilizando perlas de alginato y células no inmovilizadas en un cultivo de la Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado a las 360 horas.....	73

RESUMEN

Se utilizó la cepa *Trametes polyzona* LMB TM5 para la producción de enzimas lignolíticas (lacasas, manganeso y ligninaperoxidasa) en residuos de aserrín de Bolaina blanca (*Guazuma crinita*) en un Sistema de Fermentación por Adhesión a superficies (FAS) utilizando Fermentación en estado Sólido (FES). A través de la investigación realizada se estandarizaron las condiciones de la FES, incluyendo el tamaño de partícula, fuente nitrogenada orgánica e inorgánica, el % (v/v) de inóculo miceliar y la concentración de sulfato de cobre (CuSO₄) en el medio de cultivo. Los mayores títulos enzimáticos se obtuvieron con aserrín de tamaño de partícula de 0.5 mm, 7% w/w de torta de soya como fuente de nitrógeno y 5 mM de CuSO₄. La actividad de lacasas y lignina peroxidasa fue de 2.04 U g⁻¹ y 2.6 U g⁻¹, respectivamente las 360 horas de cultivo y la máxima actividad de manganeso peroxidasa se obtuvo a las 240 horas con un título de 0.72 U g⁻¹. Además, se determinó la capacidad de deslignificación de *T. polyzona* LMB TM5 en la FES estandarizada. Los resultados indicaron que la cepa tiene potencial para la degradación de lignina, registrándose una pérdida de 9.4% de lignina insoluble equivalente a 2.8 gramos a los 15 días de iniciado el proceso de incubación.

Además, se realizó la inmovilización de micelio de *T. polyzona* LMB TM5 en perlas de gel de alginato para la producción de semilla. Los cultivos inoculados con perlas de alginato registraron mayores títulos de lacasas en comparación con el uso de inóculo miceliar, obteniéndose 2.44 U g⁻¹ y 2.04 U g⁻¹, respectivamente. En el caso de manganeso y lignina peroxidasa la producción enzimática fue menor utilizando la matriz de alginato que en el de células libres obteniéndose 0.4 U g⁻¹ y 0.57 U g⁻¹ y 0.74 U g⁻¹ y 2.6 U g⁻¹, respectivamente. Finalmente se realizó la deshidratación de perlas de alginato a 37°C. Los resultados demostraron que la producción enzimática disminuyó progresivamente en relación al tiempo de almacenamiento.

Palabras claves: *Trametes polyzona* LMB TM5, enzimas lignolíticas, pretratamiento biológico de lignina, Fermentación en Estado Solido

ABSTRACT

Trametes polyzona LMB TM5 strain was used for the production of lignolytic enzymes (laccases, manganese and lignin peroxidase) in sawdust residues from Bolaina blanca (*Guazuma crinita*) in a Surface Adhesion Fermentation System (FAS) using Solid State Fermentation (FES). Through the research carried out, the conditions of the FES were standardized, including the particle size, organic and inorganic nitrogenous source, the % (v/v) of mycelial inoculum and the concentration of copper sulfate (CuSO_4) in the medium culture. The highest enzymatic titers were obtained with 0.5 mm particle size sawdust, 7% w/w soybean cake as nitrogen source and 5 mM CuSO_4 . Laccase and lignin peroxidase activity was 2.04 Ug^{-1} and 2.6 Ug^{-1} , respectively, at 360 hours of culture, and the maximum manganese peroxidase activity was obtained at 240 hours with a titer of 0.72 Ug^{-1} . In addition, the delignification capacity of *T. polyzona* LMB TM5 in the standardized FES was determined. The results indicated that the strain has a high potential for lignin degradation, registering a loss of 9.4% of insoluble lignin equivalent to 2.8 grams 15 days after the incubation process began.

In addition, the mycelium of *T. polyzona* LMB TM5 was immobilized on alginate gel beads for seed production. Cultures inoculated with alginate beads recorded higher laccase titers compared to the use of mycelial inoculum, obtaining 2.44 Ug^{-1} and 2.04 Ug^{-1} , respectively. In the case of manganese and lignin peroxidase, the enzymatic production was lower using the alginate matrix than in that of free cells, obtaining 0.4 Ug^{-1} and 0.57 Ug^{-1} and 0.74 Ug^{-1} and 2.6 Ug^{-1} , respectively. Finally, the alginate beads were dehydrated at 37°C . The results showed that enzyme production progressively decreased in relation to storage time.

Keywords: *Trametes polyzona* LMB TM5, biological pre treatment, lignolytic enzymes, Solid State Fermentation

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la industria maderera genera grandes cantidades de residuos sólidos, concentrándose la actividad del procesamiento principalmente en la Amazonía peruana. En el 2014, se ha registrado aproximadamente 40 000 m³ de residuos provenientes del procesamiento de la Bolaina blanca (*Guazuma crinita*) sólo en los departamentos de Ucayali y Loreto (Oficina de Gestión de la Información y Estadística 2016). La Bolaina blanca es un árbol que crece en la Amazonía peruana, produce madera liviana y su rápido crecimiento permite su comercialización a los 6-8 años (Rochon et al., 2007).

Los desechos del procesamiento de la madera actualmente causan contaminación del ambiente, ríos y bosques, provocando el deterioro de la salud pública (López et al., 2017). A fin de disminuir el impacto ambiental que generan estos residuos, se busca la utilización y valorización de los mismos, a su vez que se evita el impacto negativo de la rentabilidad de la Bolaina blanca. Sin embargo, su transformación o accesibilidad, continúa siendo un desafío, debido a su alta naturaleza recalcitrante (Baker et al, 2017).

Los residuos de madera están compuestos principalmente de celulosa, hemicelulosa y del polímero aromático lignina (Ohm et al., 2014). Estos residuos junto con los residuos agrícolas y otro tipo de residuos vegetales se les conoce como biomasa lignocelulósica (Ishizaki y Hasumi 2014). Para facilitar la hidrólisis del material lignocelulósico y su posterior aprovechamiento, se han desarrollado diferentes métodos de pretratamiento como los físicos, químicos y fisicoquímicos que incluyen: pretratamiento ácido, pre tratamiento alcalino, explosión de vapor, explosión de amoníaco, así como el pretratamiento biológico (Agbor et al., 2011).

El pretratamiento biológico es amigable con el ambiente, consume poca energía y requiere procedimientos y equipos simples (Sun y Cheng, 2002). Actualmente la degradación de la lignocelulosa se lleva a cabo principalmente con hongos de la podredumbre blanca (Agbor et al., 2011), ya que ellos tienen la capacidad de metabolizar todos los polisacáridos de la madera incluyendo la lignina. Esta capacidad está directamente relacionada con sus complejos enzimáticos extracelulares que incluyen hidrolasas, peroxidasas y

oxidorreductasas como las lacasas (Min *et al.*, 2015).

Para la degradación de material lignocelulósico y producción de enzimas lignolíticas, generalmente se utiliza la fermentación en estado sólido (FES) (Hölker y Lenz 2005), la cual es considerada como una variante de la Fermentación por Adhesión a Superficies propuesta por Gutierrez-Correa y Villena (2003). Este sistema de producción incluye el comportamiento fisiológico particular y diferencial, con una expresión génica particular para generar la adhesión de los hongos a superficies, incluyéndose la formación de biopelículas.

Esta estrategia ofrece ventajas sobre los cultivos en estado líquido, que presentan muchas limitaciones (Hölkery Lenz 2005). En la FES, los microorganismos se cultivan en sustratos sólidos, con alto contenido de humedad imitando el entorno natural al que se adaptan muchos hongos filamentosos (Hölkery Lenz 2005). Las ventajas que tiene la FES son: menores costos de capital, bajo gasto de energía, menor consumo de agua, alta productividad volumétrica y reproducibilidad que pueden ser aprovechadas y valorizadas por diferentes industrias (Liguori y Faraco 2016).

A través de esta investigación se propone la generación de valor agregado de los residuos de madera, a través de la producción de las enzimas lignolíticas en cultivos de fermentación por adhesión a superficie utilizando residuos de Bolaina blanca mediante pretratamiento biológico con *Trametes polyzona* LMB-TM5.

Objetivo principal

Producir enzimas lignolíticas con la cepa *Trametes polyzona* LMBTM5 en un Sistema de Fermentación por Adhesión a Superficies, utilizando residuos de Bolaina blanca mediante Fermentación en Estado Sólido (FES).

Objetivos específicos

- Estandarizar el proceso de producción de las enzimas lignolíticas a partir de residuos de Bolaina blanca, incluyendo variables como tamaño de partícula, fuente nitrogenada, porcentaje de inóculo y concentración de sulfato de cobre.
- Determinar el grado de deslignificación de los residuos de Bolaina blanca mediante tratamiento biológico con *Trametes polyzona* LMBTM5
- Desarrollar un sistema de inmovilización del inóculo miceliar de *Trametes polyzona* LMB TM5 para su uso estandarizado en el sistema de Fermentación por Adhesión a Superficies.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

La biomasa lignocelulósica consiste principalmente en 40-50% de celulosa, 25-30 % de hemicelulosa, 15-20% de lignina, elementos trazas como pectina, compuestos nitrogenados e ingredientes inorgánicos. La celulosa es un polímero lineal de glucosa con enlaces β 1,4 con una estructura cristalina agrupada de manera ordenada e insoluble en agua a temperatura ambiente. La hemicelulosa tiene diferentes polisacáridos de cadena lineal y ramificada, su degradación da diferentes monosacáridos como: xilosa, manosa, fucosa entre otros. La lignina es un polímero aromático reticulado, que pertenece a un compuesto heterogéneo polifenólico, compuesto por unidades de fenilpropano unidos por enlaces éter siendo unidades que no poseen una disposición definida (Chen et al., 2017).

Estos tres componentes principales están organizados en estructuras tan recalcitrantes presentes en las paredes celulares de las plantas, que la superación de esta resistencia ha sido considerada como el problema no resuelto más importante de las tecnologías verdes basadas en plantas (Gao et al., 2017).

En la actualidad se conocen dos grupos principales de hongos de descomposición de la madera: podredumbre blanca y podredumbre parda, que se categorizaron según sus patrones de degradación (Min et al., 2015). Los hongos de la pudrición blanca tienen la capacidad única para descomponer preferentemente la lignina en presencia de celulosa mediante la secreción de una serie de enzimas extracelulares, que actúan sinérgicamente con enzimas oxidativas incluyendo diferentes peroxidasas y lacasas. La eliminación de la lignina hace que la madera adquiera una tonalidad más blanquecina, tendiendo gradualmente a perder sus propiedades de solidez, conservando su estructura fibrosa tornándose esponjosa, filamentosa o laminada (Brethauer et al., 2017). Dentro del grupo de los hongos de la pudrición blanca se encuentran los géneros: *Irpex*, *Ceriporiopsis*, *Trametes*, *Phanerochaete*, *Pleurotus* (Blanchette et al., 1984).

El género *Trametes* está compuesto por hongos filamentosos que causan la podredumbre blanca. Además, este género se caracteriza por tener un sistema de hifas bi-trimíticas, hifas generativas, hialinas, paredes delgadas y principalmente cilíndricas, esporas lisas y no

amiloides sin verdaderos cystidios himeniales (Welti et al., 2012). La secuencia del genoma de *Trametes polyzona* LMB-TM5 realizada por el LMB-UNALM se encuentra depositada en la base de datos de Gen Bank Accession: PRJNA300351 ID: 300351. Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Dominio: Eukaryota
Reino: Fungi
Sub reino: Dikarya
Filo: Basidiomycota
Sub filo: Agaricomycotina
Clase: Agaricomycetes
Orden: Polyporales
Familia: Polyporaceae
Género: *Trametes*
Especie: *Trametes polyzona*

2.1 Fermentación por Adhesión a Superficies

La fermentación por adhesión a superficies (FAS) propuesta por Gutiérrez-Correa y Villena (2003), es un proceso de formación de biopelículas por acción de una comunidad de microorganismos que se adhiere a superficies bióticas o abióticas a través la expresión génica diferencial, originando la expresión de dos tipos de fenotipos: la formación de biopelículas en cultivos sumergidos y la fermentación en estado sólido, estos son dos procesos unificadores del concepto de biopelícula los cuales erradamente la bibliografía los ha separado. Este comportamiento fisiológico diferencial de los hongos adheridos corresponde principalmente a una mayor producción y secreción de enzimas. Por ello, la fermentación en estado sólido (FES), y la fermentación en biopelículas (FB) son variantes del mismo proceso relacionadas a la adhesión de los hongos a partículas sólidas (Gutiérrez-Correa y Villena 2003).

La fermentación en estado sólido (FES) generalmente se define como el crecimiento del microorganismo sobre materiales sólidos en ausencia o casi ausencia de agua libre (Cano Y Postigo et al., 2021). La Fermentación en Estado Sólido reproduce las condiciones naturales del crecimiento de los hongos, siendo este proceso estático sin consumo de energía mecánica (Rodríguez et al., 2005). Losane et al., (1985) mencionan que existen variables importantes que condicionan el éxito de la fermentación en estado sólido tales como: el contenido de

humedad del sustrato, la temperatura, aireación y pH. Los procesos FES presentan varias ventajas sobre la fermentación sumergida (FS), incluyendo características mejoradas, mayor rendimiento y productividad, fácil recuperación del producto y requisitos de energía reducidos (Gutiérrez-Correa y Villena, 2003). Varios estudios han registrado mayores rendimientos de enzimas modificadoras de la lignina en cultivo en estado sólido que en fermentación sumergida, al comparar la misma cepa y el mismo medio de cultivo. Siendo la FES la mejor estrategia reportada para el pretratamiento biológico fúngico (Cano y Postigo et al., 2021).

Con el fin de estandarizar los sistemas de cultivo en sustratos sólidos, se hace uso de diferentes estrategias de preparación de inóculo, incluyendo la liofilización de cepas o el uso de células inmovilizadas en matrices insolubles por adsorción o atrapamiento (Homolka, 2013). Las características de la matriz o soporte tales como: el tamaño, la porosidad y las características de la superficie, carga e hidrofobicidad, son extremadamente importantes para determinar la eficacia de la adsorción celular (Kilonzo et al., 2011). Se considera que los sistemas de células inmovilizadas pueden separarse en sistemas totalmente artificiales y naturales (Junter y Jouenne, 2004), aunque la inmovilización “natural” o “pasiva” es realmente un proceso biológico que da lugar a una biopelícula (Gutiérrez-Correa y Villena, 2003). Por lo tanto, la inmovilización de células se debe referir solamente a un sistema de ingeniería para la retención artificial de células sobre o dentro de un soporte o matriz (Gutiérrez-Correa y Villena, 2003).

2.2. Enzimas ligninolíticas producidas por hongos de podredumbre blanca

Los hongos de la pudrición blanca son los organismos más efectivos para la degradación de la lignina en la naturaleza (Eriksson et al., 1990). Pueden degradar completamente la lignina en dióxido de carbono, y han recibido una gran atención para la degradación biológica de la masa lignocelulósica. Los organismos degradadores de lignocelulosa más eficientes, descritos hasta la fecha, son los hongos filamentosos de la podredumbre blanca (Levin et al., 2004), que son capaces de resistir condiciones adversas durante la degradación de la madera (Asgher et al., 2016).

Las enzimas responsables de la degradación de la lignina son llamadas enzimas modificadoras de lignina (del inglés *lignin-modifying enzymes*, *LME*) las cuales conforman un sistema enzimático extracelular no específico y no estereo-selectivo compuesto

principalmente por lacasas, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa, que funcionan juntas con oxidasas productoras de H_2O_2 y con metabolitos secundarios (Tien y Kirk, 1988).

2.2.1 Lacasas

Las lacasas (benzediol: oxígeno oxidoreductasa EC 1.10.3.2), son una de las enzimas más antiguas descritas por primera vez por Yoshida a fines del siglo XIX. Pertenece a un grupo de polifenol oxidasas que contienen cobre en el sitio activo y generalmente se denominan multi-cobre oxidasas. La masa molecular de los monómeros de lacasa varía de 50 a 100 kDa (Claus, 2004). La enzima puede catalizar eficazmente la oxidación de una gama sorprendentemente amplia de compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos, junto con una reducción de oxígeno molecular (Baldrian 2006).

Los usos potenciales de las lacasas son numerosos debido a sus bajos requerimientos catalíticos y su versatilidad oxidativa. De hecho, estas enzimas catalizan un amplio espectro de reacciones, que incluyen reticulación de monómeros, degradación de polímeros y división del anillo de compuestos aromáticos (Cañas y Camarero, 2010). Debido a su baja especificidad de sustrato, las lacasas se consideran "catalizadores verdes" amigables con el medio ambiente con un gran número de aplicaciones en diversos campos textil, biorremediación, panificación, etc (Rodríguez Couto y Toca Herrera, 2006). Las lacasas que se emplean en varios sectores industriales, en la actualidad es empleada para el blanqueamiento de la fibra textil, además para el tratamiento de efluentes y biorremediación, así como en la industria alimentaria para el procesamiento y horneado de bebidas, finalmente también es empleada en la industria maderera para la degradación de la lignina (Tonin et al., 2016).

2.2.3 Manganeso Peroxidasa

La peroxidasa dependiente de manganeso (MnP, EC 1.11.1.13) es una glicoproteína que contiene un grupo prostético hemo que se encuentra en múltiples formas con un peso molecular típico de 40 a 50 kDa (Hofrichter, 2002). Cataliza la oxidación de Mn (II) en Mn (III) requiriendo de H_2O_2 . Siendo el Mn (III) un oxidante fuerte, que puede actuar sobre una gran variedad de compuestos fenólicos (Wong et al., 2009). Se sabe que esta enzima es producida por ciertas ordenes como: Agaricales, Corticiales, Polyporales, Hymenochaetales y, hasta el momento, no se ha informado de algún otro microorganismo (Janusz et al., 2013).

Además de la función de despolimerización de la lignina, esta enzima posee un gran potencial para aplicaciones de remediación de desechos industriales, como la degradación

de contaminantes industriales refractarios (Hofrichter, 2002).

2.2.3 Lignina Peroxidasa

La lignina peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14) es una hemoproteína monomérica con una masa molecular de alrededor de 40 kDa. Su ciclo catalítico es similar al de otras peroxidases, siendo dependiente de peróxido de hidrógeno. Está involucrada en la despolimerización de la lignina y fue descrita por primera vez en el hongo ligninolítico *Phanerochaete chrysosporium* (Wong et al., 2009). Esta enzima escinde los compuestos fenólicos y no fenólicos de la lignina oxidándolos y empleando peróxido de hidrógeno.

La lignina peroxidasa es un eficaz degradador de contaminantes con un alto potencial óxido-reductor no específico, es un potencial agente reductor de compuestos xenobióticos, que generalmente son difíciles de escindir usando otras peroxidases (Higuchi, 1993). Además, es capaz de oxidar el alcohol veratríl y modelos diméricos no fenólicos de lignina (Wariishi et al., 1991).

2.3 Inmovilización de microorganismos en perlas de alginato

Muchos microorganismos son capaces de adherirse a diferentes superficies en la naturaleza, siendo la inmovilización una técnica que imita este fenómeno (Kourkoutas et al., 2004). Esta técnica tiene múltiples usos en procesos continuos en los cuales las células, al igual que las enzimas, son inmovilizadas y empleadas como biocatalizadores.

La inmovilización de células y enzimas permite obtener altas cargas de biomasa y actividad celular para la fermentación, además de mejorar su estabilidad, vida útil y permitir su reutilización (Mateo et al., 2007). La matriz de alginato es ampliamente empleada por este método, no es tóxica, es altamente biocompatible, es un polímero de bajo costo para la encapsulación y posee una calidad de gelificación leve (Goel et al., 2006).

El alginato es un polisacárido lineal compuesto de subunidades monoméricas alternas de ácido manurónico y ácido gulurónico, proveniente de algas marinas y fuentes bacterianas. Se extrae principalmente de *Phaeophyta*, y no reacciona con macromoléculas biológicas. Entre los biopolímeros disponibles, el alginato es de uso más frecuente para propósitos de microencapsulación (Bedade et al., 2019).

La literatura ha reportado diversos tipos de aplicaciones del atrapamiento de células en matrices de alginato como: inmovilización con alginato de células de *Halomonas* y

Aneurinibacillus eficientes en la degradación del etilbenceno (Parameswarappa et al., 2008), fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* (Akillioglu y Gökmen, 2014) y la deslignificación biológica y la sacarificación simultánea de la paja de arroz con células inmovilizadas de *Trichoderma viride* (Karimiet al., 2017). Todos estos trabajos obtuvieron mejores resultados cuando emplearon sistemas de células inmovilizadas con respecto al uso de células libres.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo realizó en el Laboratorio de Micología y Biotecnología “*Marcel Gutiérrez-Correa*” (LMB) perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2 MATERIALES

a. Material de vidrio

- Cubetas de espectrofotómetro
- Matraces erlenmeyer de 250 ml
- Matraces Kitazato de 500 ml, 1000 ml y 2000ml
- Mechero
- Perlas de vidrio de 3 y 12 mm de diámetro
- Placas Petri 90 mm
- Probetas de 1000 ml, 100 ml y 50 ml
- Vaso de precipitado de 50 ml, 100 ml y 1000 ml

b. Material de plástico

- Puntas de micropipetas de 20-200 μ l, 100-1000 μ l
- Pipetas graduadas de 1 ml y 5 ml
- Tubos Corning de 50 ml, 15 ml
- Micropipetas de 20-200 μ l, 100-1000 μ l Microtubos de 2 ml
- Jeringa de 20 ml

c. Otros materiales

- Sacabocados 10 mm de diámetro
- Gorro
- Gradilla
- Algodón
- Asa de Köll

- Guantes de látex
- Mascarilla
- Aguja n° 18
- Papel Filtro

d. Equipos

- Agitador magnético
- Autoclave
- Balanza analítica digital
- Baño maría
- Cámara de flujo laminar
- Deshidratador eléctrico Blandik
- Estufa
- Espectrofotómetro UV/Visible
- Horno de secado
- Horno microondas
- Incubadora de 28°C
- Microscopio óptico
- Refrigeradora
- Potenciómetro
- Agitador orbital

e. Material Biológico

Cepa LMB TM5 *Trametes polyzona* aislada de muestras de suelo del departamento de Tingo María (Cerrón et al., 2015), colección del cepario del Laboratorio de Micología y Biotecnología.

3.3 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.3.1 Preparación del inóculo

La formación de inóculo de *T. polyzona* LMB TM5 se realizó en un medio de cultivo líquido de acuerdo a lo establecido por Cerrón et al., (2015). Se sembró la cepa LMBTM5 en placas Petri con agar extracto de malta y se incubó a 28 °C durante 96 horas. La composición del medio de cultivo líquido por litro fue la siguiente: glucosa 7 g, peptona 3 g, extracto de levadura 2 g y extracto malta 2 g. Se ajustó el medio a pH 6. Luego con ayuda de un sacabocado se tomaron tres discos de 1cm de diámetro y se introdujeron en matraces de 250

ml conteniendo 50 ml de medio malta y 6 esferas de vidrio de 12 mm de diámetro. Los matraces conteniendo discos de agar se incubaron a 28 °C en agitación constante a 175 rpm durante 72 horas. Se colectó el contenido de cada matraz en un tubo cónico de 50 ml, se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm y se descartó el sobrenadante conservándose la biomasa. Se añadió perlas de vidrio de 3 mm de diámetro y NaCl 0.85% en los tubos con biomasa en una proporción de volumen de 1:4:2 respectivamente. Se agitaron los tubos en *vórtex* durante 1 minuto a 2000 rpm. Esta suspensión de micelio se utilizó como inóculo.

3.3.2 Preparación del Medio de Fermentación por Adhesión a Superficies

a) Estandarización del tamaño de partícula de los residuos de Bolaina blanca

Se evaluaron tres tamaños diferentes de partículas de Bolaina blanca, los cuales se obtuvieron por un procedimiento de tamizado empleando tamices de malla de: 0.5, 2.0 y 3.35 mm. Las partículas de Bolaina blanca obtenidas se esterilizaron y se usaron como sustratos para la fermentación por adhesión a superficies.

b) Esterilización de los residuos de Bolaina blanca

Previo a la esterilización, los residuos de Bolaina blanca se colocaron en una probeta de 200 ml. Seguidamente, se vertió en un matraz de 2 L conteniendo 1000 ml de agua destilada, se selló y se autoclavó a 121°C por 15 minutos. Después de esta etapa, los residuos inicialmente se enjuagaron con agua de caño y luego con agua destilada. Finalmente, se dejaron secar en una estufa a 50°C por 48 h.

c) Cálculo de la densidad aparente de los diferentes tamaños de partícula

Se determinó la densidad aparente de los residuos de Bolaina blanca de 0.5, 2.0 y 3.35 mm. El cálculo de la densidad aparente de cada tamaño de partícula elegida, se realizó de la siguiente manera: se colocaron los residuos de Bolaina blanca secos en una probeta de vidrio hasta llegar a un volumen de 100 ml y se pesó. Este procedimiento se repitió 5 veces. Luego, se procedió a realizar el cálculo de la densidad aparente con el peso respectivo de los residuos dividido entre 100 ml del volumen usado.

d) Formulación del medio de Fermentación por Adhesión a Superficies

Se emplearon matraces de 250 ml conteniendo: 5g residuos de Bolaina blanca tamizada y esterilizada, como fuente nitrogenada se utilizó 5% p/p de nitrato de amonio (inorgánico) o 7% p/p de torta de soya (orgánica) dependiendo del tratamiento, 15 ml de solución de sales minerales para alcanzar la humedad requerida. La composición de sales minerales por 100

ml fue: CaCl_2 0.03 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g y KH_2PO_4 0.2 g.

Recuperación de enzimas

La recuperación de las enzimas se realizó añadiendo a los matraces 50 ml de tampón acetato 50 mM (pH 4.8) y agitando hasta disgregar todo el medio. Luego se realizó una separación sólido y líquido utilizando un tamiz, y el sobrenadante se filtró al vacío con papel de filtro. Se colectaron los filtrados en tubos de 50 ml, se centrifugaron a 4°C y se preservaron a -20°C para su posterior uso en los ensayos de actividad enzimática y determinación de proteína soluble

3.3.3 Estandarización del medio de fermentación por adhesión a superficies

- a) Ensayo de determinación de fuente de nitrógeno y tamaño de partícula para la producción de enzimas lignolíticas en el medio de fermentación

Para determinación de la fuente de nitrógeno óptima, se emplearon dos fuentes de nitrógeno: 0.35 g de torta de soya ó 0.1 g de nitrato de amonio. Se añadieron 5 ml de inóculo y 3 ml de agua destilada estéril y se incubaron a 28°C por 120, 240 y 360 horas.

Para determinar el tamaño de partícula óptimo, se utilizaron 5 gramos de residuos de madera con tamaño de partícula de 0.5, 2.0 y 3.35 mm, 0.35 gramos de torta de soya y 0.1 gramos de nitrato de amonio y 7 ml de sales minerales. Luego se añadieron al medio 5 ml de inóculo y se incubaron a 28°C por 120, 240 y 360 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

- b) Ensayo de determinación de la concentración óptima de sulfato de cobre (CuSO_4) para inducir la producción de lacasas

Para la determinación óptima de CuSO_4 se empleó el medio de fermentación que contenía 5 g residuos de Bolaina blanca de 0.5 mm, 0.35 g de torta de soya y 7 ml de solución de sales minerales. Se añadieron diferentes concentraciones de CuSO_4 2, 3, 4 y 5 mM. Luego se añadieron 5 ml de inóculo y se incubó a 28°C por 120, 240 y 360 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

- c) Ensayo de determinación de la concentración óptima de inóculo inicial

Para la determinación de inóculo inicial requerido se empleó el medio de fermentación, al cual se añadieron 5, 10, 15 y 20% v/v de inóculo. Luego se emplearon diferentes volúmenes de agua destilada para completar los 10 ml de líquido y ajustar la humedad al 80%. Se incubaron a 28°C por 120, 240 y 360 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.3.4 Cinética de degradación de lignina insoluble de la Bolaina blanca

La determinación de la lignina se realizó en el laboratorio de Pulpa y Papel de la Universidad Agraria La Molina utilizando la norma TAPPI 222. A través del fraccionamiento químico utilizando ácido sulfúrico al 72% se determinó la lignina insoluble en ácido de los residuos de la Bolaina blanca.

Para evaluar la degradación de lignina insoluble de los residuos de Bolaina blanca por la cepa LMB-TM5 se empleó el medio de fermentación por adhesión a superficie estandarizado y las muestras fueron tomadas a los 0, 5, 10 y 15 días de cultivo.

3.3.5 Cinética de producción de enzimas lignolíticas durante el proceso de deslignificación

Para cuantificar la producción de enzimas durante el proceso de deslignificación se emplearon matraces de 250 ml conteniendo el medio de fermentación. Se incubaron los matraces a 28 °C y se colectaron tres matraces cada 120 horas. Por consiguiente, la producción enzimática se evaluó a las 0, 120, 240, 360 horas de cultivo. Las enzimas se recuperaron con 50 ml de buffer acetato 40 mM pH 4.5 y se filtró en una bomba de vacío utilizando papel filtro de paso medio. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta realizar la cuantificación de la actividad enzimática de lacasas, manganeso peroxidasas y lignina peroxidasas.

3.3.6 Inmovilización del micelio de *Trametes polyzona* LMB TM5 en una matriz de alginato

a) Elaboración de las perlas de alginato de *Trametes polyzona* LMB TM5

Para la inmovilización, se realizó la producción del inóculo de *T. polyzona* en cultivo líquido de acuerdo a lo establecido por Cerrón et al., (2015). Una vez obtenido el inóculo, se colectó el contenido de cada matraz en un tubo cónico de 50 ml, se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm y se descartó el sobrenadante conservándose 5 ml de biomasa, la cual fue resuspendida en 5 ml NaCl 0.85%. A la biomasa resuspendida se añadieron 5ml de solución de alginato al 4% (p/v), previamente esterilizada. Esta mezcla de biomasa, NaCl y alginato fue cargada en una jeringa estéril de 20 ml con aguja N° 18 y se vertió gota a gota sobre una solución de CaCl₂ 0.1 M para obtener perlas gelificadas de 3 mm de diámetro.

b) Deshidratación de las perlas de alginato de *T. polyzona* a 37°C durante 72 horas

La deshidratación de las perlas de alginato de *T. polyzona*, se llevó a cabo en una estufa a 37± 1 °C. Las perlas gelificadas se almacenaron en tubos de centrifuga de 50 ml, las cuales

tenían un tampón de algodón para permitir el intercambio con el aire caliente y evitar la contaminación. El proceso de secado se llevó a cabo durante 72 horas y se almacenaron en la oscuridad a 25°C.

- c) Evaluación del crecimiento y producción de enzimas lignolíticas del micelio de *T. polyzona* inmovilizado en perlas de alginato deshidratadas

Para reactivar las perlas deshidratadas se suspendieron en 1 ml de agua destilada estéril, durante 30 minutos. Luego fueron vertidas en la parte central de una placa petri con agar malta y en el medio de fermentación estandarizado. Se procedió a realizar mediciones del crecimiento del micelio en placa petri cada 24 horas durante diez días comparándose con el crecimiento de las perlas no deshidratadas. Además se procedió a cuantificar la producción enzimática en el medio de fermentación estandarizada utilizando como inóculo la biomasa inmovilizada luego de 10 días de ser cultivadas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

3.3.7 Ensayo de actividad enzimática de lacasas

El ensayo de determinación de la actividad de lacasa está basada en lo reportado por Niku-Paavola et al. (1990), Shin y Lee (2000) y Souza et al. (2011). El sustrato de la reacción empleado fue 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS). La mezcla de reacción contenía: 600 µl de buffer acetato 40 mM pH 4.0, 200 µl muestra adecuadamente diluida y 200 µl ABTS 1mM. La reacción se llevó a cabo por 2 minutos a 25 °C. Para detener la reacción se añadió 300 µl H₂SO₄ 1 M. El producto coloreado de la reacción se detectó a través de espectrofotometría a una longitud de onda de 420 nm. Para los cálculos de la actividad se utilizó un coeficiente de extinción molar de 36.000 M⁻¹cm⁻¹ para el ABTS oxidado. Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que es necesaria para oxidar 1 µmol de ABTS por minuto.

3.3.8 Ensayo de actividad enzimática de manganeso peroxidasa

El ensayo de determinación de actividad de manganeso peroxidasa está basado en lo reportado por Castillo et al. (1994). En la reacción de este ensayo se utilizaron dos sustratos: 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) y 3- (dimethylamino) benzoic acid (DMAB). La mezcla de reacción contenía: 250 µl de buffer succinato-lactato 400 mM pH 4.5, 50 µl de MnSO₄ 3 mM, 250 µl de DMAB 3.96 mM, 250 µl de MBTH 0.28 mM, 100 µl de H₂O₂ 0.1 mM y 150 µl de muestra adecuadamente diluida. Para detener la reacción se usó H₂SO₄ 1 M. El producto de la reacción se detectó a través de espectrofotometría a una

longitud de onda de 590 nm. Para los cálculos de la actividad se utilizó un coeficiente de extinción molar de $53000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el sustrato oxidado. Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que es necesaria para producir $1 \mu\text{mol}$ de producto por minuto.

3.3.9 Ensayo de determinación de lignina peroxidasa

El ensayo para la determinación de la actividad enzimática de lignina peroxidasa está basado por lo reportado por Linko y Haapala (1993). En este ensayo el sustrato empleado fue veratryl alcohol. La mezcla de reacción contenía: $300 \mu\text{l}$ de buffer tartrato 0.393M pH 3.0, $400 \mu\text{l}$ de agua destilada, $200 \mu\text{l}$ de muestra adecuadamente diluida, $100 \mu\text{l}$ de veratryl alcohol 4 mM y $65 \mu\text{l}$ de H_2O_2 54 mM . La reacción se detuvo con $500 \mu\text{l}$ de H_2SO_4 1 M . El producto de la reacción, veratraldehído, se detectó a través de espectrofotometría a 310 nm . Para los cálculos de la actividad se utilizó un coeficiente de extinción molar de $9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para oxidar veratryl alcohol. Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que es necesaria para oxidar $1 \mu\text{mol}$ de veratryl alcohol por minuto.

3.3.10 Determinación de Proteína Soluble

La concentración de proteína soluble se determinó por el método de Lowry (Lowry et al., 1951), empleando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar disolviéndose 1 gr en 100 ml de agua destilada. Se elaboraron tres soluciones: (i) solución A (Na_2CO_3 al 2% en 1 M de NaOH), (ii) solución B1 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5%) y (iii) solución B2 (tartrato de sodio 1%). Todas estas soluciones se mezclaron en una proporción $100:1:1$ respectivamente para generar la Solución C. Para la reacción se emplearon $200 \mu\text{L}$ de muestra, $1000 \mu\text{L}$ de solución C, se incubó por 10 minutos y se añadió $400 \mu\text{L}$ de Folin 1N , se incubó por 30 minutos y luego se midieron las absorbancias de las muestras a 550 nm .

3.4 DISEÑO ESTADÍSTICO

Para determinar diferencias significativas en el efecto del empleo de diferentes tamaños de partícula y la adición de diferentes fuentes de nitrógeno, se realizó un análisis factorial FAMD (Factor Analysis of Mixed Data, <http://www.sthda.com/>) en R studio (<https://www.rstudio.com/>). Este análisis es una estadística descriptiva que utiliza datos cuantitativos y cualitativos, basándose sobre un análisis de componentes principales y un análisis de correspondencia múltiple. Se representan las observaciones (muestras) en un espacio de 2 ó 3 nuevos factores. Estas son nuevas variables que explican una parte

importante de la varianza (σ^2) distribuida en toda la matriz de datos original. Se atribuyen los valores de estas nuevas dimensiones (factores) a las observaciones, caracterizando los factores por sus correlaciones con las variables originales. Se puede así repartir las observaciones en un nuevo espacio de pocas dimensiones identificando relaciones presentes, pero difíciles a identificarse, en la matriz original con múltiples variables.

A excepción del análisis factorial para evaluar el efecto del tamaño de la partícula y la adición de diferentes fuentes de nitrógeno; los análisis de datos fueron llevados a cabo con el programa Minitab 17. Para los análisis estadísticos se consideró un nivel de confianza de 95% ($\alpha=0.05$) y la hipótesis nula se rechazó considerando el p-valor ≥ 0.05 .

En caso de comparar más de tres tratamientos se empleó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias significativas entre los tratamientos. De existir diferencias significativas se procedió a usar la prueba de Tukey para establecer diferencias entre las medias.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ESTANDARIZACIÓN DEL MEDIO DE FERMENTACIÓN POR ADHESIÓN A SUPERFICIE PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS EMPLEANDO *Trametes polyzona* LMB TM5

4.1.1 Efecto del tamaño de partícula y de la fuente de nitrógeno en la producción de enzimas

El tamaño de partícula y la fuente de nitrógeno son requerimientos primordiales para el crecimiento y desarrollo de los hongos, a la vez son considerados como factores importantes en la producción enzimática. Pandey (2003) menciona que en el proceso de FES, el sustrato sólido no sólo suministra los nutrientes al cultivo microbiano, sino que también sirve como soporte para el crecimiento celular. Además, la producción enzimática depende de las propiedades físicas de los materiales, incluyendo el área superficial, la geometría y el tamaño de las partículas.

Los resultados de la producción de lacasas obtenidas para cada tamaño de partícula, fuente de nitrógeno (torta de soya o nitrato de amonio) y tiempo de incubación se muestran en la Figura 1. La mayor producción de lacasas se obtuvo con un tamaño de partícula de 0.5 mm y con un tiempo de incubación de 120 horas, alcanzando 0.4 U/g empleando como fuente de nitrógeno torta de soya y nitrato de amonio. A las 240 horas disminuye la producción enzimática alcanzando 0.3 U/g con ambas fuentes nitrogenadas y a las 360 horas se obtiene 0.3 U/g y 0.1 U/g empleando torta de soya y nitrato de amonio, respectivamente. La disminución de la producción de lacasas en el medio puede estar relacionada con el consumo de nitrógeno, alcanzando probablemente concentraciones bajas a las 240 h y 360 h. Pannu y Kapoor (2014) resaltan que la producción de lacasas en hongos se promueve a través de la formulación de un medio rico en nitrógeno en lugar de medios limitados en éste.

El trabajo realizado por Aydinoğlu et al. 2013 quienes utilizaron *Trametes versicolor* y hojas de oliva como sustrato en un sistema de fermentación en estado sólido reportaron títulos enzimáticos de 276 U/g y 238.2 U/g a las 600 horas utilizando extracto de levadura y torta de soya, respectivamente. Sin embargo en esta investigación los títulos enzimáticos máximos

obtenidos de lacasas fueron de 0.4 U/g a las 120 horas, resultando 595 veces menos y a casi la mitad del tiempo de incubación que el empleado por los investigadores mencionados se obtuvo 793 veces menores títulos de esta enzima. Por lo tanto, los resultados encontrados en este trabajo en los tiempos evaluados son muchos menores y pueden estar relacionados con la capacidad metabólica de *Trametes polyzona* LMB TM5 o probablemente con la concentración de la fuente de nitrógeno empleada en el medio de fermentación.

Xin y Gen (2011) investigaron el efecto del tamaño de partícula durante la fermentación en estado sólido de *Trametes versicolor* utilizando residuos hortícolas con tamaños de partícula de 0.2, 0.2-0.5 y 0.5 mm, obteniendo a las 168 horas de incubación 1.87 U/g de lacasas con el tamaño de partícula de 0.5 mm, siendo 1.4 veces mayor que los otros tamaños empleados. Sin embargo, en este trabajo de investigación, se obtuvo 0.4 U/g de lacasas siendo 4.7 veces menor a lo reportado por el trabajo de Xin y Gen (2011).

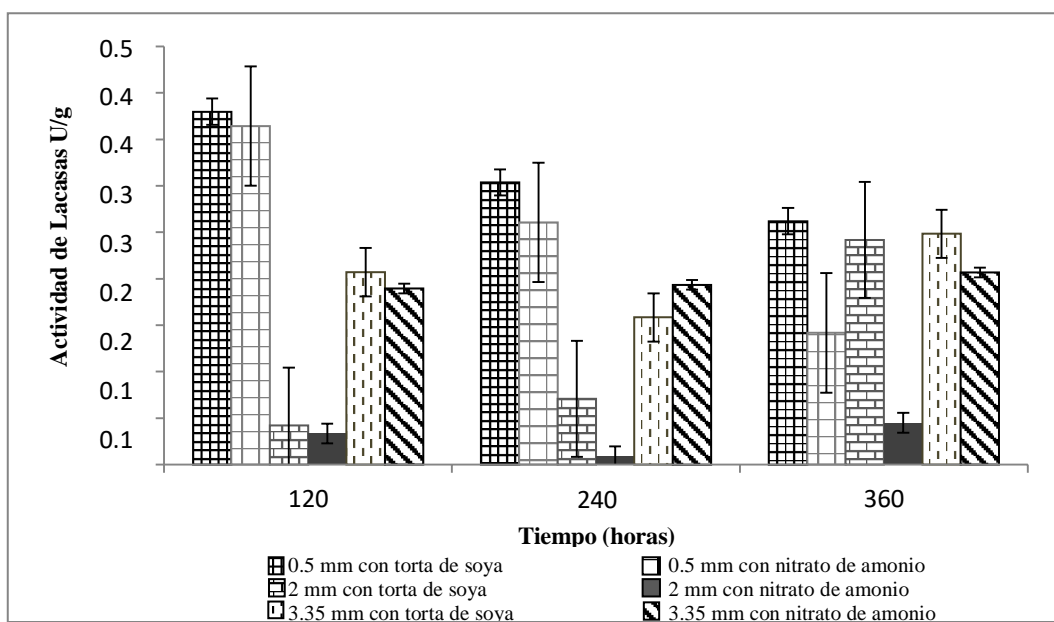


Figura 1. Producción de lacasas durante la fermentación por Adhesión a Superficies con *Trametes polyzona* LMB TM5 conteniendo residuos de Bolaina blanca con tamaños de partícula de 0.5, 2.0 y 3.35 mm, suplementado con torta de soya o nitrato de amonio como fuente de nitrógeno.

Los resultados de la producción de manganeso peroxidasa obtenidos para cada tamaño de partícula, fuente de nitrógeno (torta de soya o nitrato de amonio) y tiempo de incubación se muestran se muestran en la Figura 2. La mayor producción se obtuvo con un tamaño de partícula de 0.5 mm utilizando como fuente de nitrógeno torta de soya alcanzándose títulos de 0.41 U/g a las 240 horas, siendo 2.2 veces mayor que empleando nitrato de amonio, además de ser 1.6 y 1.5 veces mayor empleando torta de soya con los tamaños de partícula de 2.0 y 3.35 mm respectivamente. A las 360 horas los títulos alcanzados no presentan

diferencias significativas con respecto a las 240 horas empleando como tamaño de partícula 0.5 y 2.0 mm y torta de soya. Mientras que a las 120 horas la producción enzimática tuvo títulos muy bajos, comparados con los mayores periodos de incubación.

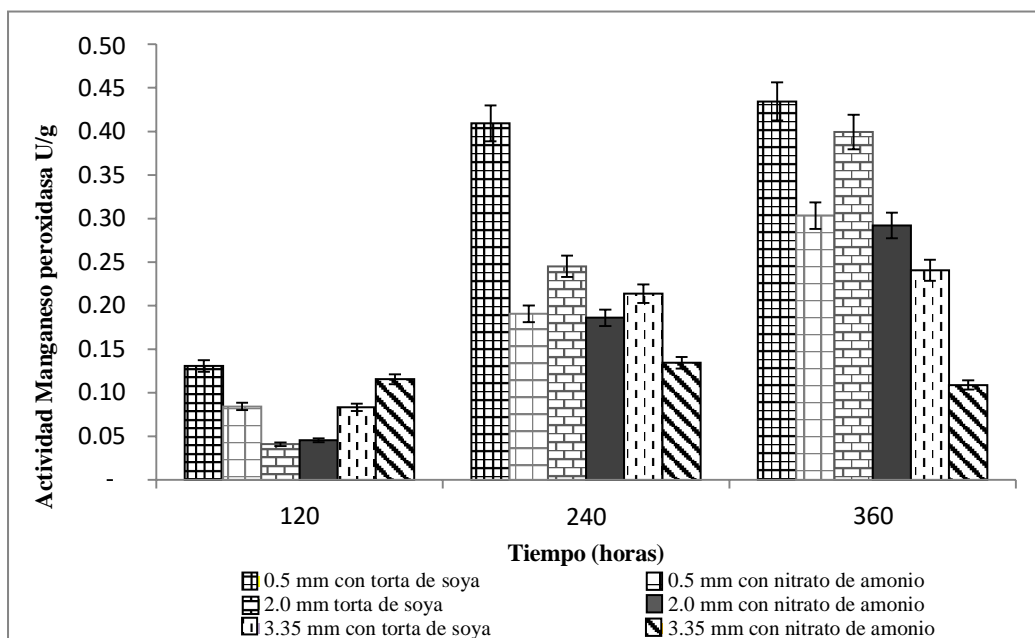


Figura 2. Producción de manganeso peroxidasa durante la fermentación por Adhesión a Superficies con *Trametes polyzona* LMB TM5 conteniendo residuos de Bolaina blanca con tamaños de partícula de 0.5, 2.0 y 3.35 mm, suplementado con torta de soya o nitrato de amonio como fuente de nitrógeno.

Los resultados de la producción de lignina peroxidasa obtenidos para cada tamaño de partícula, fuente de nitrógeno (torta de soya o nitrato de amonio) y tiempo de incubación se muestran en la Figura 3. La mayor producción enzimática se obtuvo a las 240 horas alcanzando 2.2 U/g empleando torta de soya y un tamaño de partícula de 0.5 mm, siendo 1.2 y 1.4 veces mayor que al utilizar tamaños de partícula de 2.0 y 3.35 mm y torta de soya, respectivamente. Cuando se empleó nitrato de amonio como fuente nitrogenada la producción disminuyó en 1.5, 1.7 y 1.8 para 0.5, 2.0 y 3.35 mm de partículas respectivamente a las 240 h. Mientras que a las 120 y 360 horas los títulos enzimáticos fueron menores.

De acuerdo a los resultados obtenidos y contrastando con lo mencionado por Aydinoglu et al., (2013), el cual afirma que las partículas de sustrato pequeñas proporcionan un área de superficie más grande para el ataque microbiano, en esta investigación se puede afirmar que las partículas de menor tamaño la producción enzimática aumentó mejorando los títulos enzimáticos de las lacas, manganeso y lignina peroxidasa. Sin embargo, Pandey (2002) menciona que las partículas muy pequeñas pueden formar conglomerados que evitan el ingreso del hongo para atacar el sustrato en comparación a tamaños más grandes donde las partículas se encuentran libres, pero con menor área superficial, sin embargo, en esta

investigación el menor tamaño de partícula probado de 0.5 mm fue el que dio mejores títulos enzimáticos.

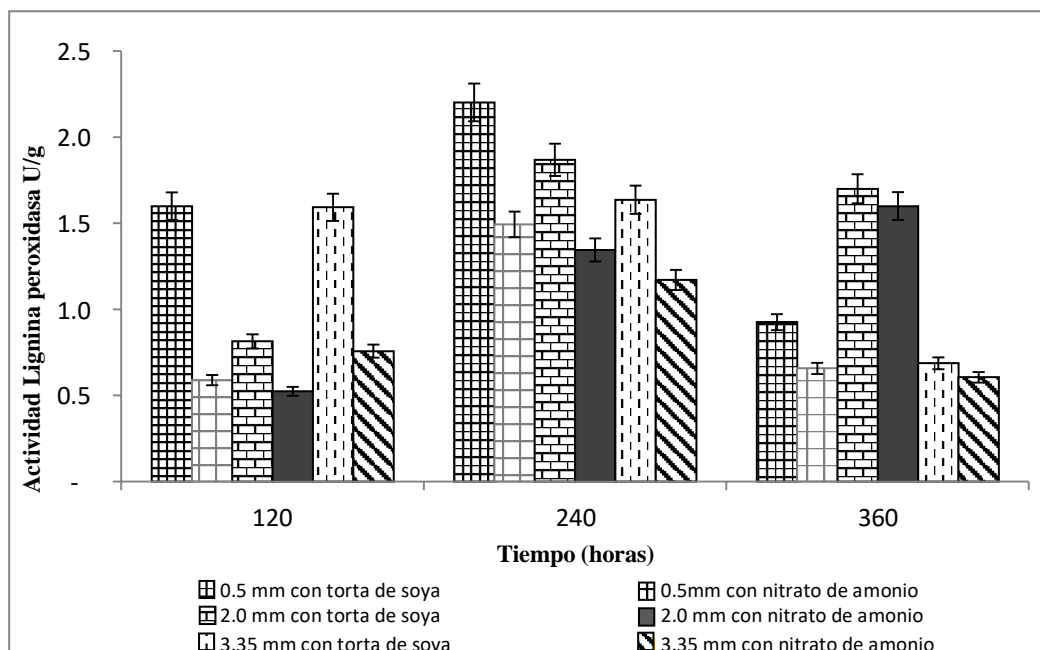


Figura 3. Producción de lignina peroxidasa durante la fermentación por Adhesión a Superficies con *Trametes polyzona* LMB TM5 conteniendo residuos de Bolaina blanca con tamaños de partícula de 0.5, 2.0 y 3.35 mm, suplementado con torta de soya o nitrato de amonio como fuente de nitrógeno.

Así mismo, Meehnian et al. 2016 investigaron el efecto del tamaño de partícula en la producción de lacasas, manganeso y lignina peroxidasa empleando *Daedalea flavida* con tallos de algodón de 1.0, 5.0 y 10.0 mm. Los investigadores alcanzaron títulos de 4.26 U/g de lacasas y 1.75 U/g de lignina peroxidasa a las 240 horas y 360 horas de incubación, respectivamente con tallos de algodón de 5.0mm. En el presente trabajo de investigación los títulos de LiP fueron mayores alcanzando de 2.2 U/g a las 240. Por el contrario, los títulos de lacasas obtenidos fueron 10.7 veces menores con títulos enzimáticos de 0.4 U/g a las 120 horas de incubación.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación y contrarrestándose con lo mencionado por Revankar y Lele (2006) se puede afirmar que el empleo de una fuente de nitrógeno orgánica combinado con un sustrato lignocelulósico de tamaño de partícula pequeño mejora la producción enzimática. Mishra y Kumar (2007) hacen hincapié sobre el contenido de nitrógeno debido a los efectos significativos en el crecimiento de hongos y en la producción enzimática.

4.1.2 Efecto de la concentración de inóculo inicial en la producción enzimática

Para probar el efecto de la concentración de inóculo de *T. polyzona* en la producción enzimática durante el proceso de fermentación se evaluaron concentraciones de 5, 10, 15 y 20% (v/v) con respecto al volumen de residuos de Bolaina blanca en el medio. Los pesos secos del inóculo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Peso seco de las diferentes concentraciones de inóculo de *Trametes polyzona* LMB TM5 evaluados en el proceso de fermentación por adhesión a superficie con tamaños de partícula de 0.5 mm y torta de soya como fuente nitrogenada

Porcentaje del Inóculo inicial (v/v)	Volumen del Inóculo inicial (ml)	Peso seco del Inóculo inicial (g)
5%	1.9	0.099
10%	3.8	0.149
15%	7.6	0.217
20%	5.7	0.285

La Figura 4 muestra los resultados de la producción de lacasas utilizando diferentes concentraciones de inóculo a las 120, 240 y 360 horas. Los resultados indican que no hubo diferencias significativas (Anexo 2, 2.1) entre los tiempos evaluados alcanzando títulos enzimáticos de 1.09 U/g, 1.79 U/g y 2.03 U/g a las 120, 240 y 360 horas, respectivamente.

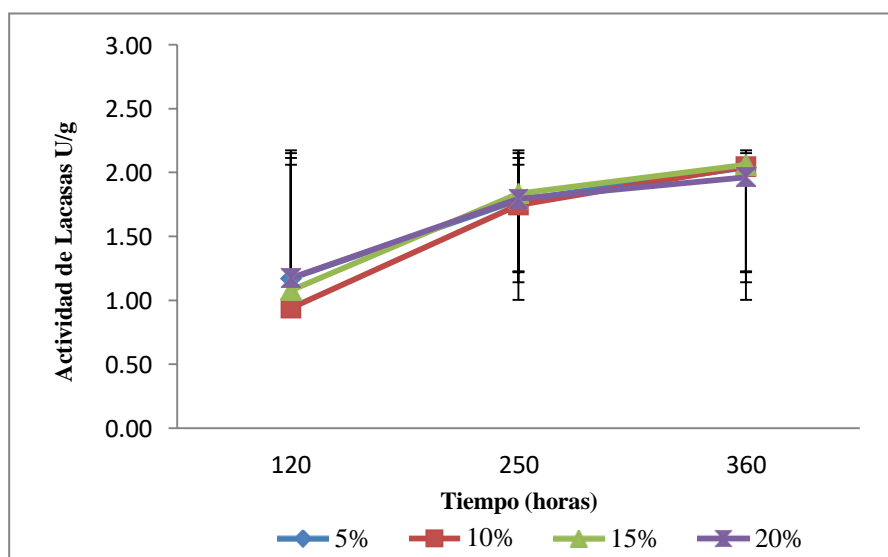


Figura 4. Producción de lacasas empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partícula de Bolaina blanca de 0.5 mm y torta de soya como fuente de nitrógeno.

Así mismo, los resultados de la producción de manganeso peroxidasa (Figura 5) y lignina peroxidasa (Figura 6) obtenidas para cada concentración de inóculo inicial, no presentaron diferencias significativas (Anexo 2, 2.3). Manganeso peroxidasa alcanzó títulos enzimáticos de 0.52 U/g, 0.71 U/g y 0.54 U/g y de lignina peroxidasa 0.97 U/g, 2.15 U/g y 2.6 U/g a las 120, 240 y 360 horas, respectivamente.

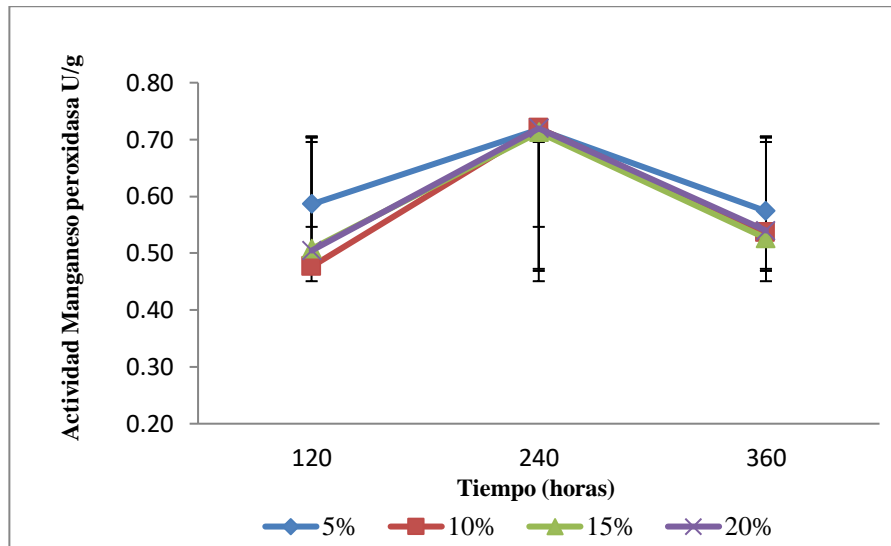


Figura 5. Producción de manganeso peroxidasa empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partícula de Bolaina blanca de 0.5 mm y torta de soya como fuente de nitrógeno.

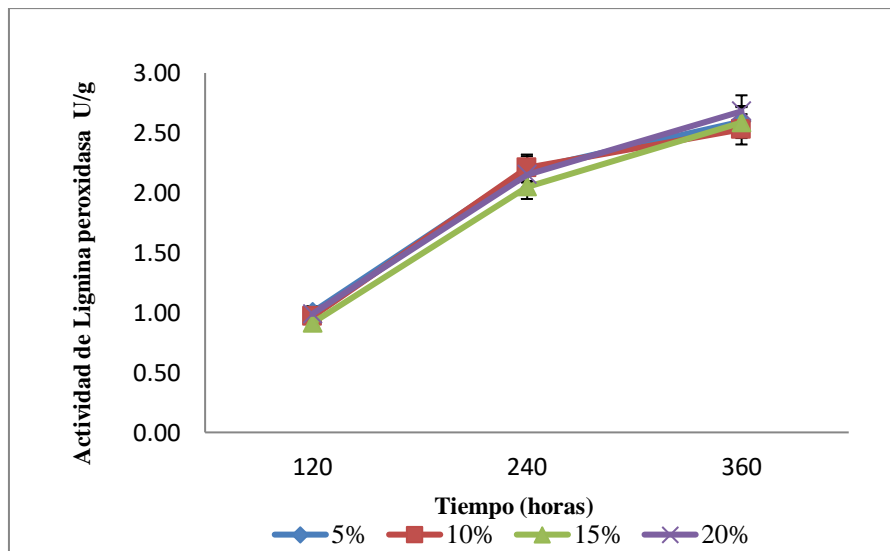


Figura 6. Producción de lignina peroxidasa empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partícula de Bolaina blanca de 0.5 mm y torta de soya como fuente de nitrógeno.

Lueangjaroenkit et al. 2018 evaluaron el efecto de la concentración inicial de inóculo en la producción de enzimas lignolíticas de la cepa *Trametes polyzona* KU-RNW027 en un cultivo de agitación continua obteniendo títulos enzimáticos altos de manganeso peroxidasa y lacasas (0.587 y 1.2 U/g), con una concentración de inóculo de 0.05 g/L. En esta investigación se emplearon diferentes valores de inóculo inicial (Tabla 1), sin embargo no hubo diferencias significativas en cuanto a la producción de las enzimas lignolíticas,

Por otro lado, Marques et al., (2018) al evaluar el efecto de la concentración de inóculo en la fermentación en estado sólido de dos hongos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 y *Saccharicola* sp. EJC04 con salvado de trigo y harina de semilla de algodón, para producir endoglucanasas, xylanases, FPasa, b-glucosidasa y b-xilosidasa, indicaron que existe una relación directa entre el tipo de hongo y enzimas a producir cuando hay un incremento en la concentración del inóculo inicial. Por lo tanto, probablemente se necesitaría emplear mayores concentraciones de inóculo.

4.1.3 Efecto de la concentración de CuSO₄ en la producción de Lacasas

La adición de diferentes concentraciones de CuSO₄ (2, 3, 4 y 5 mM) al medio de cultivo aumentó la producción de lacasas (Figura 7) de manera significativa (Anexo 5) en comparación al sistema de fermentación sin CuSO₄. La adición de 5 mM de CuSO₄ en el medio de fermentación aumentó la producción de lacasas en 2.75 pasando de 0.4 U/g a 1.11 U/g a las 120 horas de incubación. Se cuantificaron los títulos enzimáticos a diferentes tiempos de incubación alcanzando a las 360 h títulos de 2 U/g aumentando la producción enzimática en cuatro veces de manera significativa.

Está ampliamente investigado que el Cu⁺² induce la producción de lacasas a nivel transcripcional o post transcripcional (Wang et al., 2020). Investigaciones como las de Revankar y Lele (2006) y Galhaup et al., (2002), demuestran el efecto del cobre como inductor en la producción de esta enzima al obtener mayores títulos enzimáticos adicionando este compuesto al medio de fermentación.

Además la producción de esta enzima depende de la cepa, el sistema de fermentación y la fuente de carbono otorgada a Santana et al. 2018 quienes emplearon un cultivo rico en sacarosa con *Lentinus crinitus* y diferentes concentraciones de CuSO₄ logrando la mayor producción suplementando 150 mM de CuSO₄ al medio de cultivo incrementando su producción en 14.5 veces pasando de 33.79 a 490 U/g. Además, Revankar y Lele (2006) optimizaron la producción de lacasas adicionando 1 mM al medio de producción de CuSO₄

pasando de 50 U/ml a 410 U/ml en un sistema de fermentación sumergida empleando almidón como fuente de carbono. Vladimir et al. 2018 optimizaron la fermentación sumergida de residuos de aserrín de oliva empleando 1 mM de CuSO₄ obteniendo títulos de 51800 U/L con *Cerrena unicolor* un basidiomiceto de la producción blanca como *Trametes polyzona* LMB TM5, también emplearon *Trametes versicolor* 13 y *Trametes troggi* 146 obteniendo diferencias significativas en la producción de lacasas, 3400 y 6600 U/L empleando el mismo sistema de fermentación. Finalmente Fenice et al. 2013 emplearon la cepa *Pleurotus tigrinus* en residuos de aserrín de olivo y evaluaron dos sistemas, fermentación sumergida y en estado sólido con el cual obtuvieron 10 veces más lacasas que con el primer sistema.

En esta investigación los valores obtenidos de lacasas son menores en comparación a las investigaciones expuestas, a pesar que se obtuvieron mayores rendimientos enzimáticos suplementando 5 mM de sulfato de cobre al medio de fermentación por adhesión a superficie, los títulos enzimáticos alcanzados fueron muy bajos, entre las posibles razones encontramos que el sistema de producción y la cepa empleada hubiesen logrando mayores títulos enzimáticos en un sistema de fermentación sumergida, además se propone la posibilidad de que la fuente de carbono estuviese muy limitada por la presencia de lignina del sustrato y que la concentración de sulfato de cobre pudo ser mayor para aumentar la inducción de esta enzima.

Adicionalmente la producción de manganeso peroxidasa en el medio suplementado con 5 mM de CuSO₄ incrementó de 0.13 a 1.79 U/g a las 120 horas, siendo 13.8 veces mayor (Figura 8), lográndose títulos mayores en menores tiempos de incubación. A pesar que se ha documentado que el cobre induce la producción de lacasas, Fenice et al. 2013 obtuvieron una inducción de 10 veces más en la producción de esta enzima cuando adicionaron sulfato de cobre al medio, esto puede deberse a que el Cu⁺² puede inducir de la misma manera la síntesis de ARN mensajero que para las lacasas.

Por otro lado la producción de lignina peroxidasa no se incrementó significativamente (Anexo 7) por la suplementación de CuSO₄ en el medio de fermentación (Figura 9), ocurriendo lo mismo en la investigación realizada por Fenice et al. 2013.

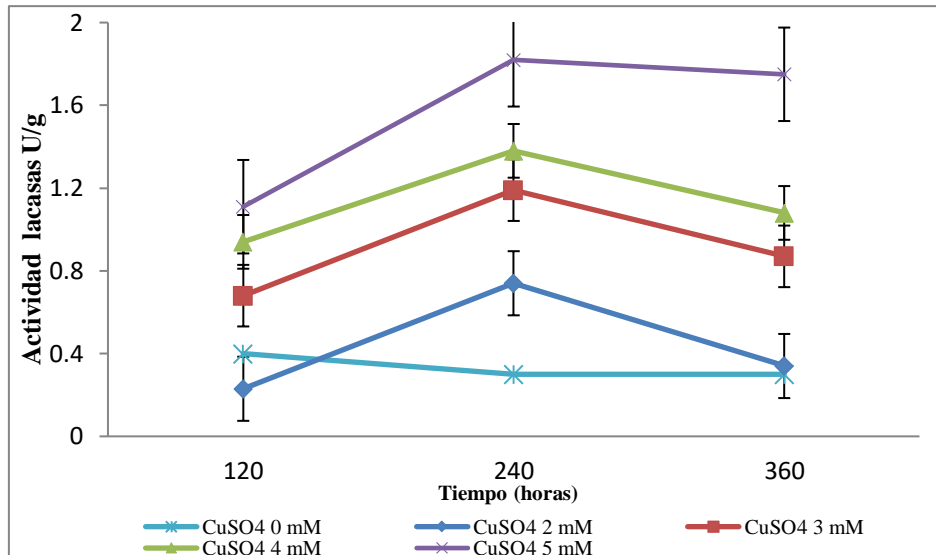


Figura 7. Producción de Lacasas empleando diferentes concentraciones de CuSO4 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con un tamaño de partícula de 0.5 mm y torta de soya como fuente de nitrógeno.

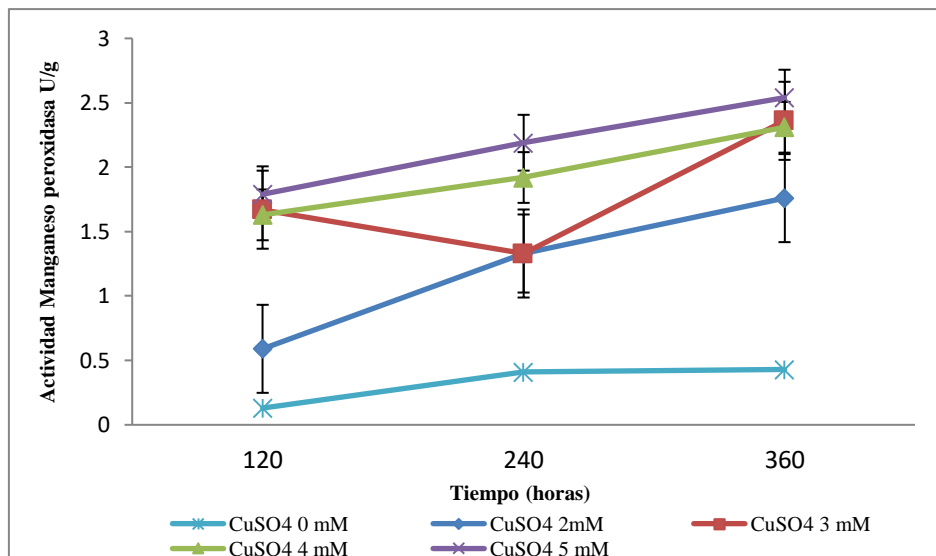


Figura 8. Producción de Manganese peroxidasa empleando diferentes concentraciones de CuSO4 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con un tamaño de partícula de 0.5 mm y torta de soya como fuente de nitrógeno.

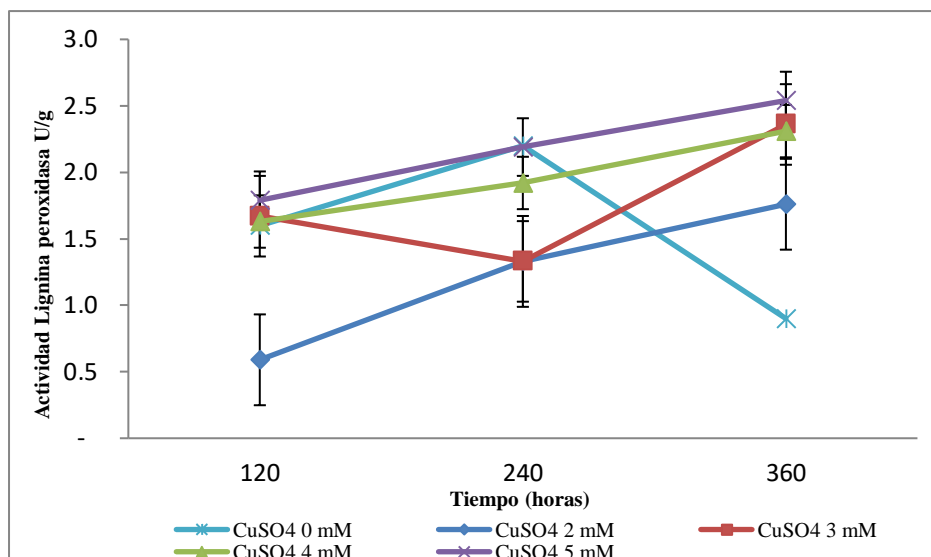


Figura 9. Producción de Lignina peroxidasa empleando diferentes concentraciones de CuSO4 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con un tamaño de partícula de 0.5 mm y torta de soya como fuente de nitrógeno.

4.2 DEGRADACIÓN DE LIGNINA Y PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS CON *Trametes polyzona* LMB TM5 EN EL MEDIO DE FERMENTACIÓN ESTANDARIZADO

La degradación de lignina se cuantificó en el medio de fermentación por adhesión a superficie estandarizado con un tamaño de partícula de 0.5 mm, añadiendo 5 mM de sulfato de cobre y torta de soya como fuente nitrogenada. Los títulos de lacasas y lignina peroxidasa aumentaron significativamente a las 120, 240 y 360 (Anexo 8), pero en el caso de manganeso peroxidasa aumentó su producción hasta las 240 horas y disminuyó a las 360 horas (Figura 10)

Los títulos de Lacasas alcanzados fueron de 1.12 U/g a las 120 horas, 1.79 U/g a las 240 horas y finalmente alcanzando la actividad máxima las 360 horas con 2.04 U/g (Figura 11). Además se observó en el mismo tiempo de incubación valores de 0.09 Ug^{-1} y $0.006 \text{ Ug}^{-1}\text{h}^{-1}$ de actividad específica (AE) y productividad volumétrica (Γ) respectivamente (Tabla 2). Sin embargo la mayor productividad volumétrica se obtiene a las 120 h con $0.009 \text{ g}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Los títulos de manganeso peroxidasa en el medio de fermentación estandarizado a las 120 horas fue de 0.53 U/g, obteniéndose la máxima actividad a las 240 horas con 0.72 U/g y disminuyendo la actividad a las 360 horas de 0.57 U/g (Figura 11). Además se observó en el mismo tiempo de máxima actividad enzimática valores de 0.04 Ug^{-1} y $0.003 \text{ Ug}^{-1}\text{h}^{-1}$ de actividad específica (AE) y productividad volumétrica (Γ) respectivamente (Tabla 3).

La producción de lignina peroxidasa en el medio de fermentación estandarizado inició con 1.79 U/g a las 120 horas, obteniéndose 2.2 U/g a las 240 horas y una actividad máxima a 360 horas de 2.55 U/g (Figura 11). Además se observó en el mismo tiempo de incubación valores de 1.13 U g^{-1} y 0.007 U $g^{-1}h^{-1}$ de actividad específica (AE) y productividad volumétrica (Γ) respectivamente (Tabla 4).

Un factor crítico en la producción enzimática es la humedad añadida al medio de fermentación por adhesión a superficies. En esta investigación la humedad fue del 80%, la cual es el requerimiento promedio para promover el crecimiento microbiano (Singhania et al. 2009). Sin embargo cada cepa de hongo tiene una humedad óptima de crecimiento en la cual se obtendrán los mayores títulos enzimáticos, un ejemplo de ello fue la investigación realizada por Xin y Geng (2011), que evaluaron diferentes porcentajes de humedad de una cepa de *Trametes versicolor* en la FES de residuos hortícolas, obteniendo mayores títulos de las enzimas lignolíticas empleando 85% de humedad inicial. Por ello, se podrían evaluar distintas concentraciones de humedad inicial en el medio de fermentación estandarizado con la cepa *Trametes polyzona* LMB TM5 para analizar si se podrían alcanzar mayores títulos de las enzimas lignolíticas.

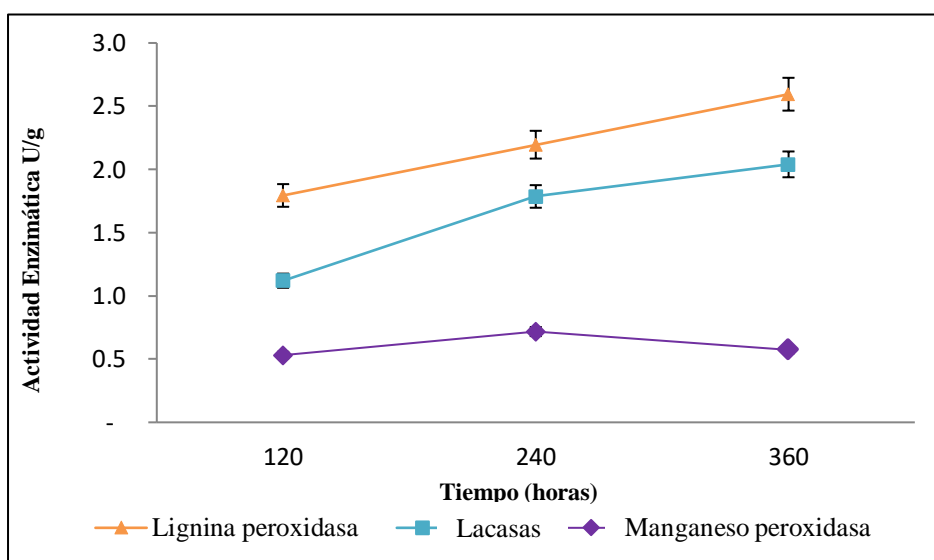


Figura 10. Producción de lacasas, manganeso y lignina peroxidasa del medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado de *Trametes polyzona* LMB TM5.

Tabla 2: Parámetros de productividad de Lacasas producidas por *Trametes polyzona* LMBTM5 en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado

T	UE	AE	Γ
(h)	(Ug⁻¹)	(Ug⁻¹)	(Ug⁻¹h⁻¹)
120	1.12	0.07	0.009
240	1.78	0.10	0.007
360	2.04	0.09	0.006

T: tiempo de producción (h). UE: actividad enzimática (Ug⁻¹)
 Γ: productividad volumétrica (U g⁻¹h⁻¹).
 A.E: actividad específica (U g⁻¹).

Tabla 3: Parámetros de productividad de manganeso peroxidasa producida por *Trametes polyzona* LMBTM5 en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado.

T	UE	AE	Γ
(h)	(Ug⁻¹)	(Ug⁻¹)	(Ug⁻¹h⁻¹)
120	0.53	0.03	0.004
240	0.72	0.04	0.003
360	0.57	0.03	0.002

T: tiempo de producción (h). UE: actividad enzimática (Ug⁻¹)
 Γ: productividad volumétrica (U g⁻¹h⁻¹).
 A.E: actividad específica (U g⁻¹).

Tabla 4: Parámetros de productividad de lignina peroxidasa producidas por *Trametes polyzona* LMBTM5 en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado.

T	UE	AE	Γ
(h)	(U g⁻¹)	(U g⁻¹)	(U g⁻¹h⁻¹)
120	1.79	1.05	0.015
240	2.2	1.21	0.009
360	2.60	1.13	0.007

T: tiempo de producción (h). UE: actividad enzimática (Ug⁻¹)
 Γ: productividad volumétrica (U g⁻¹h⁻¹).
 A.E: actividad específica (U g⁻¹).

En cuanto a la deslignificación de residuos de Bolaina blanca esta es la primera investigación en la cual se mide el grado de deslignificación de residuos empleando el hongo de la pudrición blanca *Trametes polyzona* LMB TM5. Se sabe que los hongos de la pudrición blanca tienen un gran potencial en la descomposición de la lignina y la degradación selectiva de esta con una baja pérdida de celulosa (Wan y Li, 2012).

En esta investigación puede observarse la tasa de degradación de lignina llevada a cabo por *Trametes polyzona* LMB TM5 sobre residuos de Bolaina blanca (Figura 11). El proceso de deslignificación se evaluó cada 5 días y desde el día 10 se empezó a registrar una pérdida significativa (Anexo 9) de lignina de 5.6% a las 240 h y de 9.4% a las 360 h (Tabla 5).

Los factores más importantes para la degradación de residuos lignocelulósicos son el tiempo de incubación, la efectividad y rendimiento de la cepa. Largos períodos de incubación suelen ser cuellos de botella en los tratamientos biológicos de la biomasa lignocelulósica (Zabedet al., 2018), por ello es importante seleccionar de manera efectiva un microorganismo con toda la maquinaria enzimática requerida para deslignificar estos residuos en el menor tiempo posible (Zabedet al., 2018).

Martinez-Patiño et al., (2018) emplearon el sistema de fermentación en estado sólido para degradar hojas de oliva de 4 mm, las cuales contenían 31 g de lignina insoluble, empleando 3 cepas de hongos de la pudrición blanca *Irpex lacteus* el cual mostró una tasa de degradación de lignina del 7% y 1 % en un período de incubación de 45 y 30 días respectivamente, *Stereum hirsutum* mostró una tasa de degradación de 10.3% en 45 días y *Ganoderma lucidum* no tuvo la capacidad de degradar lignina en los tiempos de incubación mencionados. Los residuos de Bolaina blanca así como las hojas de olivo, son compuestos altamente recalcitrantes con un alto contenido de lignina en su composición 31g de esta en 100 g, en base a esta semejanza, podemos deducir que la cepa LMBTM5 es un mejor biodeslignificador que *G.lucidum*, *I.Lacteus* y *S. hirsutum* ya que se obtuvo una pérdida de lignina en el tercio del tiempo empleado por estas, observándose una tasa de degradación mayor de 9.5% en 15 días. Además para confirmar este potencial se comparó la tasa de degradación con la del hongo de la pudrición blanca *G. Iobatum*, el cual en un cultivo FES conteniendo paja de trigo, obtuvo tasas de degradación de 5.3% y 6.3% a los 20 y 30 días (Hermosilla et al., 2018) reafirmando la gran capacidad degradadora de la cepa *Trametes polyzona* LMBTM5.

Cabe señalar que a pesar de que en el día 15 se registra la mayor producción enzimática de

Lacasas y Lignina peroxidasa y a su vez la mayor tasa de degradación de lignina, esta producción enzimática no podría relacionarse directamente con su degradación, ya que diferentes autores afirman que la deslignificación no es sólo un proceso químico producto de la excreción enzimática, sino que también existen otros mecanismos que participan en la despolimerización de la lignina como la participación de compuestos oxidantes de bajo peso molecular que actúan como radicales o el propio crecimiento micelial del hongo (factor físico) (Sindhu et al., 2016, Šnajdr y Folia, 2007). Además en el estudio realizado por Salvachúa et al., (2011) no pudieron relacionar que la producción de enzimas lignolíticas disminuía directamente la concentración de lignina en la paja de trigo utilizando hongos de la podredumbre blanca.

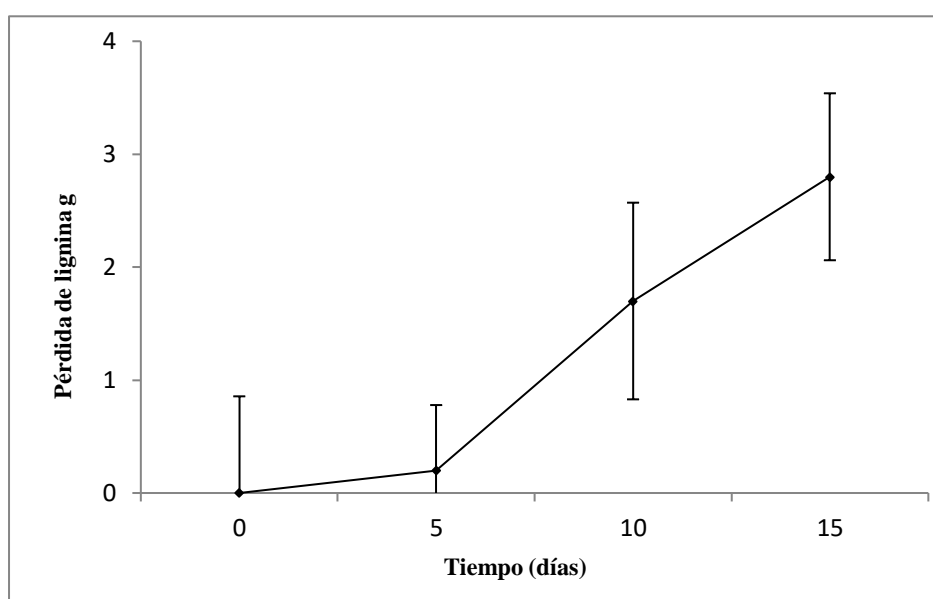


Figura 11. Degradación de lignina insoluble llevada a cabo por *Trametes polyzona* LMB TM5 en cultivos de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizados.

Tabla 5: Cuantificación de la pérdida de peso y la tasa de degradación de lignina de Bolaina blanca de 0.5 mm durante un tiempo de incubación de 15 días con *Trametes polyzona* LMBTM5 en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado.

T (días)	Contenido de lignina (g/g)	Pérdida de peso (g)	Tasa de degradación(%)
0	30.54	0	0
5	30.36	0.2	0
10	28.88	1.7	5.6
15	27.67	2.8	9.5

T: Tiempo de incubación (días). Contenido de lignina final g /100 g de aserrín de 0.5 mm de tamaño de la Bolaina blanca (g/g). Pérdida del contenido de lignina g. Tasa de degradación con respecto al contenido inicial de lignina (%).

4.3. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS DEL INÓCULO DE *Trametes polyzona* LMB TM5 INMOVILIZADO EN PERLAS DE ALGINATO EN LA FERMENTACIÓN POR ADHESIÓN A SUPERFICIE (FAS) PREVIAMENTE ESTANDARIZADO.

La producción de las enzimas lignolíticas varió de acuerdo al sistema de inmovilización del inóculo (Figura 12). La producción de Lacasas aumentó cuando la biomasa de *T. polyzona* se suspendía en alginato obteniéndose a las 360 h de incubación 2.44 U/g siendo 1.19 veces mayor (Anexo 11) que sin la biomasa inmovilizada 2 U/g, además se evaluó el efecto de la deshidratación térmica de las perlas de alginato, obteniéndose menores títulos enzimáticos 1.74 U/g (Tabla 6). Además la productividad volumétrica fue de 0.010, 0.008 y 0.009 Ug⁻¹h⁻¹ en el sistema de la biomasa inmovilizada en alginato, biomasa inmovilizada en alginato y deshidratada y en el sistema de células libres respectivamente.

Estudios realizados por Mussatto et al., (2009) revelaron que el uso de células inmovilizadas en sistemas de fermentación con *Aspergillus japonicus* fueron capaces de proporcionar mejores resultados de producción de FOS que los sistemas de células libres. Esto se puede observar sólo en la producción de lacasas, ya que para los casos de manganeso y lignina peroxidasa se obtuvieron menores títulos enzimáticos cuando el inóculo se inmovilizó en alginato.

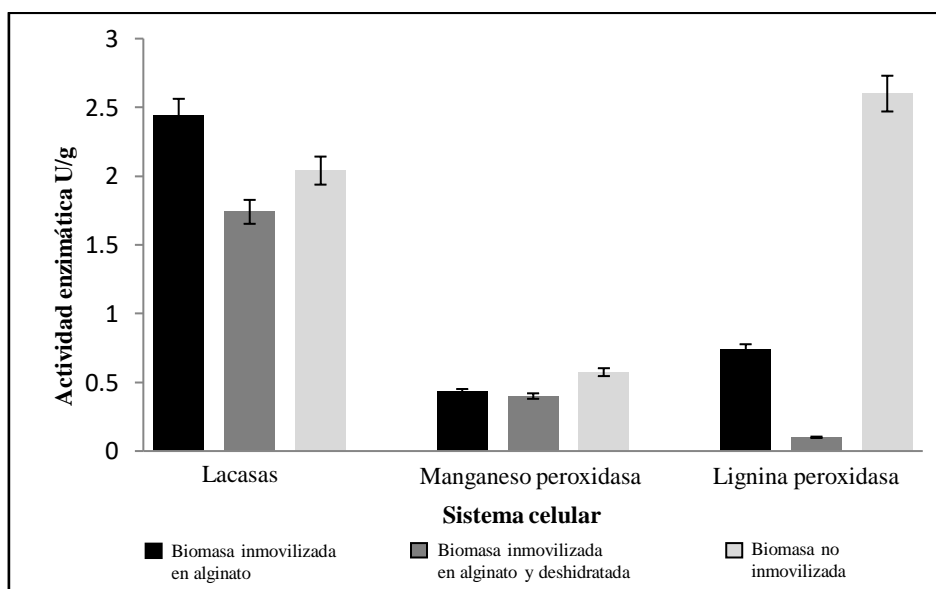


Figura 12. Producción de lacasas, manganeso y lignina peroxidasa utilizando perlas de alginato, perlas de alginato deshidratadas y células no inmovilizadas en un cultivo de la Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado a las 360 h.

La producción de Manganeso peroxidasa no aumentó cuando la biomasa se inmovilizó o secó, por el contrario la biomasa libre del atrapamiento del alginato presentó mayores títulos enzimáticos (Anexo 11) 0.57 U/g vs 0.4 U/g respectivamente siendo este 1.4 veces mayor (Tabla 6). Este resultado fue el opuesto en cuanto a lo obtenido por Mussato et al., (2009), sin embargo en este caso se debe evaluar la concentración de alginato, ya que en esta investigación se empleó una concentración de 2% y existen diferentes reportes (Lopez-Mencheró et al., (2021), Musatto et al., (2009b) y Bucke, (1987)) en los cuales la concentración de este compuesto afecta la fermentación y producción enzimática llevada a cabo por el microorganismo. Además la productividad volumétrica fue de 0.001, 0.001 y 0.002 U $g^{-1}h^{-1}$ en el sistema de la biomasa inmovilizada en alginato, biomasa inmovilizada en alginato y deshidratada y en el sistema de células libres respectivamente.

Finalmente la producción de lignina peroxidasa se vio seriamente afectada cuando la biomasa se inmoviliza en alginato y se deshidrata (Anexo 11), presentando una disminución en su producción de 3.5 y 26 veces respectivamente produciéndose mejores títulos enzimáticos en el sistema de células libres 2.6 U/g (Tabla 6). Estudios de termo tolerancia de la cepa *Trametes polyzona* RYNF13 realizados por Lueangjaroenkit et al. (2018), demostraron que este microorganismo perdía la actividad lignina peroxidasa cuando se sometía a temperaturas mayores de 30°C, ello se vio reflejado en los bajos títulos enzimáticos obtenidos con la FAS de la biomasa inmovilizada en alginato deshidratada a 37°C, además los bajos títulos enzimáticos del inóculo inmovilizado en alginato sin deshidratarse puede deberse a la concentración de alginato que recubre el micelio, mencionado en el párrafo anterior. Además la productividad volumétrica fue de 0.002, 0.0003 y 0.007 U $g^{-1}h^{-1}$ en el sistema de la biomasa inmovilizada en alginato, biomasa inmovilizada en alginato y deshidratada y en el sistema de células libres respectivamente.

Tabla 6: Parámetros de productividad de lacasas, manganeso y lignina peroxidasa a las 360 horas de incubación, producidas por las perlas de alginato, deshidratadas y células libres de *Trametes polyzona* LMB TM5 en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado.

Enzima	Sistema Celular	UE (U g ⁻¹)	Γ (Ug ⁻¹ h ⁻¹)	AE (Ug ⁻¹)
Lignolítica	Perlas de alginato	2.44	0.010	0.45
	Perla de alginato deshidratada	1.74	0.008	0.11
Lacasas	Células libres	2.04	0.009	0.12
	Perlas de alginato	0.43	0.001	0.438
Manganeso Peroxidasa	Perla de alginato deshidratada	0.4	0.001	0.438
	Células libres	0.574	0.002	0.64
Lignina Peroxidasa	Perlas de alginato	0.74	0.002	0.32
	Perla de alginato deshidratada	0.1	0.0003	0.008
	Células libres	2.6	0.007	1.13

UE: actividad enzimática (Ug⁻¹). Γ: productividad volumétrica (U g⁻¹h⁻¹).
A.E: actividad específica (U g⁻¹).

Se evaluó el crecimiento en placa y se obtuvo que todas las muestras que fueron deshidratadas a 37°C tardaron 7 días para que el crecimiento radial miceliar del hongo abarcara toda la placa, en comparación con las muestras que no fueron deshidratadas que demoraron 6 días. Demostrándose así que este hongo tiene la capacidad de resistir altas temperaturas. Esta capacidad termotolerante también ha sido registrada en cepas del género *Trametes* como *Trametes trogii* LK13 (Yan et al., 2015) y *Trametes polzyona* RYNF13, las cuales fueron sometidas a temperaturas de 37 °C y no mostraron retardo en el crecimiento radial en placas de PDA como el caso de *T. polyzona* LMBTM5.

Además, se evaluó la producción enzimática (Figura 13), a las 240 h de incubación, de *T. polyzona* LMB TM5 inmovilizado en alginato, deshidratado a 37°C y almacenado durante 120, 240 y 360 horas a temperatura ambiente (25°C), asemejándose las condiciones de transporte dentro del Perú. Se cuantificaron títulos enzimáticos de lacasas y manganeso peroxidasa hasta las 240 horas, ya que a las 360 horas no hubo producción enzimática.

Además no se registró actividad lignina peroxidasa, de secretar esta enzima luego de haber sido sometida a temperaturas mayores de 30 °C (Lueangjaroenkit et al., 2018).

La producción de lacasas disminuyó de manera significativa (Anexo 10) y progresivamente con respecto al tiempo de almacenamiento de las semillas deshidratadas. Los títulos enzimáticos obtenidos con un tiempo de almacenamiento de 24 horas fue de 3.99 U/g, a las 120 horas 3.26 U/g y a las 240 horas fue de 2.36 U/g, reduciéndose en este tiempo de almacenamiento en un 59% su producción de lacasas (Tabla 7).

La producción de manganeso peroxidasa también disminuyó progresivamente con respecto al tiempo de almacenamiento. Los títulos enzimáticos obtenidos con un tiempo de almacenamiento de 24 horas fue de 2.34 U/g, a las 120 horas de 1.37 U/g y a las 240 horas de 0.67 U/g reduciéndose de manera significativa (Anexo 10) la producción enzimática al 28% (Tabla 8).

Finalmente, a las 360 horas de almacenadas a 25°C las semillas de alginato deshidratadas no se obtuvo crecimiento miceliar ni en placa ni en FAS. Por lo tanto el tiempo de almacenamiento a 25°C de las semillas deshidratadas en alginato afecta la viabilidad de la cepa disminuyendo su producción enzimática y resultando en la pérdida total de producción enzimática en un tiempo de almacenamiento de 360 horas.

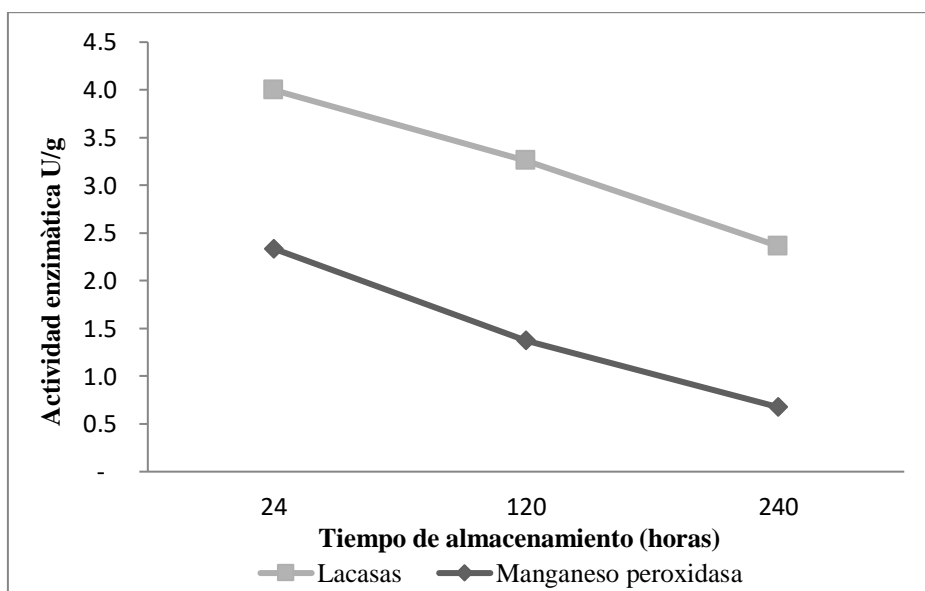


Figura 13. Producción de lacasas y manganeso peroxidasa de las perlas de alginato deshidratadas y almacenadas por 24, 120 y 240 h de *Trametes polyzona* LMB TM5 en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado.

Tabla 7: Parámetros de productividad de Lacasas producidas por las perlas de alginato deshidratadas de *Trametes polyzona* LMB TM5 y almacenadas a 25°C durante 24, 120 y 240 h.

T (h)	UE (U g⁻¹)	AE (U g⁻¹)	Γ (U g⁻¹h⁻¹)
24	3.9974	0.74	0.02
120	3.2578	0.42	0.01
240	2.36405	0.33	0.01

T: tiempo de producción (h). UE: actividad enzimática (Ug⁻¹).
 Γ: productividad volumétrica (U g⁻¹h⁻¹).
 A.E: actividad específica (U g⁻¹).

Tabla 8: Parámetros de productividad de Manganese peroxidasa producidas por las perlas de alginato deshidratadas de *Trametes polyzona* LMB TM5 y almacenadas a 25°C durante 24, 120 y 240 h.

T (h)	UE (U g⁻¹)	AE (U g⁻¹)	Γ (U g⁻¹h⁻¹)
24	2.555	0.477	0.011
120	1.372	0.175	0.006
240	0.676	0.093	0.003

T: tiempo de producción (h). U E: actividad enzimática (Ug⁻¹).
 Γ: productividad volumétrica (Ug⁻¹h⁻¹).
 A.E: actividad específica (U g⁻¹).

V. CONCLUSIONES

1. Con las distintas variables evaluadas (tamaño de partícula, fuente de nitrógeno, porcentaje de inóculo y concentración de sulfato de cobre) se estandarizó la producción de enzimas lignolíticas usando *Trametes polyzona* LMB-TM5 en un sistema de fermentación por Adhesión a Superficies empleando residuos de Bolaina blanca.
2. Los mejores títulos enzimáticos se consiguieron con un tamaño de partícula de 0.5 mm, 7% de torta de soya como fuente de nitrógeno y 5 mM CuSO₄. A las 360 horas se obtuvieron los mayores títulos enzimáticos para la producción de lacasas (2.04 U/g) y lignina peroxidasa (2.60 U/g), mientras que los mayores títulos de manganeso peroxidasa se obtuvieron a las 240 horas (0.72 U/g).
3. Se ha logrado una biodeslignificación del 9.5% de residuos de Bolaina blanca mediante el tratamiento biológico con *Trametes polyzona* LMBTM5. Los resultados ponen de manifiesto que *T. polyzona* LMBTM5 es una cepa promisorio para la biodeslignificación de residuos de madera.
4. Se ha logrado desarrollar un sistema de inmovilización de inóculo miceliar de *T. polyzona* LMBTM5 para el tratamiento biológico de residuos de Bolaina blanca. Con el micelo inmovilizado se incrementó la actividad enzimática de lacasas en un 12% con respecto a la biomasa miceliar no inmovilizada.
5. La deshidratación térmica de la cepa *Trametes polyzona* LMBTM5 produce la disminución de la producción enzimática de las enzimas deslignificadoras.

VI. RECOMENDACIONES

1. Evaluar periodos más largos de incubación con *T. polyzona* para deslignificar residuos de Bolaina blanca.
2. Evaluar la reutilización de las perlas de alginato para la producción de enzimas lignolíticas a fin de disminuir los costos de producción del inóculo.
3. Evaluar la actividad deslignificadora de *Trametes polyzona* LMB TM5 utilizando otros residuos madereros y/o agroindustriales.
4. Evaluar la deshidratación por liofilización de las perlas o de la biomasa miceliar inmovilizada de *Trametes polyzona* LMBTM5 para ser utilizada en procesos de deslignificación de madera y al mismo tiempo evaluar la actividad enzimática lignocelulolítica y lignolítica.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D.B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances* 29:6. p. 675–685.
- Akıllıoğlu, H.G., & Gökmen, V. (2014). Mitigation of acrylamide and hydroxymethyl furfural in instant coffee by yeast fermentation. *Food Research International*. 61.p. 252–256.
- Asgher, M; Wahab, A., Bilal, M., & Nasir Iqbal, H.M. (2016). Lignocellulose degradation and production of lignin modifying enzymes by *Schizophyllum commune* IBL-06 in solid-state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 6. p. 195–201.
- Aydinoğlu, T. & Sargin, S. (2013). Production of laccase from *Trametes versicolor* by solid-state fermentation using olive leaves as a phenolic substrate *Bioprocess Biosyst Eng.* 36:2. p. 215-222.
- Baker, S., Volova, T., Prudnikova, S.V., Satish, S., & Prasad M.N., N. (2017). Nanoagroparticles emerging trends and future prospect in modern agriculture system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 53. p. 10–17.
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiology Review*. 30. p. 215–242.
- Bedade, D.K., Sutar, Y.B., & Singhal, R.S. (2019). Chitosan coated calcium alginate beads for covalent immobilization of acrylamidase: Process parameters and removal of acrylamide from coffee. *Food Chemistry*. 275. p. 95–104.
- Blanchette, R.A. (1984). Selective delignification of wood by white-rot fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 9:4. p. 323–324.
- Brethauer, S., Shahab, R.L., & Studer M.H. (2017). Enhanced simultaneous saccharification and fermentation of pretreated beech wood by in situ treatment with the white rot fungus *Irpexlacteus* in a membrane aerated biofilm reactor. *Bioresource Technology*. 237 p. 135–138.

- Bucke, C. (1987). Cell immobilization in calcium alginate. *Methods in Enzymology*. p. 175–189.
- Cano y Postigo, L.O., Jacobo-Velázquez, D.A., Guajardo-Flores, D., GarcíaAmezquita, L. E., & García-Cayuela, T. (2021). Solid-state fermentation for enhancing the nutraceutical content of agrifood by-products: Recent advances and its industrial feasibility. *Food Bioscience*, 41. p. 100926.
- Cañas, A.I., & Camarero, S. (2010). Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances*: 28:6.p. 694–705.
- Castillo M.P., Stenström J., & Ander P. (1994). Determination of manganese peroxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone and 3-(dimethylamino) benzoic acid. *Analytical Biochemistry* 218:2. p. 399–404.
- Cerrón, L.M., Romero-Suárez, D., Vera, N., Ludeña, Y., Villena, G.K., & Gutiérrez-Correa, M. (2015). Decolorization of textile reactive dyes and effluents by biofilms of *Trametes polyzona* LMB-TM5 and *Ceriporia* sp. LMB-TM1 isolated from the Peruvian rainforest. *Water Air and Soil Pollution* 226:8. p. 235–247.
- Chandel, A.K., Narasu, M.L., Chandrasekhar, G., & Manikyam, A., & Rao, L.M. (2009). Use of *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) as biomaterial for cell immobilization and modulated ethanol production by thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS3 *Bioresource Technology* 100:8. p. 2404–2410.
- Chen, G.C., & Johnson B.R. (1983). Improved colorimetric determination of cell wall chitin in wood decay fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 46:1. p. 13–16.
- Chen H., Liu J., Chang X., Chen D., Xue Y., Liu P., Lin H., & Han S. (2017). A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology* 160. p. 196–206.
- Ciria, G., & Esquinarila, E. (2014). Propuesta de manejo de residuos madereros en una empresa dedicada a la elaboración de pisos de madera. Trabajo de titulación, Lima-Perú.
- Claus, H. (2004). Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35. p. 93–96.
- Collins, T., Gerday C., Feller G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Review* 29. p. 3–23

- Domínguez-Robles, J., Tamminen, T., Liitiä, T., Peresin, M.S., Rodríguez A., & Jääskeläinen A. (2018). Aqueous acetone fractionation of kraft, organosolv and soda lignins. *International Journal of Biological Macromolecules* 106. p. 979–987.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., & Penninckx, M. (2008). Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *Journal Industrial MicrobiolyBiotechnoly* 35. p. 1531–1538.
- Eriksson, K.E., Blanchette R., & Ander, P. (1990). *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer-Verlag, Berlin.
- Farinas, C.S., Scarpelini, L.M., Miranda, E. & Bertucci, N. (2011). Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase production by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. *Biotechnology* 8:1. p. 23–40.
- Fenice, M., Giovannozzi, S.G., Federici, F., & D' Annibale, A. (2003). Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panustigrinus* on olive mill wastewater-based media. *Journal of Biotechnology* 100:1. p. 77-85.
- Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., & Haltrich, D. (2002). Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametespubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30:4. p. 529–536.
- Gao, W., Tabil, L.G., Dumonceaux, T., Espinel Ríos, S., & Zhao, R. (2017). Optimization of biological pretreatment to enhance the quality of wheat straw pellets. *Biomass and Bioenergy* 97. p. 77-89.
- Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* 59. p. 257–268.
- Goel, A., Sharma, R.K., & Tandon, H.K.L. (2006). A comparison of different polymeric gels for entrapment of cells of *Streptococcus thermophilus* containing β -galactosidase. *Journal of Food Science and Technology* 43:5. p. 526–531.
- Gutiérrez-Correa M., & Villena G.K. (2003). Surface adhesion fermentation: a new fermentation category. *Revista Peruana de Biología* 10:2. p. 113–124.
- Hermosilla, E., Rubilar, O., Schalchli, H., da Silva, A.S., Ferreira-Leitao, V., & Diez, M.C. (2018). Sequential white-rot and brown-rot fungal pretreatment of wheat straw as a promising alternative for complementary mild treatments. *Waste Management*. 79.

p. 240–250.

- Higuchi, T. (1993). Biodegradation mechanism of lignin by white-rot basidiomycetes. *Journal of Biotechnology* 30. p. 1–8.
- Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microbiology Technology* 30. p. 454–466.
- Homolka, L. 2013. *Methods of cryopreservation in Fungi*. Springer, New York. p. 9–16.
- Hölker, U., & Lenz, J. 2005. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? *Microbiology* 8:3. p. 301–306.
- Huang, Y.H., Huang, C.T., & Hseu, R.S. (2005). Effects of dockerin domains on *Neocallimastix frontalis* xylanases. *FEMS Microbiology Letters* 243. p. 455–460.
- Ishizaki, H., & Hasumi, K. (2014). Ethanol production from biomass. In *Research Approaches to Sustainable Biomass Systems*, Seishu Tojo and Tadashi Hirasawa (eds.), Elsevier. p. 243-258.
- Junter, G.A., & Jouenne, T. (2004). Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome or the cart before the horse. *Biotechnology Advances*. 22. p. 633–658.
- Jimenez, M.V., Zarkovic, G.G., & Villena, G.K., Gutierrez-Correa M. (2011). Effect of pellet diameter and cell density on ethanol production with alginate immobilized yeast. *Revista Colombiana de Biotecnología* 13(1): 8–15.
- Janusz G., Kucharzyk K.H., Pawlik A., Staszczak M., & Paszczynski A.J. (2013). Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. *Enzyme and Microbial Technology* 52:1. p. 1–15.
- Karimi, M., Esfandiari, R., & Biria, D. (2017). Simultaneous delignification and saccharification of rice straw as a lignocellulosic biomass by immobilized *Trichoderma viride* sp. to enhance enzymatic sugar production. *Renewable Energy* 104. p. 88–95.
- Kilonzo, P., Margaritis, A., & Bergougnou, M. (2011). Effects of surface treatment and process parameters on immobilization of recombinant yeast cells by adsorption to fibrous matrices. *Bioresource Technology* 102. p. 3662–3672.
- Kirk, T., Tien, M., Johnsrud, S. C., & Eriksson, K.E. (1986). Lignin degrading activity of *Phanerochaete chrysosporium* Burds.: comparison of cellulase-negative and other

- strains. *Enzyme and Microbial Technology*. 8:2. p. 75–80.
- Kourkoutas, Y. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*. 21. p. 377–397.
- Levin, L., Papinutti, F., & Forchiassin, M. (2004). Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology*. 94. p. 169–176.
- Liguori, R., & Faraco, V. (2016). Biological processes for advancing lignocellulosic waste biorefinery by advocating circular economy. *Bioresource Technology*. 215. p. 13–20.
- Linko, S., & Haapala, R. (1993). A critical study of lignin peroxidase activity by veratryl alcohol oxidation. *Biotechnology Techniques*. 7:1. p. 75–80.
- López, J., Sierra, M.A., & Tito, R. (2017). Planeamiento estratégico de la industria de los residuos madereros en Perú. Tesis para obtener el grado de magíster en administración estratégica de empresas. Universidad Católica, Lima-Perú. p. 157.
- López-Menchero, J. R., Ogawa, M., Mauricio, J. C., Moreno, J., & Moreno-García, J. (2021). Effect of calcium alginate coating on the cell retention and fermentation of a fungus-yeast immobilization system. 144. p. 111250.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193. p. 265–275.
- Lueangjaroenkit, P., Teerapatsaku. C., & Chitradon, L. (2018). Morphological Characteristic Regulation of Ligninolytic Enzyme Produced by *Trametes polyzona*, *Mycobiology*. 46:4. p. 396-406.
- Martínez-Patiño, J.C., Lu-Chau, T.A., Gullón, B., Ruiz, E., Romero, I., Castro, E., & Lema, J.M. (2018). Application of a combined fungal and diluted acid pretreatment on olive tree biomass. *Industrial Crops and Products*. 121. p. 10–17.
- Masra, R., Zanirun, Z., Bahrin, E.K., Ibrahim, M., Yee, P.L., & Abd-Aziz, S. (2016). Harnessing the potential of ligninolytic enzymes for lignocellulosic biomass pretreatment. *Applicative Microbiology Biotechnology* 100. p. 5231–5246.
- Mateo, C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via

- immobilization techniques. *Enzyme Microbiology Technology* 40. p. 1451–1463.
- Meehnian, H., Jana, A.K. & Jana, M.M. (2016). Effect of particle size, moisture content, and supplements on selective pretreatment of cotton stalks by *Daedalea flava* and enzymatic saccharification. *3 Biotechnology* (6): 235.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. 31. p. 426–428.
- Mikiashvili, N., Elisashvili, V., Wasser, S., & Nevo, E. (2005). Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. *Biotechnology Letters*. 27. p. 955–959.
- Min, B., Park, H., Jang, Y., Kim, J.J., Kim, K.H., Pangilinan, J., Lipzen, A., Riley, R., Grigoriev, I.V., Spatafora, J.W., & Choi, I.G. (2015). Genome sequence of a white rot fungus *Schizophora paradoxa* KUC8140 for wood decay and mycoremediation. *Journal of Biotechnology*. 211. p. 42–43.
- Mishra, A., & Kumar, S. (2007). Cyanobacterial biomass as N-supplement to agro-waste for hyper-production of laccase from *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 42:4. p. 681–685.
- Muñoz, D.F. (2014). Presente y futuro del sector forestal peruano: el caso de las concesiones y las plantaciones forestales. Recuperado de: <http://www.bcrp.gob.pe/docs/Publicaciones/Seminarios/2014/forestal/forestal-2014-munoz.pdf>
- Mussatto, S.I., Aguilar, C.N., Rodrigues, L.R., & Teixeira, J.A. (2009). Fructooligosaccharides and β -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 59. p. 76–81.
- Mustafa, A.M., Poulsen, T.G., & Sheng, K. (2016). Fungal pretreatment of rice straw with *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma reesei* to enhance methane production under solid-state anaerobic digestion. *Applied Energy* 180. p. 661–671.
- Niku-Paavola, M.L., Raaska, L., & Itävaara, M. (1990). Detection of white-rot fungi by a non toxic stain. *Mycological Research* 94:1. p.27–31.
- Odicio, C. M. (2003). Rendimiento de la madera de *Guazuma crinita* Mart. (Bolaina Blanca) en la elaboración de madera traslapada utilizando dos tipos de sierras. Tesis Ing. Forestal, Universidad Nacional de Ucayali, Perú.

- Ohm, A., Riley R., & Salamova, A. (2014). Genomics of wood-degrading fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 7. p. 82–90.
- Oficina de Gestión de la Información y Estadística Dirección General Parlamentaria. 2016. Carpeta georeferencial región Ucayali, Perú. Recuperado de: <http://www.congreso.gob.pe/Docs/DGP/GestionInformacionEstadistica/files/files/2016/1.trimestre.25.ucayali.pdf>
- Pal, A., & Khanum F. (2011). Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. *Process Biochemistry*. 46. p. 879–887.
- Pallerla, S., & Chambers, R.P. (1997). Characterization of a Ca-alginate-immobilized *Trametes versicolor* bioreactor for decolorization and AOX reduction of paper mill effluents. *Bioresource Technology* 60:1. p. 1–8.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 14. p. 81–84.
- Pandey, A, Soccol, C.R, Rodriguez-Leon, J.A., & Nigam P. (2002). Solid-state Fermentation in Biotechnology Asiatic Publishers. p. 221.
- Pannu, J.S., & Kapoor, R.K. (2014). Microbial laccases: A mini-review on their production, purification and applications. *Int j pharm arch*, Vol. 3, pp. 528-536.
- Parameswarappa Jayalakshamma, M., Ji, W., Khalil, C. A., Marhaba, T. F., Abrams, S., Lee, K., Zhang, H., & Boufadel, M. (2021). Removal of hydrocarbons from heterogenous soil using electrokinetics and surfactants. *Environmental Challenges*, 4. p. 100071.
- Revankar, M. S., & Lele, S. (2006). Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1. *Process Biochemistry*, 41:3. p. 581–588.
- Rochon, C., Margolis, H. A., & Weber, J. C. (2007). Genetic variation in growth of *Guazumacrinita* (Mart.) trees at an early age in the Peruvian Amazon. *Forest Ecology and Management*, 243:2–3. p. 291–298.
- Rodrigues, T.H.S., Pinto, G.A.S., & Gonçalves L.R.B. (2008). Effects of inoculum concentration, temperature, and carbon sources on tannase production during solid state fermentation of cashew apple bagasse. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 13. p. 571–576.

- Rodríguez, C.S., & Sanromán, M.A. (2005). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemistry Engineering Journal*. 22. p. 211–219.
- Rodríguez, Couto S., & Toca Herrera, J.L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology Advances* 24: 500–513.
- Senthuran, A., Senthuran B. Mattiasson, R., & Kaul, R. (1997). Lactic acid fermentation in recycle batch reactor using immobilized *Lactobacillus casei*. *Biotechnology Bioenergy*. 55. p. 841–853.
- Shin, K., & Lee Y. (2000). Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolushirsutus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 384:1. p. 109–115.
- Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—an overview. *Bioresources Technology*. 199. p. 76–82.
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 44:1. p. 13–18
- Souza, S., Sampaio, I., Freire, A., Khell, B., Silva, S., Sobrinho, A., Lima, A., & Souza, J. (2011). Production of *Trametes versicolor* laccase by solid state fermentation using a fixed-bed bioreactor. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 9:2. p. 55–58.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 8:1. p. 1–11.
- Tien, M., & Kirk, T. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaetechrysosporium*. *Methods in Enzymology*. p. 238–249.
- Tonin, F., Melis, R., Cordes, A., Sanchez-Amat, A., Pollegioni, L., & Rosini, E. (2016). Comparison of different microbial laccases as tools for industrial uses. *New Biotechnology*. 33:3. p. 387–398.
- Vladimir, E., Kachlishvili, E., & Asatiani, M. D. (2018). Efficient production of lignin-modifying enzymes and phenolics removal in submerged fermentation of olive mill by-products by white-rot basidiomycetes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 134, 39–47.
- Wang, Y., Zhang, X., Lu, C., Li, X., Zhou, J., & Wang, J. (2020). Lanthanum: a novel inducer for enhancement of fungal laccase production by *Shiraiabambusicola*. *Journal of*

Rare Earths.

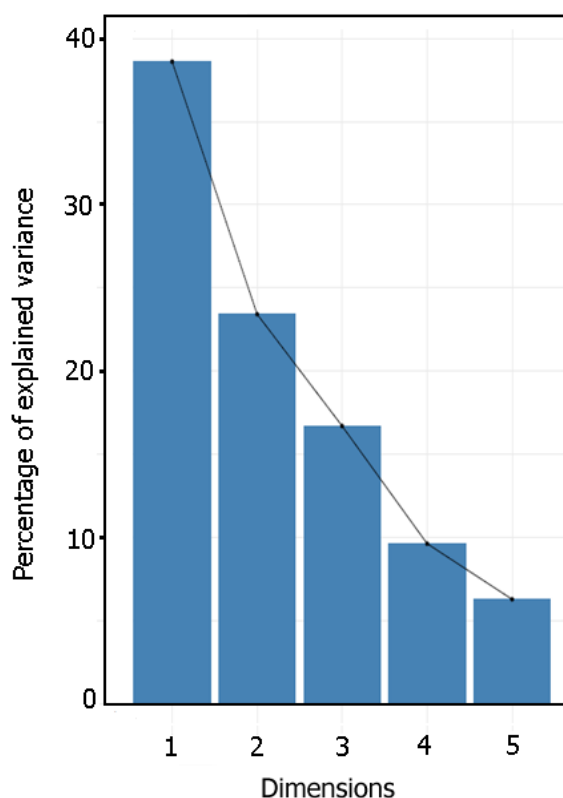
- Wariishi, H., Huang, J., Dunford, H.B., & Gold, M.H. (1991). Reactions of lignin peroxidase compounds I and II with veratryl alcohol. Transient-state kinetic characterization. *Journal of Biological Chemistry* 266. p. 20694–20699.
- Welti, S., Moreau, P-A., Favel, A., Courtecuisse, R., Haon, M., Navarro, D., Taussac, S., & Lesage-Meessen, L. (2012). Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera, and description of a new genus *Leiotrametes*. *Fungal Diversity* 55:1. p. 47–64.
- Wong, D.W.S. (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157:2. p.174–209.
- Xin, F, & Geng, A. (2011). Utilization of Horticultural Waste for Laccase Production by *Trametes versicolor* Under Solid-State Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 163:2. p. 235-246.
- Xue, J., Wu Y., Shi, K., Xiao, X., Gao, Y., Li, L., & Qiao, Y. (2019). Study on the degradation performance and kinetics of immobilized cells in straw-alginate beads in marine environment. *Bioresource Technology*. 280. p. 88–94.
- Yan, J., Chen, Y., Niu, J., Chen, D., & Chagan, I. 2015. Laccasa producida por una cepa termotolerante de *Trametes troglodytes* LK13. *Revista Brasileira de Microbiología* 46 (1): 59–65.
- Yan, J., Niu, J., Chen, D., Chen, Y., & Irbis, C. (2014). Screening of *Trametes* strains for efficient decolorization of malachite green at high temperatures and ionic concentrations. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 87, 109–115.
- Yu, Z., Zeng, G. M., Chen, Y. N., Zhang, J. C., Yu, Y., Li, H., Liu, Z. F., & Tang, L. (2011). Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* on remediation of pentachlorophenol-contaminated soil waste by composting. *Process Biochemistry*, 46:6. p. 1285–1291.
- Zabed H., Sultana S., Sahu J.N., & Qi X. (2018). An overview on the application of ligninolytic microorganisms and enzymes for pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Sarangi P., Nanda S., Mohanty P. (eds), *Recent Advancements in Biofuels and Bioenergy Utilization*: Springer, Singapore.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Con el análisis factorial se calculan, a partir de una matriz de observaciones y variables, unas nuevas variables (indicadas como factores, o dimensiones) que explican y resumen la información distribuida en la matriz original de datos. Se calculan tantos factores cuantas son las variables originarias, de los cuales pero solo los 2-3 primeros tienen un valor descriptivo, debido al mayor porcentaje de varianza que explican. Por eso, se pueden usar los dos primeros factores para describir las relaciones entre las observaciones (cada número en los gráficos corresponde a una muestra o medida), observando cómo estas se separan recíprocamente o se agrupan, en un solo plan factorial.

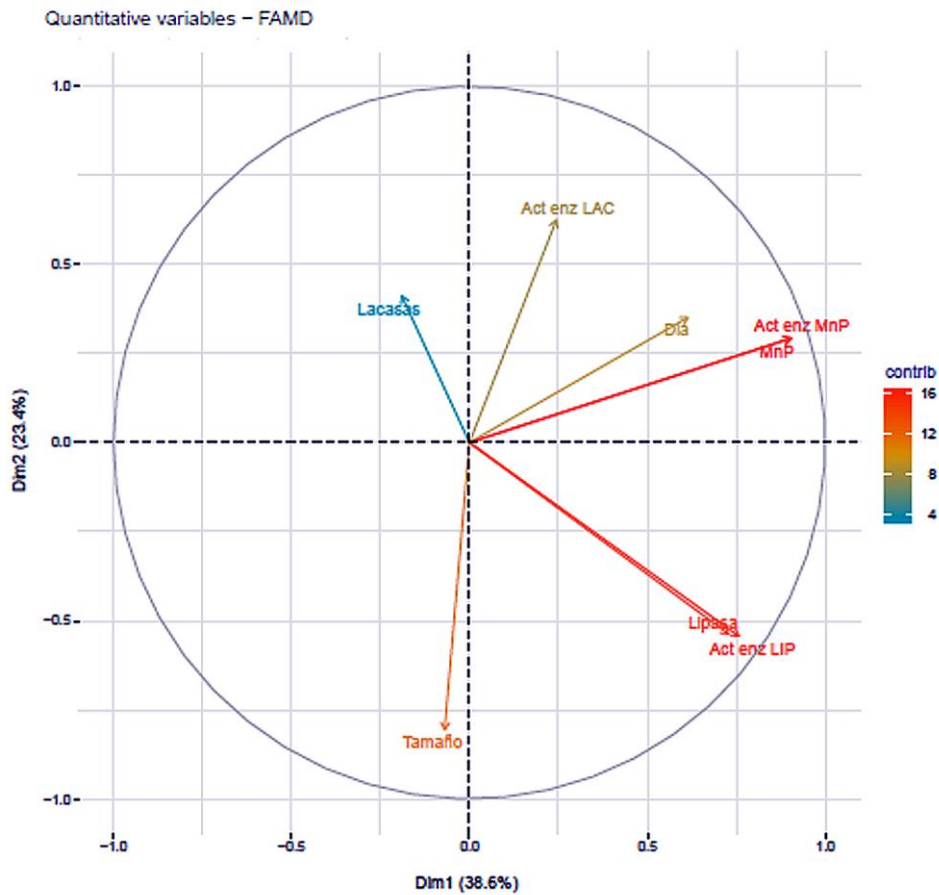
1.1. Dimensiones que explican el 60% de la variabilidad de la matriz inicial (FAMD)

Los factores manganeso y lignina peroxidasa explicaron más del 60 % de la varianza de la matriz inicial, cada dimensión representan nuevas variables extraídas de las originarias en el análisis factorial (FAMD).



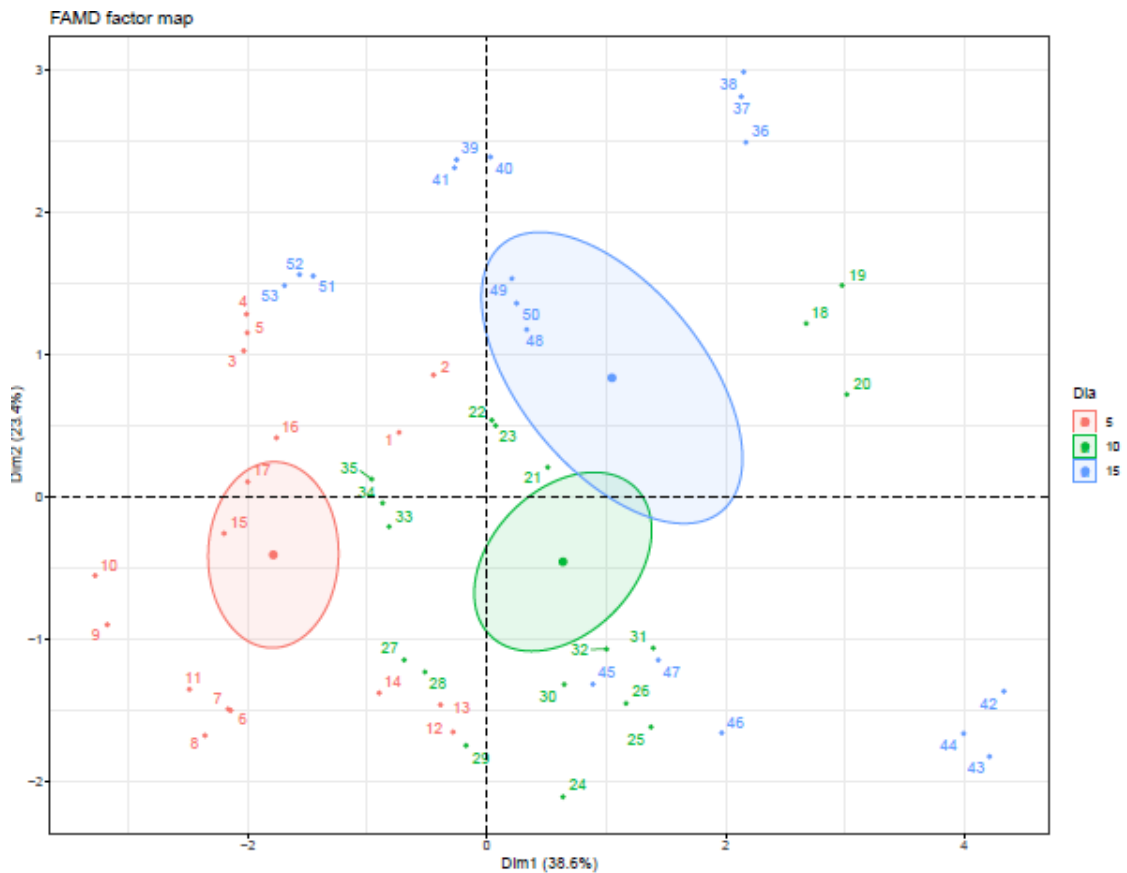
1.2. Plano en el que se reparten la actividad enzimática y el tamaño de partícula

Los factores actividad enzimática y tamaño de partícula permitieron repartir las observaciones sobre un único plano. El primer factor resultó correlacionado significativamente y positivamente con las variables de actividad enzimática de Manganeso y Lignina peroxidasa, en el segundo resultó correlacionado negativamente con la variable tamaño y positivamente con la actividad de lacasa. El gradiente de colores indica el nivel de contribución de las variables.



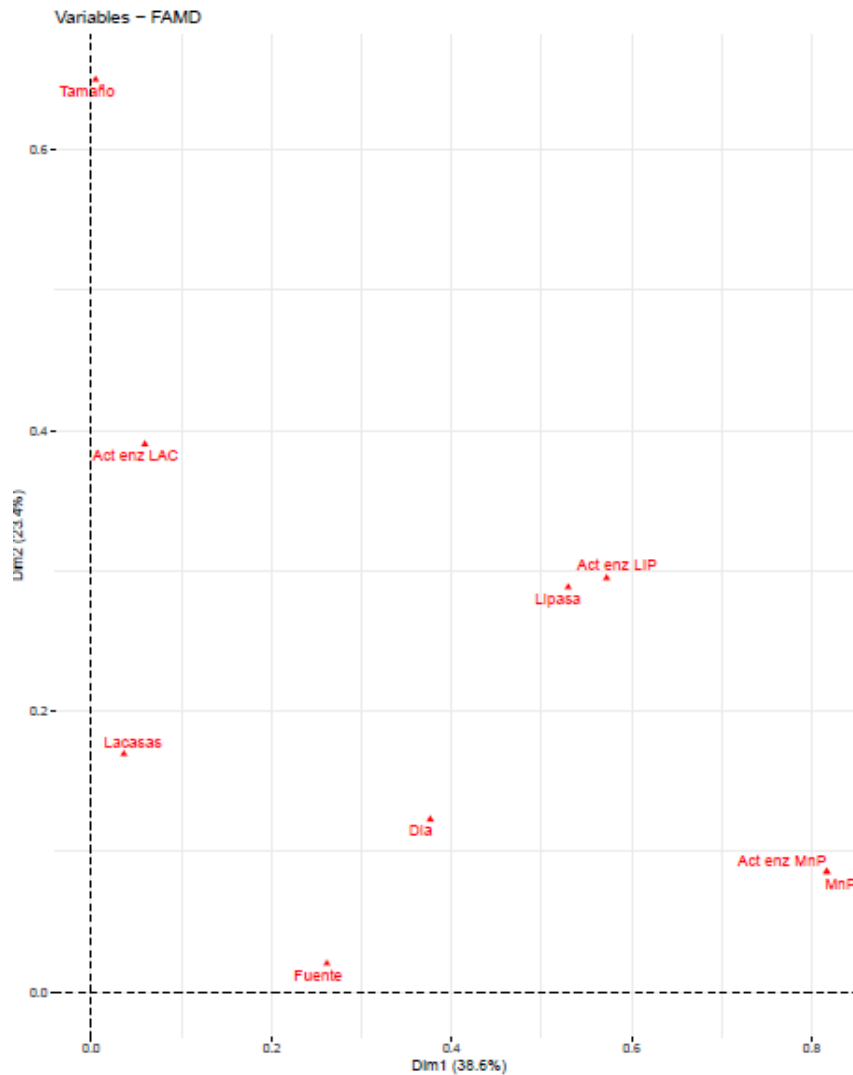
1.3. Las dimensiones 1 y 2 se colocan nuevamente en un plano para determinar la interacción que tienen con respecto a los días de incubación

Las nuevas coordenadas de las observaciones en el plano de los dos primeros factores pueden usarse para ver las muestras según las variables cualitativas (indicadas en colores). La cercanía de las observaciones indica su similitud. Considerando la variable “día”, las muestras se agruparon de una manera homogénea en grupos por día 5 (rojo) y 10 (verde), mientras que a las 15 horas (azul) se repartió en dos grupos, el primero con partículas de menor tamaño y el segundo de mayor tamaño y actividad enzimática, principalmente de Mn peroxidasa (observaciones 42-47, los puntos indican los promedios de las muestras por variable cualitativa y los círculos indican su intervalo de confianza). Estas dos variables fueron las que más tuvieron un “peso” en los factores o dimensiones 1 y 2.

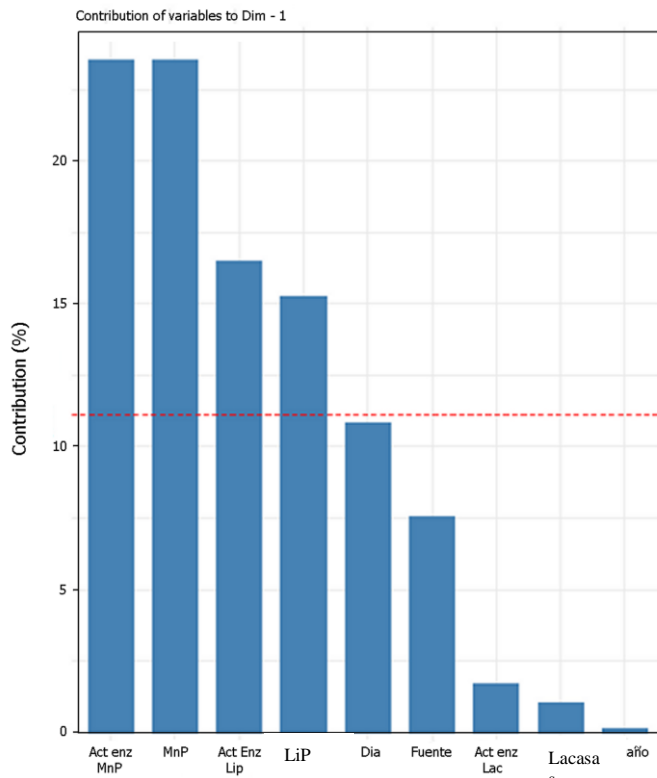


1.4. Tamaño de partícula y actividad de manganeso y lignina peroxidasa contribuyeron en un 50% al factor 2

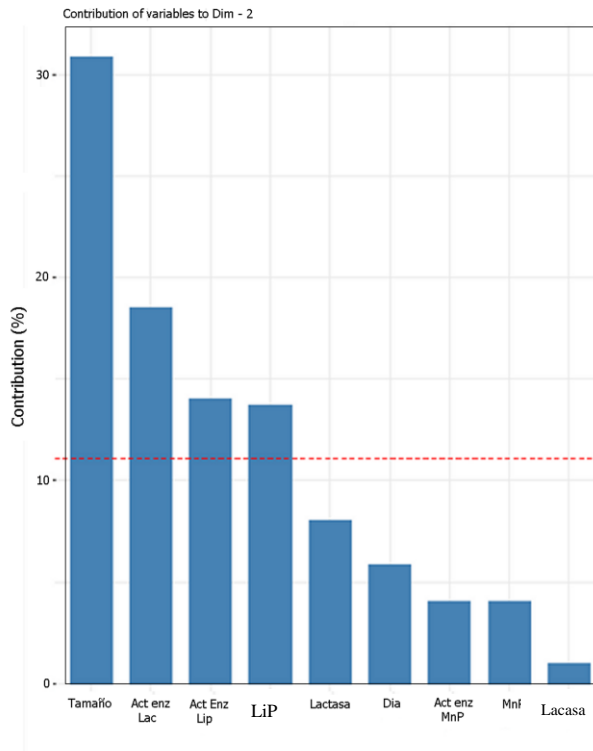
La variable “tamaño de partícula” (excluyendo actividad enzimática de lacasas) fueron las variables que contribuyeron en mayor proporción al factor 2 (alcanzando juntos alrededor del 50%). Las dos variables relacionadas a la actividad enzimática manganeso peroxidasa fueron las que mayormente explicaron el primer factor anexo 4: a-c, la línea roja en los Anexos 4b y 4c indica el nivel promedio.



1.5. Nivel promedio de varianza

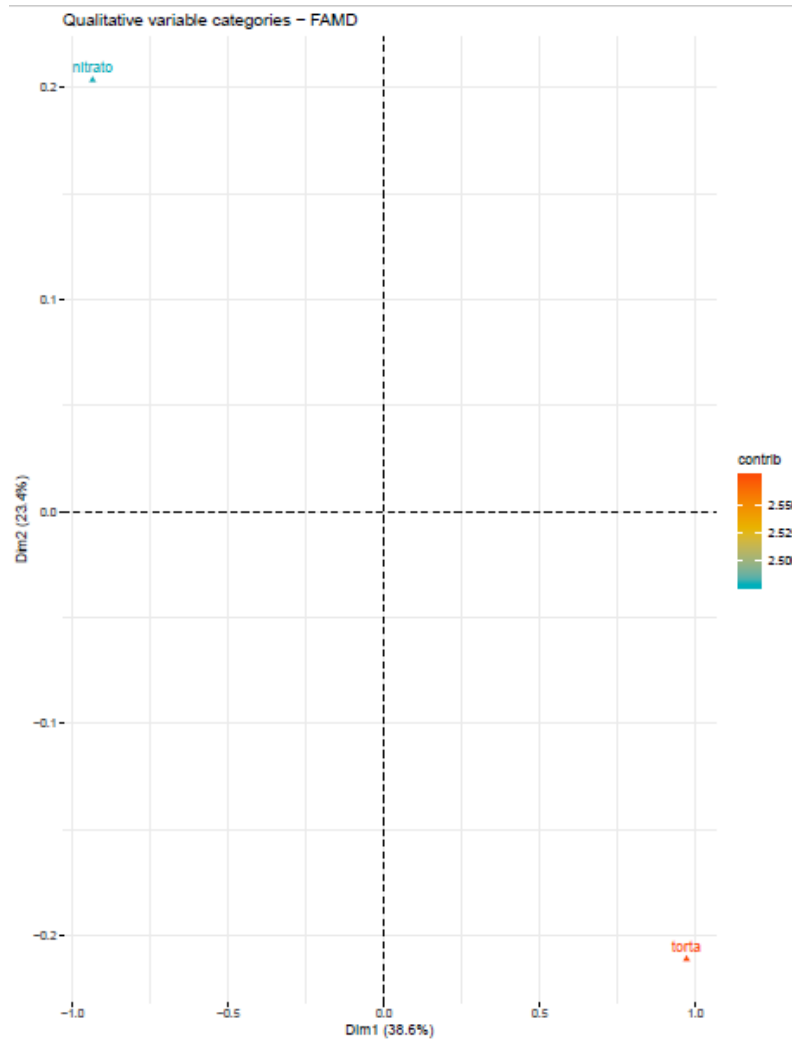


1.6. Nivel promedio de varianza



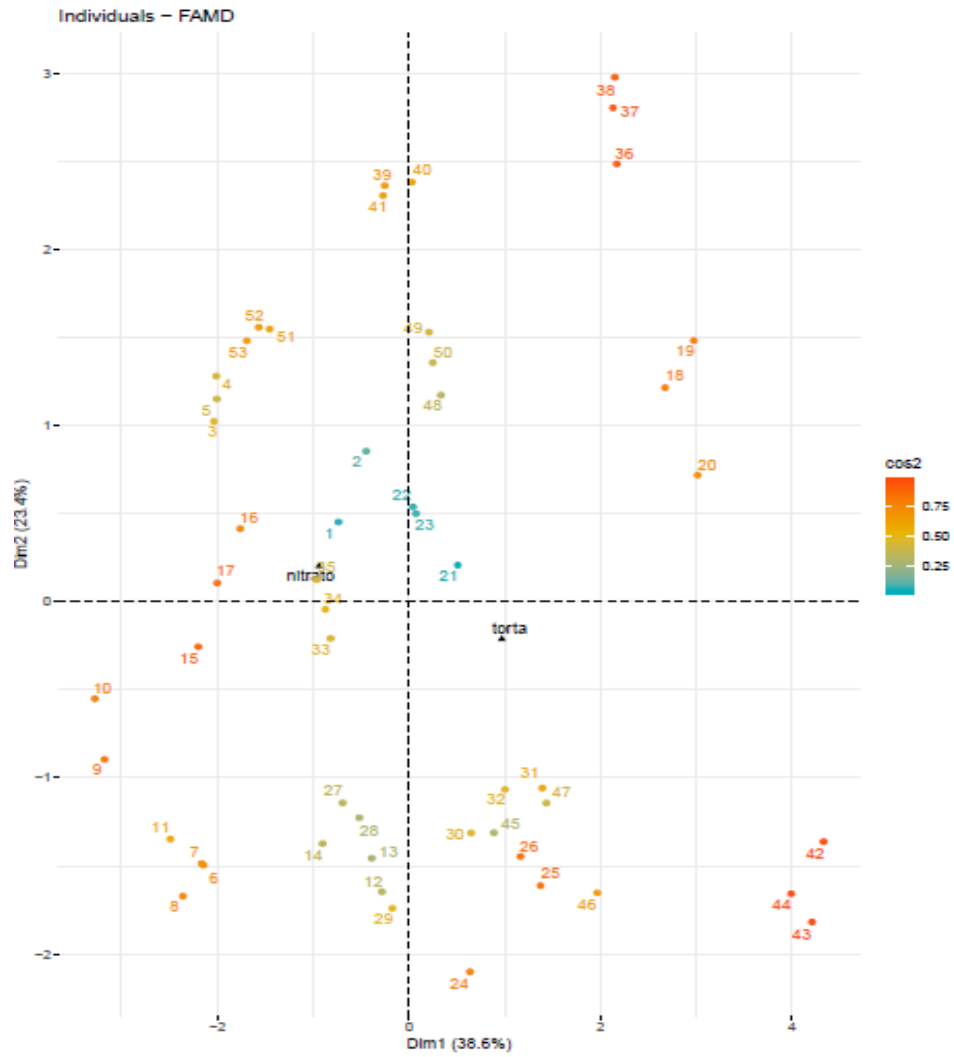
1.7. Nitrato de sodio y torta de soya (fuente nitrogenada) incluidas en el plano factorial

La variable cualitativa “Fuente nitrogenada” indicó efectos opuestos sea el nitrato de amonio y la torta de soya, puestos a dos extremos del plano factorial, siendo la más importante la “torta de soya” debido a una elevada correlación con el primer factor de actividad enzimática (Manganeso y lignina peroxidasa).

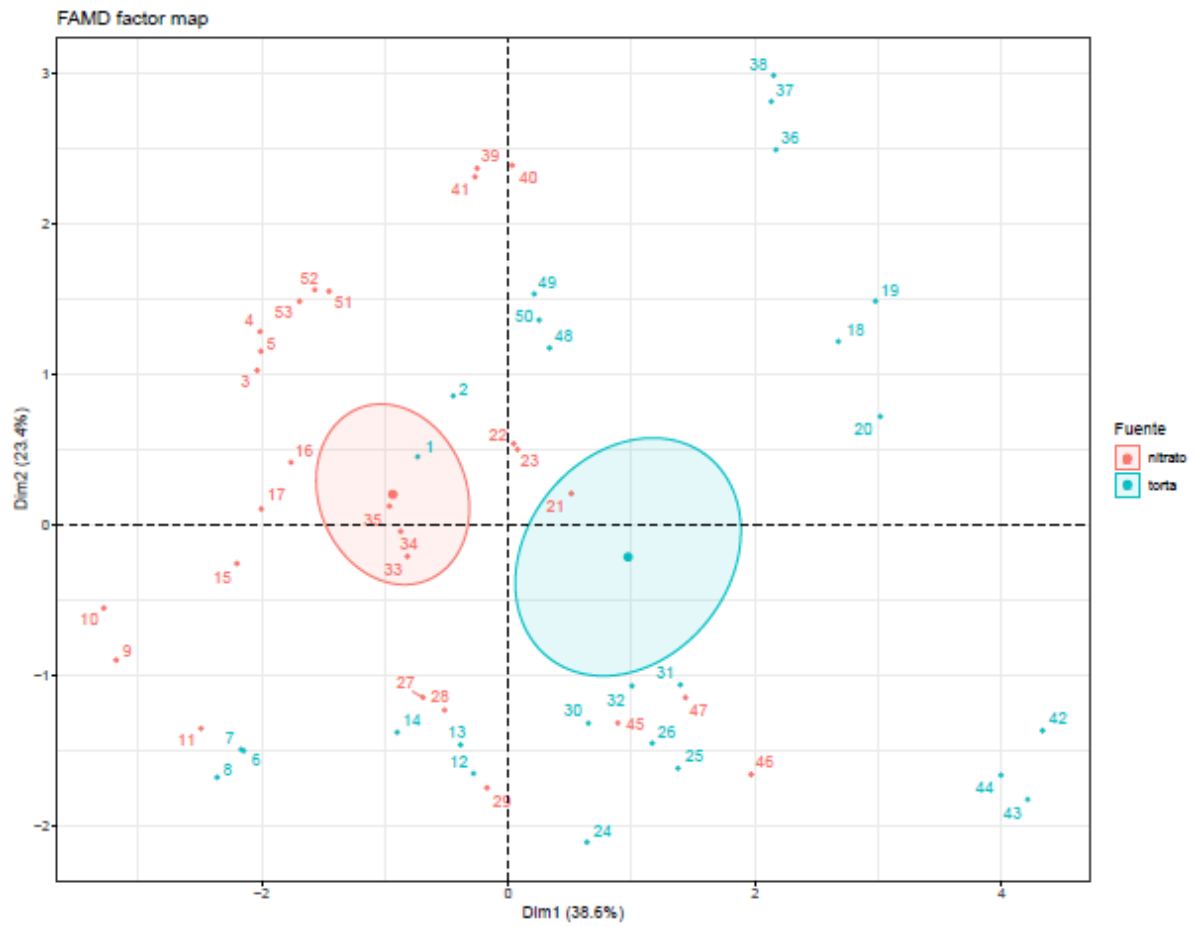


1.8. Representación de las observaciones indicada en escala de colores cos2

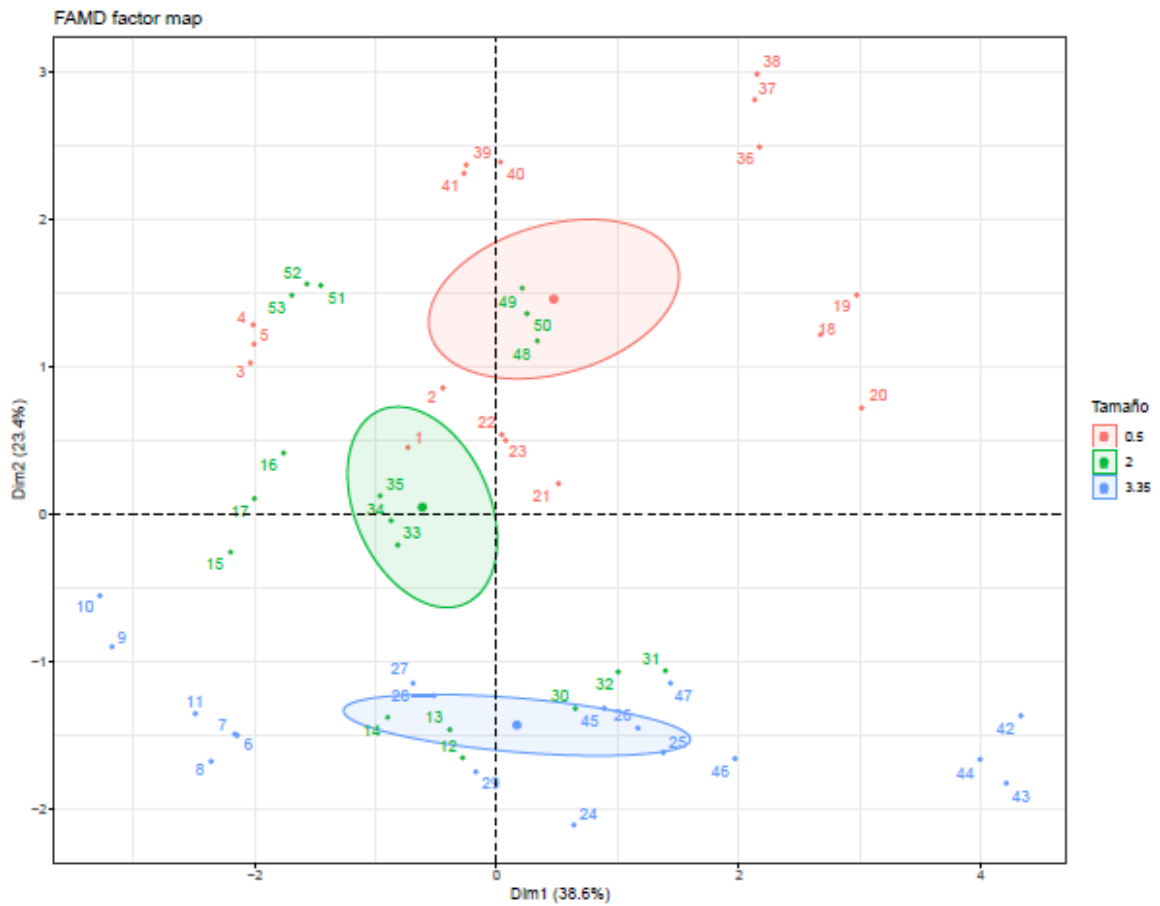
Se muestra la calidad de la representación de las observaciones, indicada en escalera de colores del cos2 (si los valores se acercan a 1 entonces las observaciones están correctamente representadas en el primer plano factorial).



1.9. Observaciones en función a la variable cualitativa "Fuente nitrogenada"



1.10. Observaciones en función a la variable cualitativa “Tamaño de partícula”.



Anexo 2: Comparación de la producción de lacasas empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soja como fuente de nitrógeno.

2.1. Comparación de la producción de lacasas empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soja como fuente de nitrógeno a las 120 horas.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor F
TRAT	3	0.10890	0.03630	3.40	0.074
Error	8	0.08543	0.01068		
Total	11	0.19433			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
10 - 5	-0.2318	(-0.5021; 0.0384)	No
15 - 5	-0.0940	(-0.3642; 0.1763)	No
20 - 5	0.0016	(-0.2687; 0.2718)	No
15 - 10	0.1379	(-0.1324; 0.4082)	No
20 - 10	0.2334	(-0.0369; 0.5037)	No
20 - 15	0.0955	(-0.1748; 0.3658)	No

2.2. Comparación de la producción de lacasas empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soja como fuente de nitrógeno a las 240 horas.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	3	0.01233	0.004111	0.64	0.613
Error	8	0.05177	0.006472		
Total	11	0.06411			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
10 - 5	-0.0408	(-0.2512; 0.1696)	No
15 - 5	0.0495	(-0.1609; 0.2599)	No
20 - 5	0.0082	(-0.2022; 0.2186)	No
15 - 10	0.0903	(-0.1201; 0.3007)	No
20 - 10	0.0490	(-0.1614; 0.2594)	No
20 - 15	-0.0413	(-0.2517; 0.1691)	No

2.3. Comparación de la producción de lacasas empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente de nitrógeno a las 360 horas.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	3	0.01725	0.005748	1.32	0.333
Error	8	0.03480	0.004349		
Total	11	0.05204			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
10 - 5	0.0080	(-0.1645; 0.1805)	No
15 - 5	0.0198	(-0.1527; 0.1923)	No
20 - 5	-0.0768	(-0.2492; 0.0957)	No
15 - 10	0.0118	(-0.1607; 0.1843)	No
20 - 10	-0.0847	(-0.2572; 0.0877)	No
20 - 15	-0.0966	(-0.2690; 0.0759)	No

Anexo 3: Producción de manganeso peroxidasa empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente de nitrógeno.

3.1. Producción de manganeso peroxidasa empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente de nitrógeno a las 120 horas.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	3	0.01064	0.003548	1.85	0.216
Error	8	0.01530	0.001913		
Total	11	0.02594			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
10 - 5	-0.0773	(-0.1917; 0.0370)	No
15 - 5	-0.0606	(-0.1750; 0.0538)	No
20 - 5	-0.0637	(-0.1781; 0.0507)	No
15 - 10	0.0167	(-0.0976; 0.1311)	No
20 - 10	0.0137	(-0.1007; 0.1280)	No
20 - 15	-0.0031	(-0.1175; 0.1113)	No

3.2. Producción de manganeso peroxidasa empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente de nitrógeno a las 240 horas.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MCAjust.	Valor F	Valor p
TRAT	3	0.002313	0.000771	0.42	0.744
Error	8	0.014681	0.001835		
Total	11	0.016995			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
10 - 5	0.0340	(-0.0781; 0.1460)	No
15 - 5	0.0266	(-0.0854; 0.1387)	No
20 - 5	0.0335	(-0.0786; 0.1455)	No
15 - 10	-0.0073	(-0.1194; 0.1047)	No
20 - 10	-0.0005	(-0.1125; 0.1116)	No
20 - 15	0.0068	(-0.1052; 0.1189)	No

3.3. Producción de manganeso peroxidasa empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies conteniendo partículas de 0.5 mm y torta de soya como fuente de nitrógeno a las 360 horas.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	3	0.000304	0.000101	0.06	0.980
Error	8	0.013604	0.001701		
Total	11	0.013908			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
10 - 5	0.0052	(-0.1027; 0.1131)	No
15 - 5	-0.0050	(-0.1129; 0.1028)	No
20 - 5	0.0081	(-0.0997; 0.1160)	No
15 - 10	-0.0102	(-0.1181; 0.0976)	No
20 - 10	0.0029	(-0.1049; 0.1108)	No
20 - 15	0.0132	(-0.0947; 0.1210)	No

Anexo 4: Producción de lignina peroxidasa empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente de nitrógeno.

4.1. Producción de lignina peroxidasa empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente de nitrógeno a las 120 horas.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	3	0.01414	0.004713	0.44	0.728
Error	8	0.08480	0.010600		
Total	11	0.09894			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
10 - 5	-0.0387	(-0.3080; 0.2306)	No
15 - 5	-0.0903	(-0.3596; 0.1790)	No
20 - 5	-0.0146	(-0.2839; 0.2547)	No
15 - 10	-0.0516	(-0.3209; 0.2177)	No
20 - 10	0.0241	(-0.2452; 0.2934)	No
20 - 15	0.0757	(-0.1935; 0.3450)	No

4.2. Producción de lignina peroxidasa empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente de nitrógeno a las 240 horas.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	3	0.04606	0.015355	1.71	0.241
Error	8	0.07166	0.008957		
Total	11	0.11772			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
10 - 5	0.0132	(-0.2343; 0.2607)	No
15 - 5	-0.1447	(-0.3923; 0.1028)	No
20 - 5	-0.0449	(-0.2924; 0.2026)	No
15 - 10	-0.1579	(-0.4055; 0.0896)	No
20 - 10	-0.0581	(-0.3056; 0.1895)	No
20 - 15	0.0999	(-0.1477; 0.3474)	No

4.3. Producción de lignina peroxidasa empleando diferentes concentraciones de inóculo 5, 10, 15 y 20% (v/v) durante la Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaño de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente de nitrógeno a las 360 horas.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	3	0.03451	0.01150	1.13	0.393
Error	8	0.08129	0.01016		
Total	11	0.11580			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
10 - 5	-0.0651	(-0.3287; 0.1986)	No
15 - 5	-0.0087	(-0.2723; 0.2549)	No
20 - 5	0.0850	(-0.1787; 0.3486)	No
15 - 10	0.0564	(-0.2073; 0.3200)	No
20 - 10	0.1501	(-0.1136; 0.4137)	No
20 - 15	0.0937	(-0.1700; 0.3573)	No

Anexo 5: Producción de Lacasas empleando diferentes concentraciones de CuSO₄ 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente nitrogenada.

5.1. Producción de Lacasas empleando diferentes concentraciones de CuSO₄ 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente nitrogenada a las 120 horas.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	4	1.69378	0.423445	119.99	0.000
Error	10	0.03529	0.003529		
Total	14	1.72907			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
2 - 0	-0.1304	(-0.2899; 0.0290)	No
3 - 0	0.3227	(0.1632; 0.4821)	Si
4 - 0	0.5837	(0.4242; 0.7432)	Si
5 - 0	0.7567	(0.5972; 0.9161)	Si
3 - 2	0.4531	(0.2936; 0.6126)	Si
4 - 2	0.7141	(0.5546; 0.8736)	Si
5 - 2	0.8871	(0.7276; 1.0466)	Si
4 - 3	0.2610	(0.1015; 0.4205)	Si
5 - 3	0.4340	(0.2745; 0.5935)	Si
5 - 4	0.1730	(0.0135; 0.3325)	Si

5.2 Producción de Lacasas empleando diferentes concentraciones de CuSO₄ 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente nitrogenada a las 240 horas

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	4	4.1005	1.02512	81.00	0.000
Error	10	0.1266	0.01266		
Total	14	4.2271			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
2 - 0	0.4293	(0.1272; 0.7313)	Si
3 - 0	0.8805	(0.5784; 1.1825)	Si
4 - 0	1.0743	(0.7722; 1.3763)	Si
5 - 0	1.5140	(1.2120; 1.8160)	Si
3 - 2	0.4512	(0.1492; 0.7532)	Si
4 - 2	0.6450	(0.3430; 0.9470)	Si
5 - 2	1.0847	(0.7827; 1.3867)	Si
4 - 3	0.1938	(-0.1082; 0.4958)	No
5 - 3	0.6335	(0.3315; 0.9356)	Si
5 - 4	0.4397	(0.1377; 0.7417)	Si

5.3. Producción de Lacasas empleando diferentes concentraciones de CuSO_4 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente nitrogenada a las 360 horas

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	4	4.30634	1.07658	191.30	0.000
Error	10	0.05628	0.00563		
Total	14	4.36261			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
2 - 0	0.0491	(-0.1523; 0.2505)	No
3 - 0	0.5784	(0.3770; 0.7798)	Si
4 - 0	0.7938	(0.5924; 0.9952)	Si
5 - 0	1.4584	(1.2570; 1.6598)	Si
3 - 2	0.5293	(0.3279; 0.7307)	Si
4 - 2	0.7447	(0.5433; 0.9461)	Si
5 - 2	1.4093	(1.2079; 1.6107)	Si
4 - 3	0.2153	(0.0139; 0.4167)	Si
5 - 3	0.8800	(0.6786; 1.0814)	Sí
5 - 4	0.6646	(0.4632; 0.8660)	Sí

Anexo 6: Producción de manganeso peroxidasa empleando diferentes concentraciones de CuSO₄ 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente nitrogenada.

6.1. Producción de manganeso peroxidasa empleando diferentes concentraciones de CuSO₄ 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente nitrogenada a las 120 horas.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
RAT	4	0.2782	0.06954	4.40	0.026
Error	10	0.1581	0.01581		
Total	14	0.4362			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
2 - 0	0.171	(-0.166; 0.509)	No
3 - 0	0.249	(-0.088; 0.587)	No
4 - 0	0.335	(-0.002; 0.673)	Sí
5 - 0	0.388	(0.050; 0.726)	Sí
3 - 2	0.078	(-0.260; 0.416)	No
4 - 2	0.164	(-0.174; 0.501)	Sí
5 - 2	0.217	(-0.121; 0.554)	No
4 - 3	0.086	(-0.252; 0.423)	Sí
5 - 3	0.139	(-0.199; 0.476)	No
5 - 4	0.053	(-0.285; 0.391)	No

6.2. Producción de manganeso peroxidasa empleando diferentes concentraciones de CuSO₄ 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente nitrogenada a las 240 horas.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
RAT	4	0.32852	0.082130	60.97	0.000
Error	10	0.01347	0.001347		
Total	14	0.34199			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
-----------------------------------	-----------------------------	-----------------------------	----------------------

2 - 0	-0.0931	(-0.1917; 0.0054)	No
3 - 0	0.2044	(0.1059; 0.3030)	Si
4 - 0	0.1893	(0.0908; 0.2878)	Sí
5 - 0	0.3144	(0.2159; 0.4130)	Si
3 - 2	0.2975	(0.1990; 0.3961)	Si
4 - 2	0.2824	(0.1839; 0.3810)	Si
5 - 2	0.4075	(0.3090; 0.5061)	Si
4 - 3	-0.0151	(-0.1137; 0.0834)	No
5 - 3	0.1100	(0.0115; 0.2086)	Si
5 - 4	0.1251	(0.0266; 0.2237)	Si

6.3. Producción de manganeso peroxidasa empleando diferentes concentraciones de CuSO₄ 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente nitrogenada a las 360 horas

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	4	0.242340	0.060585	113.45	0.000
Error	10	0.005340	0.000534		
Total	14	0.247681			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
2 - 0	-0.2559	(-0.3179; -0.1938)	Si
3 - 0	-0.0986	(-0.1606; -0.0365)	Si
4 - 0	-0.0409	(-0.1029; 0.0212)	No
5 - 0	0.1330	(0.0710; 0.1950)	Si
3 - 2	0.1573	(0.0953; 0.2193)	Si
4 - 2	0.2150	(0.1529; 0.2770)	No
5 - 2	0.3889	(0.3268; 0.4509)	Si
4 - 3	0.0577	(-0.0044; 0.1197)	No
5 - 3	0.2316	(0.1695; 0.2936)	Si
5 - 4	0.1739	(0.1118; 0.2359)	Si

Anexo 7: Producción de Lignina peroxidasa empleando diferentes concentraciones de CuSO₄ 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente nitrogenada.

7.1. Producción de Lignina peroxidasa empleando diferentes concentraciones de CuSO₄ 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente nitrogenada a las 120 horas.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
RAT	4	2.8347	0.70868	37.50	0.000
Error	10	0.1890	0.01890		
Total	14	3.0237			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
2 - 0	-0.909	(-1.278; -0.540)	Si
3 - 0	0.177	(-0.192; 0.546)	No
4 - 0	0.136	(-0.233; 0.506)	No
5 - 0	0.294	(-0.075; 0.663)	No
3 - 2	1.086	(0.717; 1.455)	Si
4 - 2	1.046	(0.677; 1.415)	Si
5 - 2	1.203	(0.834; 1.572)	Si
4 - 3	-0.040	(-0.409; 0.329)	No
5 - 3	0.117	(-0.252; 0.486)	Si
5 - 4	0.158	(-0.211; 0.527)	Si

7.2. Producción de Lignina peroxidasa empleando diferentes concentraciones de CuSO₄ 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente nitrogenada a las 240 horas.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	4	1.5479	0.38698	28.13	0.000
Error	10	0.1376	0.01376		
Total	14	1.6855			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
2 - 0	-0.7690	(-1.0839; -0.4541)	Si
3 - 0	0.0736	(-0.2413; 0.3885)	No
4 - 0	-0.1735	(-0.4884; 0.1414)	No
5 - 0	0.0946	(-0.2203; 0.4095)	No
3 - 2	0.8426	(0.5277; 1.1575)	Si
4 - 2	0.5955	(0.2806; 0.9104)	Si
5 - 2	0.8637	(0.5488; 1.1785)	Si
4 - 3	-0.2471	(-0.5620; 0.0678)	No
5 - 3	0.0210	(-0.2938; 0.3359)	No
5 - 4	0.2682	(-0.0467; 0.5830)	No

7.3. Producción de Lignina peroxidasa empleando diferentes concentraciones de CuSO₄ 0, 2, 3, 4 y 5 mM en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies con tamaños de partículas de 0.5 mm de Bolaina blanca y torta de soya como fuente nitrogenada a las 360 horas

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	4	4.7795	1.19487	57.46	0.000
Error	10	0.2080	0.02080		
Total	14	4.9874			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
2 - 0	0.762	(0.374; 1.149)	Si
3 - 0	1.369	(0.981; 1.756)	Si
4 - 0	1.318	(0.931; 1.705)	Si
5 - 0	1.547	(1.160; 1.934)	Si
3 - 2	0.607	(0.220; 0.994)	Si
4 - 2	0.557	(0.170; 0.944)	Si
5 - 2	0.785	(0.398; 1.173)	Si
4 - 3	-0.050	(-0.437; 0.337)	No
5 - 3	0.178	(-0.209; 0.566)	No

Anexo 8: Producción de lacasas, manganeso y lignina peroxidasa del medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado de *Trametes polyzona* LMB TM5.

8.1. Producción de lacasas, manganeso y lignina peroxidasa del medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado de *Trametes polyzona* LMB TM5.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	2	1.35477	0.677386	126.15	0.000
Error	6	0.03222	0.005370		
Total	8	1.38699			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
240 - 120	0.6662	(0.4826; 0.8498)	Si
360 - 120	0.9201	(0.7365; 1.1037)	Si
360 - 240	0.2539	(0.0703; 0.4375)	Si

8.2. Producción demanganeso peroxidasa del medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado de *Trametes polyzona* LMB-TM5.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	2	0.05723	0.028617	16.84	0.003
Error	6	0.01019	0.001699		
Total	8	0.06743			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
240 - 120	0.1864	(0.0831; 0.2897)	Si
360 - 120	0.0426	(-0.0607; 0.1459)	Si
360 - 240	-0.1438	(-0.2471; -0.0405)	Si

8.3. Producción de lignina peroxidasa del medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado de *Trametespolyzona* LMB-TM5.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	2	0.96132	0.48066	36.07	0.000
Error	6	0.07996	0.01333		
Total	8	1.04127			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
240 - 120	0.4014	(0.1121; 0.6907)	Si
360 - 120	0.8005	(0.5113; 1.0898)	Si
360 - 240	0.3992	(0.1099; 0.6884)	Si

Anexo 9: Degradación de lignina insoluble llevada a cabo por *Trametes polyzona* LMB TM5 en cultivos de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	3	16.403	5.4676	9.22	0.006
Error	8	4.744	0.5930		
Total	11	21.147			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
5 - 0	-0.180	(-2.194; 1.834)	No
10 - 0	-1.660	(-3.674; 0.354)	No
15 - 0	-2.867	(-4.881; -0.853)	Si
10 - 5	-1.480	(-3.494; 0.534)	No
15 - 5	-2.687	(-4.701; -0.673)	Si
15 - 10	-1.207	(-3.221; 0.807)	No

Anexo 10: Producción enzimática de lacasas y manganeso peroxidasa de las perlas de alginato de *Trametes polyzona* LMB TM5 en el medio de Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado.

10.1. Parámetros de productividad de lacasas producidas por las perlas de alginato de *Trametes polyzona* LMB TM5 deshidratadas y almacenadas a 25°C a las 24, 120, 240

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	2	3.95668	1.97834	1072.06	0.000
Error	6	0.01107	0.00185		
Total	8	3.96775			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
120 - 24	-0.7430	(-0.8507; -0.6354)	Si
240 - 24	-1.6222	(-1.7299; -1.5146)	Si
240 - 120	-0.8792	(-0.9868; -0.7715)	Si

10.2. Parámetros de productividad de Manganeso peroxidasa producidas por las perlas de alginato de *Trametes polyzona* LMB TM5 deshidratadas y almacenadas a 25°C a las 24, 120, 240 horas

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	2	4.11439	2.05719	1786.93	0.000
Error	6	0.00691	0.00115		
Total	8	4.12130			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
120 - 24	-0.9522	(-1.0372; -0.8672)	Si
240 - 24	-1.6496	(-1.7347; -1.5646)	Si
240 - 120	-0.6974	(-0.7825; -0.6124)	Si

Anexo 11: Producción de lacasas, manganeso y lignina peroxidasa utilizando perlas de alginato y células no inmovilizadas en un cultivo de la Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado a las 360 horas.

11.1. Producción de lacasas utilizando perlas de alginato y células no inmovilizadas en un cultivo de la Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado a 360 h.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	7.06332	7.06332	2685.64	0.000
Error	4	0.01052	0.00263		
Total	5	7.07384			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
perlas de alginato - células libres	2.1700	(2.0537; 2.2863)	Si

11.2. Producción de manganeso peroxidasa utilizando perlas de alginato y células no inmovilizadas en un cultivo de la Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado a 360 h.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	4.94367	4.94367	355.22	0.000
Error	4	0.05567	0.01392		
Total	5	4.99934			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
perlas de alginato - células libres-	1.8154	(1.5480; 2.0829)	Si

11.3. Producción de lacasas, manganeso y lignina peroxidasa utilizando perlas de alginato, perlas de alginato deshidratadas y células no inmovilizadas en un cultivo de la Fermentación por Adhesión a Superficies estandarizado a las 360 horas.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRAT	1	4.84367	4.84367	375.22	0.000
Error	4	0.05567	0.01392		
Total	5	4.99934			

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de TRAT niveles	Diferencia de medias	IC simultáneo de 95%	Significancia
perlas de alginato - células libres-	1.9154	(1.6480; 2.1829)	Si