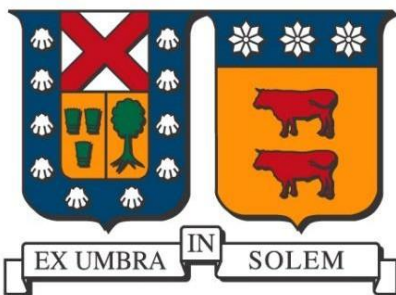


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
SANTIAGO-CHILE



ESCALAMIENTO DE PRODUCCIÓN DE ENZIMA LACASA EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA

YOMARA JASMÍN LABRÍN VELÁSQUEZ

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA CIVIL QUÍMICA

PROFESORA GUÍA: DRA. ANDREA CARVAJAL
PROFESORA CORREFERENTE: DRA. CAROLYN PALMA

ENERO - 2025

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de mi proceso universitario y en especial durante el último año de carrera, muchas personas han contribuido de diferentes maneras y quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas ellas. En primer lugar, quiero agradecer a las profesoras que guiaron este estudio, Andrea Carvajal y Carolyn Palma, quienes me orientaron y permitieron ampliar y reforzar mis conocimientos para realizar de buena manera esta memoria, del mismo modo, agradecer a las apoyo de laboratorio “Vicky” y “Anu” por su disposición a ayudar en el trabajo experimental. En general, al Departamento IQA de la Universidad Técnica Federico Santa María y al proyecto FONDEF ID22I10011 por financiar este estudio.

A la persona que me ha acompañado como pareja durante mis seis años de universidad, mi Dieguito, quien ha contribuido de manera significativa en mis estudios y en mi vida personal, por amarme incondicionalmente, protegerme, darme felicidad, estar ahí cuando nadie más lo estuvo y, sobre todo, por demostrarme que el amor sincero existe. Agradezco cada palabra de aliento, cada sonrisa y cada vez que me prestó su hombro y me escuchó en momentos difíciles. Es mi pilar, cable a tierra y es quien creyó siempre en mí, inspirándome a mejorar.

A mi mamá por el sacrificio que hizo para que pudiera completar mis estudios y en especial a mis hermanas Jacqueline y Yanira, quienes fueron mi motivación para finalizar este proceso, me han inspirado a ser una mejor persona y a quienes amo por sobre todo.

A mis amigos de la universidad, ya que formaron parte de mi día a día y me acompañaron en momentos de estudio y estrés, además, por ser parte de mis distracciones y de las instancias de ratos agradables, por cada carrete, junta o panorama fuera de la universidad. En particular, quiero agradecer a mi Amalia y sus padres, quienes me abrieron las puertas de su casa y me consideraron en instancias familiares, por cada palabra sabia, asado, viaje, comida y cariño inmenso que me dieron. Agradezco tener una mejor amiga/hermana como ella, con quien todo es mutuo, me acepta tal cual soy y me quiere de manera sincera y leal.

Finalmente, a mi Patito, quien se convirtió en alguien muy importante en mi vida, por confiar en mí y ser un apoyo fundamental durante mi último año de carrera, por creer en mí, cuidarme y alentarme a finalizar esta etapa, por esperarme afuera del laboratorio, irme a buscar, escucharme antes de cada presentación y por consolarme cuando la frustración y la angustia se hacían presente. No tengo palabras para expresar lo que significó su llegada a mi vida.

Muchas gracias a todas las personas que contribuyeron positivamente en mi vida universitaria y personal, a todos aquellos que permitieron que esta memoria fuera llevada a cabo. Me ayudaron cumplir este logro, crecer como persona y convertirme en la profesional que soy ahora.

Yomara Labrín V.

RESUMEN

El presente trabajo aborda el escalamiento de la producción de Lacasa, una enzima ligninolítica producida por el hongo de pudrición blanca *Trametes versicolor*. Esta enzima tiene una variedad de aplicaciones industriales, destacándose por su capacidad de degradar compuestos complejos como la lignina. Sin embargo, su producción industrial enfrenta desafíos asociados a altos costos de producción, largos tiempos de fermentación y la necesidad de optimizar variables operacionales para maximizar su rendimiento. En ese sentido, se han realizado estudios que validan la producción de Lacasa utilizando pasta de tomate, pero en ensayos de laboratorio, por lo que se vuelve imprescindible aumentar la producción y mejorar su eficiencia.

El objetivo principal de este estudio fue diseñar un proceso preliminar de producción de Lacasa en un fermentador a escala laboratorio de 1,5 L operado en condiciones batch, evaluando los efectos del método de preincubación del inóculo, oxígeno disuelto (OD), pH y consumo de nutrientes. Para esto, se realizaron fermentaciones experimentales a diferentes condiciones operacionales, utilizando la cepa *Trametes versicolor* al 10% v/v en un medio de cultivo sumergido compuesto por pasta de tomate al 15% v/v y 400 μ M de sulfato de cobre como inductor.

Los resultados muestran que el método de preincubación de 48 h utilizando micelio fue el que obtuvo mejores resultados, logrando una mayor cantidad de células activas al inicio de la fermentación, lo que significó un aumento en la tasa de consumo de glucosa de 38% y en un incremento en la actividad enzimática de 3,7 veces con respecto al caso base, alcanzando 1.818 U/L al sexto día de fermentación. En comparación, otros métodos, como la inoculación directa del pre-inóculo, resultaron menos adecuados debido a la baja adaptación del microorganismo a las condiciones del medio y a la cantidad de células que fueron transferidas al fermentador.

En cuanto al OD, se encontró que su control tiene un impacto directo en la actividad enzimática y el consumo de nutrientes, donde las fermentaciones con control de OD alcanzaron niveles enzimáticos más altos en comparación con aquellas sin control. Sin embargo, el fermentador presentó limitaciones para mantener un punto de ajuste elevado de OD durante los primeros días de fermentación, lo cual afectó parcialmente los resultados.

El pH también es un factor que se ve afectado a lo largo de la fermentación. Aunque no se pudo probar experimentalmente que el control de pH maximiza la producción de Lacasa, cuando no se controló, el incremento gradual de esta variable permitió obtener altos niveles de actividad enzimática, pese a que el pH óptimo para la producción de Lacasa se encuentra en un rango ácido.

En conclusión, este trabajo sugiere que el método de preincubación, el control del OD y la estabilización del pH son variables que afectan en la producción de Lacasa. De esta manera, los resultados proporcionan una base de cómo se debería realizar la producción de Lacasa a mayor escala, sin embargo, se necesitan realizar réplicas de todas las fermentaciones, con sus respectivas variables, dado que los resultados presentados solo contemplan una franja de operación.

ÍNDICE GENERAL

1.	ANTECEDENTES GENERALES	1
1.1.	Enzima Lacasa.....	1
1.1.1.	Limitaciones	1
1.2.	Desarrollo de procesos de enzimas ligninolíticas	3
1.2.1.	Producción de enzimas ligninolíticas.....	3
1.2.2.	Sistemas batch y continuos	6
1.2.3.	Medios de cultivo	7
2.	OBJETIVOS	9
2.1.	Objetivo general	9
2.2.	Objetivos específicos.....	9
3.	MARCO TEÓRICO.....	10
3.1.	Crecimiento celular	10
3.2.	Fermentador	11
3.2.1.	Condiciones de cultivo.....	11
3.3.	Fermentación para la producción de Lacasa	13
3.3.1.	Influencia de las variables de operación	14
3.3.2.	Inducción en la producción	15
3.3.3.	Condiciones operacionales para <i>Trametes versicolor</i>	16
4.	MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	16
4.1.	Materiales	16
4.1.1.	Microorganismo y pre-inóculo.....	16
4.1.2.	Medio de cultivo.....	17
4.1.3.	Fermentador Minifors 2	17
4.2.	Diseño experimental.....	18
4.3.	Métodos de análisis	20
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5.1.	Consumo de fuentes de carbono y nitrógeno	22
5.2.	Producción enzimática	28
5.3.	Efecto del oxígeno disuelto y el pH	30
6.	CONCLUSIONES	35

7. REFERENCIAS.....	36
APÉNDICE	43
Apéndice A: Métodos analíticos reportados por la literatura	43
Apéndice B: Sólidos suspendidos totales	46
Apéndice C: Cálculo de concentraciones a partir de la absorbancia	47
Apéndice D: Curvas de calibración	48
Apéndice E: Variables en el fermentador	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crecimiento celular (Fogler, 2008).	10
Figura 2. Perfil de producción/consumo en la producción de Lacasa (Thiruchelvam & Ramsay, 2007).	13
Figura 3. Montaje fermentador Minifors 2.	17
Figura 4. Problema operacional asociado a la espuma en la fermentación 1.	21
Figura 5. Variación en la concentración de carbono orgánico total. (a) Fermentación 1, (b) Fermentación 2, (c) Fermentación 3, (d) Fermentación 4.	23
Figura 6. Variación en la concentración nitrógeno total. (a) Fermentación 1, (b) Fermentación 2, (c) Fermentación 3, (d) Fermentación 4.	24
Figura 7. Evolución del estado del fermentador en la fermentación 1.	25
Figura 8. Evolución del estado del fermentador en la fermentación 2.	25
Figura 9. Evolución del estado del fermentador en la fermentación 3.	25
Figura 10. Evolución del estado del fermentador en la fermentación 4.	26
Figura 11. Consumo de glucosa. (a) Fermentación 1, (b) Fermentación 2, (c) Fermentación 3, (d) Fermentación 4.	26
Figura 12. Consumo de nitrógeno amoniacal. (a) Fermentación 1, (b) Fermentación 2, (c) Fermentación 3, (d) Fermentación 4.	27
Figura 13. Producción de enzima Lacasa. (a) Fermentación 1, (b) Fermentación 2, (c) Fermentación 3, (d) Fermentación 4.	28
Figura 14. Porcentaje de oxígeno disuelto en la fermentación 2.	31
Figura 15. Porcentaje de oxígeno disuelto en la fermentación 3.	32
Figura 16. Porcentaje de oxígeno disuelto en la fermentación 4.	33
Figura 17. Variación en la concentración del pH para las fermentaciones 1, 2 y 3.	34
Figura 18. Variación en la concentración del pH para la fermentación 4.	34
Figura 19. Tubos Falcon con Fernsbatch obtenidos después de la centrifugación.	47

Figura 20. Curva de calibración para DNS. (a) Primera curva, (b) Segunda curva.	49
Figura 21. Tercera curva de calibración para DNS.	49
Figura 22. Curva de calibración de N-NH ₄ ⁺ . (a) Primera curva (b) Segunda curva.	50
Figura 23. Curva de calibración de N-NH ₄ ⁺ . (a) Tercera curva, (b) Cuarta curva.	50
Figura 24. Prueba del fermentador con agua durante 24 h. (a) Porcentaje de oxígeno disuelto (b) Aireación.	51
Figura 25. Aireación en función del tiempo para la fermentación 2.	51
Figura 26. Aireación en función del tiempo para la fermentación 3.	51
Figura 27. Aireación en función del tiempo para la fermentación 4.	52
Figura 28. Agitación en función del tiempo para la fermentación 4.	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aplicaciones de la enzima Lacasa a nivel industrial.	2
Tabla 2. Investigaciones realizadas para la producción de Lacasa en equipos a escala laboratorio.	4
Tabla 3. Variables asociadas al diseño experimental.	18
Tabla 4. Corridas experimentales realizadas.	19
Tabla 5. Tasas de consumo en las fermentaciones realizadas.	22
Tabla 6. Descripción de distintos ensayos empleados para la medición de actividad de la Lac.	43

1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. Enzima Lacasa

Las Lacasas (p-difenol: oxígeno-oxidoreductasas, EC 1.10.3.2) son enzimas ligninolíticas, ya que degradan lignina, componente estructural de las plantas que es una de las principales barreras para la descomposición microbiana de materia orgánica, pertenecientes al grupo de las oxidasas multicobre caracterizadas por poseer átomos de cobre en su centro activo y catalizar la oxidación de monómeros, compuestos fenólicos y algunos no fenólicos reduciendo el oxígeno molecular a agua (Li et al., 2017). Fueron reportadas por primera vez en 1883 por Hikorokuro Yoshida del árbol japonés *Rhus vernicifera*, sin embargo, están ampliamente distribuidas en la naturaleza, principalmente en hongos, pero también en plantas, bacterias e incluso insectos (Liu et al., 2013). En particular, las Lacasas de origen fúngico han sido las más estudiadas (Singh Arora & Kumar Sharma, 2010), ya que son secretadas al medio por el micelio de los hongos filamentosos (Couto & Toca-Herrera, 2007). Han captado atención mundial debido a su versatilidad y variedad de aplicaciones industriales (Tabla 1), incluyendo sectores como la industria alimentaria, textil, papelera, cosmética, entre otras, por lo que se busca producir esta enzima en grandes cantidades (Minussi et al., s. f.).

Las Lacasas son glicoproteínas diméricas o tetraméricas que tienen cuatro moléculas de cobre en su sitio activo, necesarias para la actividad catalítica de la enzima, ya que facilita la transferencia de electrones entre sustratos (Blánquez, 2015), los cuales se distribuyen en tres sitios de óxido-reducción: tipo I, donde se forma un sitio mononuclear y se lleva a cabo la oxidación del sustrato y tipo II y III que forman un grupo trinuclear y es donde ocurre la reducción de oxígeno molecular a agua (Debnath & Saha, 2020).

1.1.1. Limitaciones

Todas las áreas en las que puede impactar significativamente la enzima Lacasa presentan como limitación que se requiere un gran volumen de enzimas o lo que es equivalente una producción a gran escala. Sin embargo, los altos costos de producción y purificación dificultan su masificación (Chmelová et al., 2022), en particular, Osma et al. (2011) informó que el costo más alto está dado por el medio de cultivo, alcanzando entre 60 - 90% del costo total, además, presentan bajo rendimiento y largos periodos de fermentación, lo cual es un obstáculo importante para su utilización (Chmelová et al., 2022). Actualmente, el precio de mercado es de CLP\$147.000 por 1 g de Lacasa producido a partir del hongo *Trametes versicolor* (Merck, 2024).

Uno de los factores que limitan la producción a gran escala de Lacasas es la eficiencia del proceso, ya que los hongos filamentosos productores de enzima presentan distintas formas de crecimiento morfológico, lo cual afecta la reología del medio en los fermentadores y, por tanto, a la transferencia de masa, oxígeno y la productividad (Rodríguez Couto & Toca-Herrera, 2007).

El problema de la eficiencia y los costos se abordan mediante el tipo de cultivo, la optimización del medio, que debe contener los sustratos necesarios para la expresión enzimática y llevando a cabo el proceso en fermentadores de mayor tamaño. En ese sentido, la mayoría de los estudios que

se centran en la producción de Lacasa se han realizado en matraces o fermentadores con un volumen inferior a 20 L. Por lo tanto, aún es necesario continuar con la producción, concentrándose en reducir los costos y aumentar la eficiencia (Liu et al., 2013). Una posible solución sería disminuir el costo de producción mediante el uso de sustratos económicos, como residuos agrícolas, aguas residuales de las industrias alimentaria o desechos lignocelulósicos provenientes de la industria de pulpa y papel (Osma et al., 2011).

Tabla 1. Aplicaciones de la enzima Lacasa a nivel industrial.

Sector industrial	Usos de la enzima Lacasa	Referencia
Industria de la celulosa y el papel	Destintado del papel	(Bourbonnais et al., 1995)
	Deslignificación de la pulpa	
	Blanqueo de pulpa	
Industria textil	Lavado de mezclilla	
	Blanqueo de fibras	
Industria alimentaria	Estabilización del vino	(Debnath & Saha, 2020)
	Clarificación de zumos de fruta	
	Incrementa el volumen, mejora la estructura de la miga y aumenta la suavidad de productos horneados masa de harina de trigo	
	Gelificación de pectinas de remolacha azucarera	
	Síntesis orgánica y producción de polímeros complejos	
Síntesis química	Síntesis de nanopartículas	
Biorremediación	Eliminación de compuestos disruptores endocrinos	(Rodríguez Couto & Toca Herrera, 2006)
	Degradación de compuestos fenólicos presentes en el suelo y aguas residuales	
Industria de cosmética	Biocatalizador para la síntesis de tintes para el cabello	(Brinch & Pedersen, 2002)
	Formulación de desodorantes, jabones, pastas de dientes, enjuagues bucales, entre otros para la prevención del crecimiento microbiano	

Tabla 1 (continuación)

Sector industrial	Usos de la enzima Lacasa	Referencia
Industria farmacéutica	Preparación de derivados antivirales y hormonales, fármacos anticancerígenos, síntesis de antioxidantes, etc	(Nicotra et al., 2004) (Niedermeyer et al., 2005)
	Degradación de productos farmacéuticos	(Parra Guardado et al., 2019) (Riedi et al., 2022) (Yang et al., 2017)

1.2. Desarrollo de procesos de enzimas ligninolíticas

1.2.1. Producción de enzimas ligninolíticas

La degradación de la madera en la naturaleza es causada principalmente por hongos, dentro de los cuales, los hongos de pudrición blanca (WRF) han causado especial atención debido a su eficiencia en la degradación de lignina (Yang et al., 2017), generando subproductos más simples como CO₂ y H₂O provenientes de la ruptura oxidativa de anillos aromáticos que conforman la estructura de la lignina, lo cual depende de la producción del sistema enzimático extracelular ligninolítico (Singh Arora & Kumar Sharma, 2010). Dentro de las enzimas ligninolíticas extracelulares, se encuentra la lignina peroxidasa (LiP), la manganoso peroxidasa (MnP) y la Lacasa (Lac) (Plácido & Capareda, 2015).

La producción de enzimas ligninolíticas se lleva a cabo a través de dos métodos: fermentación sumergida (SmF) o fermentación en sustrato sólido (SSF). No obstante, la técnica más tradicionalmente empleada es la SmF, principalmente porque es más fácil de escalar y controlar variables operacionales, en comparación con SSF (Rodríguez Couto et al., 2005; Songulashvili et al., 2007).

En la producción industrial de enzimas mediante SmF, los hongos exhiben diferentes formas morfológicas, que van desde filamentos miceliales dispersos hasta micelios densamente entrelazados, denominados pellets. Los micelios dispersos causan una serie de problemas en los fermentadores debido a que se produce una disminución en la transferencia de materia específicamente de oxígeno y nutrientes, además, son causantes del crecimiento de biomasa en las paredes del fermentador, agitadores, etc. (Babič & Pavko, 2012).

SSF presenta diversas limitaciones que han llevado a una disminución de su uso en aplicaciones industriales. Estas se relacionan principalmente con la formación de gradientes de temperatura, pH, humedad, concentración de sustrato y pO₂ a lo largo del cultivo, los cuales son difíciles de regular cuando hay una cantidad limitada de agua disponible (Hölker et al., 2004).

La producción de Lacasas depende del tipo de organismo, donde la cepa *Trametes versicolor* es el hongo productor más estudiado (Bourbonnais et al., 1995), sin embargo y en gran medida, la producción de esta enzima está sujeta a las condiciones de cultivo de los hongos. Además, otro de

los factores críticos para una producción efectiva de Lacasas fúngicas son la fuente de carbono y nitrógeno, la concentración de éstos y la presencia de un compuesto inductor para optimizar el proceso (Majeau et al., 2010). Los inductores más eficaces y comúnmente utilizados son la 2,5-xilidina y el sulfato de cobre, pero también existen otros compuestos como el guayacol, alcohol veratrílico, etanol y lignina, además, se han reportado también el uso de monómeros, aminoácidos o vitaminas (Songulashvili et al., 2016).

Dentro de las condiciones de cultivo para la producción de Lacasas, se encuentran variables como aireación, composición y pH del medio, oxígeno disuelto, concentración del inóculo, humedad, velocidad de agitación, temperatura, entre otras. En general, las Lacasas presentan condiciones óptimas para su actividad catalítica en un rango de pH ácido y temperaturas entre 25 y 80 °C, lo cual refleja que son altamente termoestables (Babič & Pavko, 2012; Songulashvili et al., 2016).

En la Tabla 2 se presentan algunas investigaciones realizadas en equipos a escala laboratorio para la producción de Lacasa a partir de WRF, donde se especifican las condiciones de cultivo, tiempo de fermentación y cantidad máxima de enzima Lacasa producida.

Tabla 2. Investigaciones realizadas para la producción de Lacasa en equipos a escala laboratorio.

Fermentador	Medio de cultivo	Tiempo, d	Actividad máxima	Referencia
Tanque agitado 2,1 L, <i>Dichomitus squealens</i> , 175, 250 y 350 rpm, 28°C, pH 4,5.	5 g/L inductor de lignina natural, 1,8 L de medio mineral nitrógeno limitado.	12	1.882 U/L ^a	(Babič & Pavko, 2012)
Columna burbujas 2 L, <i>Dichomitus squealens</i> , 28°C, aire de 50, 75 y 100 L/h, 200 mL de inóculo como pellet.	5 g/L inductor de lignina natural, 1,8 L de medio mineral nitrógeno limitado.	10	1.460 U/L ^a	
Tanque agitado 50 L, <i>Coriolopsis gallica</i> , SmF, 30°C, pH inicial cercano a 6, oxígeno disuelto 25-35%, 1 - 40 m ³ /h tasa aireación y 200-300 rpm, 4 L de inóculo.	Bactopeptona 17 g/L, glucosa 50 g/L, KH ₂ PO ₄ 2,5 g/L, MnSO ₄ · H ₂ O 0,05 g/L, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0,5 g/L, CuSO ₄ · 5H ₂ O 0,02 g/L, vainillina 200 µM como inductor.	7	200.900 U/L ^a	(Songulashvili et al., 2016)
Tanque agitado 1 L batch, <i>Trametes versicolor</i> , SmF, pH 5,2, 28°C, aire comprimido continuo, saturación de oxígeno disuelto, 100 y 180 rpm.	Glucosa 11 g/L, glutamina 5 mM, NaCl 5 mM, KH ₂ PO ₄ 5 mM, MgSO ₄ · 7H ₂ O 1 mM, CaCl ₂ 0,1 mM, succinato de dimetilo 10 mM, tiamina 2,4 µM, xilidina 30 µM.	9	11.403 U/L ^b	(Tavares et al., 2006)

Tabla 2 (continuación)

Fermentador	Medio de cultivo	Tiempo, d	Actividad máxima	Referencia
Lecho fijo 1 L, <i>Trametes hirsuta</i> , inmovilizada SmF, 30°C, aire continuo	CuSO ₄ 1 mM, glucosa, 3 g/L, NH ₄ Cl 0,025 g/L.	8	2.206 U/L ^a	(Rodríguez Couto et al., 2004)
Tanque agitado 2L, <i>Trametes hirsuta</i> , SmF, 20 g/L de gránulos de madera de pino, pH 5, 281°C, 200 rpm.	Glucosa 10 g/L, peptona de caseína 5 g/L, extracto levadura 5 g/L, MgSO ₄ · 7H ₂ O 1 g/L, CuSO ₄ · 5H ₂ O 5 mM, antiespumante 1,5 mL/L	12	453.750 U/L ^c	(Böhmer et al., 2011)
Fermentador airlift, <i>Trametes versicolor</i> , SmF (salvado de trigo 4g/L) 8% v/v inóculo, 30°C.	Glucosa 5 g/L, (NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆ 0.22 g/L, KH ₂ PO ₄ 0.20 g/L, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.05 g/L, CaCl ₂ 0.01 g/L, solución traza 10 mL/L (0.08 g/L CuSO ₄ · 5H ₂ O; 0.05 g/L (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O; 0.07 g/L MnSO ₄ · 4H ₂ O; 0.043 g/L ZnSO ₄ · 7H ₂ O; 0.01 g/L FeCl ₃ · 6H ₂ O	9	1.200 ^d U/mL	(Atilano-Camino et al., 2020)
Fermentador agitado 120 L, <i>Carrena unicolor</i> , SmF (salvado de trigo 40 g/L), 30°C, pH 6, oxígeno disuelto 25%, aireación 1-40 m ³ /h, 130-420 min ⁻¹ .	Cu ⁺² 1mM como inductor (al día 4), glucosa 5,5 g/L, H ₃ PO ₄ 1,4 kg, NaOH 0,3 kg, eptona 2 g/L, KH ₂ PO ₄ 0,8 g/L, MgSO ₄ x 7H ₂ O 0,45 g/L, CuSO ₄ x 5H ₂ O 0,25 g/L Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 0,25 g/L	12	416 U/mL ^a	(Songulashvili et al., 2015)
Matraces agitados 1L, <i>Pleurotus ostreatus</i> , SmF, 125 rpm.	Glucosa 10 g/L, extracto levadura 3,8 g/L, H ₂ KPO ₄ 2 g/L, MgSO ₄ x 7H ₂ O 0,5 g/L, CaCl ₂ x H ₂ O 0,1 g/L, biotina 10 mg/L, tiamina 10 mg/L, 10 mL de solución madre (0.5 g/L MnSO ₄ · 5H ₂ O; 1 g/L NaCl; 0,1 g/L FeSO ₄ · 7H ₂ O; 0,1 g/L CoCl ₂ · 6H ₂ O; 0,1 g/L ZnSO ₄ · 7H ₂ O; 0,01 g/L CuSO ₄ · 5H ₂ O; 0,01 g/L AlK(SO ₄) ₂ ; 0,01 g/L H ₃ BO ₃ ; 0,01 g/L NaMoO ₄ · 2H ₂ O)	13	3.000 U/L ^a	(Lettera et al., 2011)

Tabla 2 (continuación)

Fermentador	Medio de cultivo	Tiempo, d	Actividad máxima	Referencia
Fermentador de columna de burbujas 2 L, <i>Trametes versicolor</i> , enzima inmovilizada en perlas de alginato, 26°C, aireación 200 mL/min.	KH ₂ PO ₄ 0,2 g/L, CaCl ₂ · 2H ₂ O 0,1 g/L, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0,05 g/L, NH ₄ H ₂ PO ₄ 0,5 g/L, FeSO ₄ · 7H ₂ O 0,035 g/L, glucosa 2 g/L, NH ₄ Cl 0,27 g/L, CuSO ₄ · 5H ₂ O 0,02 g/L	3	1.219 U/L ^a	(F. Wang et al., 2013)
Fermentador de bandejas 1,8 L, <i>Trametes hirsuta</i> , SSF (cáscara de naranja), pH 4,5, 30°C.	Cu ⁺² 5 mM, glucosa 4 g/L, extracto de levadura 15 g/L, NH ₄ Cl 0,75 g/L, KH ₂ PO ₄ 2 g/L, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0,5 g/L, CaCl ₂ · 2H ₂ O 0,1 g/L, KCl 0,5 g/L	23	12.660 U/L ^a	(Rosales et al., 2007)
Fermentador de elevación de aire 65 L, <i>Pycnoporus sp.</i> , pH 5, 30°C, aireación 30 L/min.	Glucosa 12 g/L, NaNO ₃ 6 g/L, CuSO ₄ · 5H ₂ O 4 g/L, KH ₂ PO ₄ 1 g/L, Na ₂ HPO ₄ 0,2 g/L, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0,5 g/L, MnSO ₄ 0,034 g/L	6	72.000 U/L ^c	(Liu et al., 2013)
Botella de vidrio 5 L, batch, <i>Trametes versicolor</i> , SmF (pellets)	200 mL medio de Kirk modificado con 2 g/L de tartrato de amonio	7	1.385 U/L ^a	(Thiruchelvam & Ramsay, 2007)

^a Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que oxida 1 µM del sustrato correspondiente por minuto.

^b Una unidad de enzima Lacasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 mmol de ABTS por minuto y se expresó en U/L.

^c Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que oxida 1 µM del sustrato correspondiente por minuto. Donde la actividad máxima se encuentra concentrada.

^d Una unidad de enzima se definió como 1 µmol de ABTS oxidado por minuto por mL.

^e Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que oxida 1 µmol de DMP por minuto.

1.2.2. Sistemas batch y continuos

Los fermentadores son equipos que proporcionan las condiciones adecuadas para el crecimiento de microorganismos y las respectivas reacciones bioquímicas durante el proceso. Con el avance de la industria de la fermentación, estos equipos han evolucionado considerablemente y ahora están altamente automatizados. De esta manera, dado que la producción de enzimas a gran escala se

realiza principalmente mediante SmF, las investigaciones se han centrado más en desarrollar equipos para este tipo de fermentación, en vez de SSF (Babič & Pavko, 2012).

La investigación sobre la producción de enzima Lacasa mediante WRF en fermentadores se enfoca en mejorar la producción de manera continua y eficiente, así como en la optimización de estos procesos mediante métodos estadísticos. Comúnmente, los hongos se cultivan en fermentadores de tanque agitado (STR), columnas de burbujas (BCR) y biorreactores de elevación por aire (ALR) para SmF, mientras que para SSF, se utilizan biorreactores de bandeja y de lecho empaquetado (Debnath & Saha, 2020). En la producción de la enzima Lacasa, se emplean diversos modos de operación, cada uno con sus características y aplicaciones específicas. Entre estos sistemas se encuentran el batch, feed-batch y continuo. El proceso batch o por lotes, se diseña para suministrar los nutrientes a los microorganismos al inicio del proceso, sin alimentarlos posteriormente, por lo cual, se considera un sistema cerrado que finaliza cuando se agotan los nutrientes incorporados. En este tipo de sistemas, la fuente carbono y/o el suministro de oxígeno permiten que los microorganismos permanezcan en la fase de crecimiento exponencial.

Para prevenir que los nutrientes se conviertan en un factor limitante, una estrategia efectiva es suministrarlos de manera constante durante el cultivo, lo cual se conoce como proceso alimentado por lotes, semi continuo o feed-batch. Es un sistema que se considera parcialmente abierto, puesto que requiere de una alimentación continua durante el cultivo. Esta técnica tiene la capacidad de alcanzar mayores niveles de producción, ya que el suministro continuo de nutrientes favorece el crecimiento del hongo (Infors HT, 2017).

Finalmente, cuando el sistema opera de forma abierta e introduce tanto medio de cultivo como se extrae, se le denomina sistema continuo, el cual es adecuado cuando se requiere suministrar por dosis un exceso de nutrientes, ya que una única alimentación causaría la inhibición de los microorganismos (Infors HT, 2017).

1.2.3. Medios de cultivo

Como se mencionó previamente, la producción de Lacasa depende de la naturaleza de la fuente de carbono, la cual puede provenir de residuos lignocelulósicos, agrícolas o de fuentes sintéticas (Colla et al., 2023). El empleo de residuos se asocia con una mayor generación de Lacasa en comparación con el uso de medios sintéticos. Asimismo, optar por un medio natural en lugar de uno sintético resulta más efectivo para disminuir los costos en la producción de enzimas. Debido a esto, las investigaciones se han dirigido hacia la utilización de residuos para formar un medio de cultivo natural que permita la reducción de costos en la producción de Lacasa (Debnath & Saha, 2020). De esta manera, la industria alimentaria genera una gran cantidad de residuos que son ricos en azúcares, vitaminas y minerales, los cuales, al ser de naturaleza orgánica, son fácilmente aprovechables por los microorganismos. Así, los residuos lignocelulósicos o agrícolas se convierten en una materia prima adecuada para la producción de metabolitos secundarios, ya que ofrece la oportunidad de aprovechar los residuos derivados del procesamiento de alimentos, haciendo que el proceso sea más eficiente desde el punto de vista económico y medioambiental (Rosales et al., 2005).

En la búsqueda de residuos capaces de proporcionar un nivel de glucosa comparable al de los medios de cultivo sintéticos, Chavarría Ortiz (2016) realizó un estudio para determinar la capacidad de degradación de oxitetraciclina, por medio de la producción en enzima Lacasa en SmF. En este trabajo, se utilizó la cepa *Trametes versicolor*, pasta de tomate como fuente de nutrientes al 15% v/v y 400 μ M de sulfato de cobre como inductor, alcanzando una actividad máxima de 1.100 U/L en matraces de 250 mL, en sistema batch con una concentración de 10% v/v de inóculo. Estudio similar realizó LLona Villarroel (2016), pero utilizando como productor de Lacasa, *Pleurotus eryngii*, donde obtuvo una concentración máxima de 283 U/L sin inductor a 30°C y 150 rpm.

Estos resultados mostraron la viabilidad de producir enzima Lacasa bajo estas condiciones, sin embargo, no se ha investigado cómo aumentar su producción, por lo que es fundamental ampliar la capacidad de trabajo, con el fin de escalar el proceso y evaluar su eficacia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Escalar la producción de enzima Lacasa mediante fermentación sumergida desde nivel matraz a fermentador utilizando la cepa *Trametes versicolor* y como fuente de carbono y nitrógeno pasta de tomate suplementado con cobre como inductor.

2.2. Objetivos específicos

- Implementar la puesta en marcha de un fermentador marca Minifors 2, con el fin de escalar la producción de Lacasa.
- Estudiar el efecto de un método de preincubación de inóculo sobre la producción de enzima Lacasa en un fermentador operado en condiciones batch.
- Analizar el efecto del oxígeno disuelto en la actividad enzimática de Lacasa, mediante fermentaciones batch operadas a distintas dosificaciones de aireación y agitación.
- Evaluar la influencia del pH en las diferentes etapas del proceso de producción de Lacasa en un sistema batch.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Crecimiento celular

Los microorganismos pueden crecer bajo una variedad de condiciones físicas, químicas y nutricionales. En un medio adecuado, los organismos absorben los nutrientes, utilizándolos para la producción de energía, biosíntesis y la formación de productos. Esta utilización de nutrientes provoca que el crecimiento de la masa microbiana aumente con el tiempo (Schuler & Kargi, 2002).

Entender la cinética de crecimiento de las células es crucial para el diseño y la operación de sistemas de fermentación. La cinética celular se enfoca en la velocidad de crecimiento de las células y en cómo diferentes condiciones químicas y físicas influyen en este proceso. Durante el crecimiento, la composición celular se modifica y se adapta constantemente al medio en el cual se encuentran, pero este, a su vez también varía en sus condiciones físicas y químicas. Por lo tanto, resulta imposible alcanzar un modelado matemático exacto de la cinética de crecimiento (Dutta, 2008).

Al inocular una pequeña cantidad de microorganismos en un fermentador discontinuo que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento y medir la concentración de células en función del tiempo, se evidencia la formación de distintas fases de crecimiento celular (Figura 1).

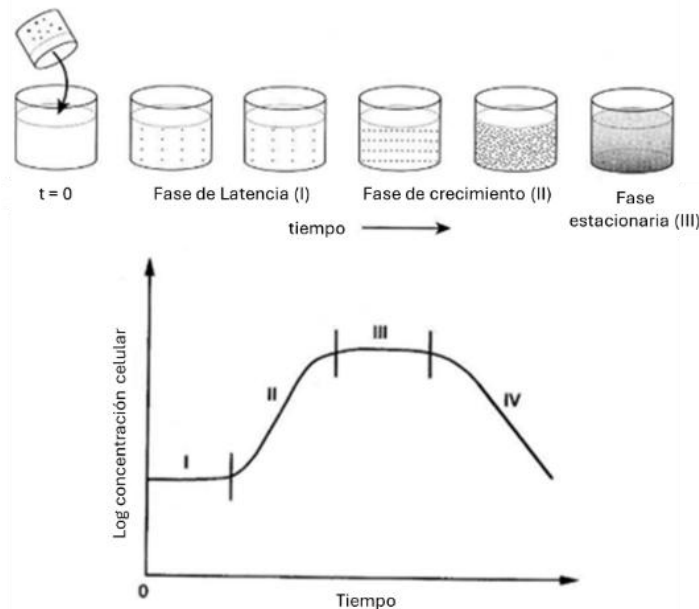


Figura 1. Curva de crecimiento celular (Fogler, 2008).

En las curvas de crecimiento celular se identifican principalmente las siguientes fases:

- 1) Fase I – Latencia o retraso: Tras la inoculación del cultivo en el fermentador, los microorganismos se adaptan al entorno y las nuevas condiciones antes de iniciar el crecimiento, por lo que se evidencia que la concentración celular aumenta lentamente y las células se preparan para reproducirse (Infors HT, 2017).

La duración de esta fase depende del medio de crecimiento del cual se haya tomado el inóculo en relación con el medio de reacción en el que se coloque (Fogler, 2008). Si el

inóculo se obtiene de un matraz agitado en condiciones similares al medio del fermentador y se transfieren las células durante la fase de crecimiento exponencial, la fase de retraso será casi inexistente (Infors HT, 2017), esto es relevante, ya que, para el funcionamiento a gran escala, el objetivo es hacer que esta fase sea lo más corta posible (Dutta, 2008). Sin embargo, la duración de esta fase se extiende cuando los microorganismos se inoculan desde un medio con una baja concentración de nutrientes a uno con alta concentración. Esto ocurre porque las células necesitan producir las enzimas necesarias para metabolizar los nutrientes disponibles. De igual manera, si se inocula una pequeña cantidad de células en un volumen grande, la fase de latencia tendrá mayor duración (Dutta, 2008).

- 2) Fase II - Crecimiento exponencial o logarítmico: El microorganismo se adapta mejor al medio ambiente y la tasa de crecimiento es máxima y proporcional a la concentración de las células (Infors HT, 2017).

En esta fase, las células se dividen a la mayor velocidad posible porque se están efectuando todas las rutas enzimáticas para metabolizar el sustrato, lo cual permite que los nutrientes de absorban eficientemente (Fogler, 2008). Debido a esto, la biomasa crece, aumentando el contenido de proteínas y la formación de espuma en el medio. Además, esto resulta en mayores necesidades de oxígeno y emisión de dióxido de carbono para procesos aeróbicos (Infors HT, 2017).

- 3) Fase III - Estacionaria: Se da cuando la tasa de crecimiento neta es cero (sin división celular) o cuando esta es igual a la tasa de muerte (el número de microorganismos que mueren es aproximadamente igual a los que regresan por división), lo cual es resultado del agotamiento de nutrientes y metabolitos esenciales, sin embargo, las células siguen siendo metabólicamente activas y producen metabolitos secundarios (Schuler & Kargi, 2002).

En esta fase, el crecimiento celular se hace más lento por acumulación de ácidos orgánicos y materiales tóxicos generados durante la fase de crecimiento (Fogler, 2008).

- 4) Fase IV - Muerte: En esta fase ocurre la reducción de la concentración de células vivas, como resultado de la acumulación de subproductos tóxicos, condiciones ambientales difíciles, insuficiencia o agotamiento de nutrientes (Fogler, 2008). La tasa de crecimiento se reduce hasta tal punto que la muerte de microorganismos supera a los que crecen mediante el proceso de división, llevando a cabo una disminución en la población de células (Infors HT, 2017). Parte de la muerte celular puede comenzar durante la fase estacionaria y no siempre es posible una demarcación clara entre estas dos fases (Schuler & Kargi, 2002).

3.2. Fermentador

3.2.1. Condiciones de cultivo

Un fermentador proporciona un entorno ideal para que los microorganismos puedan reproducirse, incluyendo condiciones de temperatura, pH, suministro suficiente de oxígeno u otros gases, adición de nutrientes, entre otras (Infors HT, 2017).

Para cultivar microorganismos, es necesario preparar un pre-cultivo o inóculo que constituye entre 5 - 10% del volumen total del medio a inocular. Este inóculo determina la cantidad inicial de células

presentes en el cultivo (Infors HT, 2017), el cual contiene todos los nutrientes necesarios, como fuentes de carbono y nitrógeno (que pueden provenir de fuentes sintéticas o naturales), así como los productos químicos necesarios para el crecimiento (Fogler, 2008).

Bajo condiciones óptimas, los microorganismos se duplican constantemente siguiendo una curva de crecimiento exponencial, por lo tanto, lo ideal es que la tasa de alimentación de nutrientes aumente de la misma manera (Infors HT, 2017). Para evitar que los nutrientes se conviertan en un factor limitante, se puede incorporar una alimentación de solución nutritiva durante el cultivo (feed-batch).

Un factor importante por considerar cuando se realiza un cultivo es el medio y tipo de sustrato (SSF o SmF), no obstante, ambos conllevan al análisis de factores similares que influyen en la fermentación, en general, la agitación mecánica, aireación, oxigenación y transferencia de calor y materia son variables que afectan la producción (Dutta, 2008), además, se debe tener en consideración:

- **Agitación:** Permite que los nutrientes estén lo suficientemente dispersos, evitando desviaciones de las condiciones ideales, modificaciones en el pH o que los microorganismos no reciban los nutrientes suficientes, ya que, si esto ocurre, la eficiencia del proceso disminuye. Una agitación no uniforme conlleva a una alteración en la distribución de la temperatura, provocando que los microorganismos en el borde del recipiente tengan una temperatura alta, mientras que los que están al centro se enfrían (Infors HT, 2017).

La agitación suave es eficaz para suspender las células, mejorar la oxigenación a través de la superficie del líquido y también para ayudar a la transferencia de nutrientes sin dañar la estructura de las células (Dutta, 2008). Asimismo, la agitación permite romper las burbujas de gas que se forman en el equipo, asegurando que el oxígeno llegue de forma eficiente a la solución nutritiva y permitiendo que solo el oxígeno disuelto esté disponible para los microorganismos y pueda ser absorbido a través de la superficie celular (Infors HT, 2017). Sin embargo, una alta agitación puede significar un estrés mecánico en los microorganismos (Pinheiro et al., 2020).

- **Temperatura:** Los microorganismos tienen enzimas que funcionan de manera óptima a una determinada temperatura, si se excede o no se alcanza, las células no crecen bien, ya que las actividades metabólicas y el crecimiento depende en gran medida de las enzimas y por tanto, de las proteínas catalíticamente activas. La temperatura se controla mediante calefacción o refrigeración según lo requiera el sistema (Dutta, 2008).
- **pH:** Un cambio drástico en el pH provoca que las condiciones de crecimiento de los microorganismos cambien significativamente, ya que, si este se encuentra fuera de rango, los microorganismos ya no se multiplicarán o incluso, morirán. También, puede provocar procesos metabólicos no deseados o inhibición del crecimiento de microorganismos. El pH en un fermentador se puede mantener empleando una solución tampón o un controlador de pH (Dutta, 2008).

- Aireación: Implica la introducción de aire al medio, aumentando la cantidad de oxígeno disuelto, el cual es vital para microorganismos aerobios, ya que sin ellos no se puede producir el crecimiento celular (Infors HT, 2017).
- Volumen: Si bien este parámetro se mantiene normalmente constante, es importante considerar que, para la producción a escala industrial, el volumen es crucial. Aumentar el volumen de trabajo permite una mayor producción de enzimas, pues disminuye la limitación del crecimiento celular.

Finalmente, variables como el tiempo de cultivo, consumo de nutrientes, producción de biomasa y actividad enzimática están relacionados y sujetas a las condiciones antes mencionadas. Para cuantificarlas y obtener cómo se comportan en función del tiempo de fermentación, se han empleado una serie de técnicas analíticas, las cuales dependen principalmente de los reactivos utilizados (Apéndice A). Por ejemplo, en la Figura 2, se ilustra la variación en la concentración para la producción de Lacasa en SmF sin la presencia de inductores, utilizando fuentes sintéticas para el aporte de carbono y nitrógeno, representado por la glucosa y el amonio respectivamente, las cuales disminuyen a medida que transcurre el tiempo, en contraste con la biomasa y la actividad de Lacasa que aumenta.

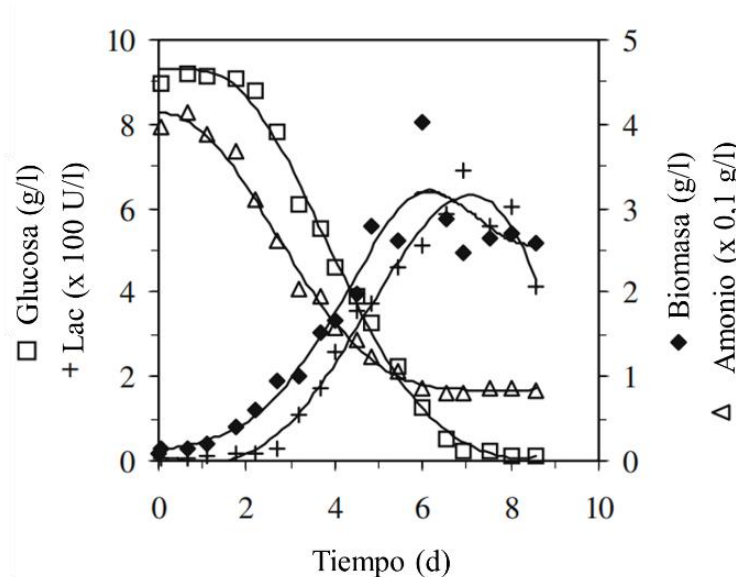


Figura 2. Perfil de producción/consumo en la producción de Lacasa (Thiruchelvam & Ramsay, 2007).

3.3. Fermentación para la producción de Lacasa

Los WRF son organismos capaces de degradar la lignina de manera eficiente y producir enzima Lacasa cuando se cultivan en medios líquidos o sólidos, donde la producción de estas enzimas depende mayoritariamente de las condiciones de cultivo del hongo (Ballesteros et al., 2007).

3.3.1. Influencia de las variables de operación

La producción de Lacasa se ve afectada por diversos factores típicos del proceso de fermentación como lo son la concentración de carbono y nitrógeno, el pH, la temperatura, la tasa de aireación, entre otros. Además, diferentes compuestos aromáticos (ácido gálico, ácido ferúlico, xilidina, guaiacol, siringaldazina, alcohol veratrílico) se han utilizado para estimular la producción de Lacasas (Couto et al., 2002).

Carbono

La descomposición de las fuentes de carbono, presente en todos los organismos vivos, libera energía, la cual es utilizada para su crecimiento y desarrollo (Viswanath et al., 2014), por lo cual, la presencia de estas fuentes en el medio de cultivo es fundamental para la producción de enzimas ligninolíticas (Ballesteros et al., 2007). Según reportes bibliográficos, la glucosa es la fuente más utilizada por los hongos de pudrición blanca (Viswanath et al., 2014), la cual, además, tiene el mayor potencial para la producción de Lacasa. Sin embargo, el uso de altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo tiene un efecto inhibitorio, reduciendo la producción de Lacasas. Una manera de resolver este problema es utilizar celulosa como fuente de carbono durante el cultivo (Ballesteros et al., 2007).

En cuanto al uso de sustratos económicos, la cepa *Trametes versicolor* es un excelente productor de Lacasa cuando se utilizan cáscaras de mandarina como fuente de carbono en la fermentación. También, en esta cepa, el salvado de cebada aumentó casi 50 veces la actividad de la enzima, en comparación con el cultivo de control con glucosa (Ballesteros et al., 2007).

Nitrógeno

Los sistemas ligninolíticos de los WRF se activan principalmente durante la fase metabólica secundaria del hongo y a menudo se desencadenan por el agotamiento de nitrógeno (Ballesteros et al., 2007).

Songulashvili et al. (2007) observaron una alta actividad de Lacasa en *C. unicolor* IBB 62 cuando se cultivó en un medio con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

pH

Cuando los hongos se cultivan en un medio cuyo pH es óptimo para el crecimiento, la producción de Lacasa será efectiva. Reportes bibliográficos indican niveles de pH iniciales entre 4,5 - 6 antes de la inoculación (Ballesteros et al., 2007), específicamente 4,5 para *Trametes versicolor* (Atilano-Camino et al., 2020), sin embargo, estos niveles no se controlan generalmente en los cultivos, solo se miden.

Temperatura

La temperatura óptima en la producción de Lacasa es de 25 °C en presencia de luz, pero de 30 °C cuando los cultivos se llevan a cabo en oscuridad. En general, los hongos se cultivan a temperaturas

entre 25 - 30°C para una producción óptima, ya que, para valores mayores, la bibliografía indica que se reduce la actividad enzimática (Ballesteros et al., 2007).

Aireación

La optimización de la aireación es un factor importante por considerar en la producción de enzimas ligninolíticas, especialmente en cultivos sumergidos de WRF (López et al., 2002), pues estos son microorganismos aerobios y la Lacasa es una enzima que requiere concentraciones suficientes de oxígeno. Ha et al. (2001) demostraron que la administración continua de oxígeno promovió la producción, ya que la descomposición del sustrato fue mayor cuando se tuvieron altas concentraciones de oxígeno, además, señala que la actividad aumenta cuando se inyecta aire durante la primera fase de crecimiento.

Agitación

Si bien la agitación aumenta la disponibilidad de oxígeno, la transferencia de nutrientes (Birhanli & Yesilada, 2010) y la morfología micelial, estudios han demostrado que altos valores de agitación pueden producir estrés mecánico sobre los hongos, lo cual se traduce en un efecto represor en la producción de Lacasas fúngicas (Couto & Toca-Herrera, 2007).

Inoculación

El tamaño del inóculo desempeña un papel crucial en la producción de enzimas, por ejemplo, una cantidad insuficiente puede no ser adecuada para promover el crecimiento inicial (Patel et al., 2009). Birhanli & Yesilada (2010) estudiaron el efecto de la cantidad de pellets utilizados en la producción de Lacasa, obteniendo que la actividad enzimática para *Trametes versicolor* dependía de la cantidad de pellet inicial que fue recolectada después de un periodo de pre-cultivo.

3.3.2. Inducción en la producción

Las Lacasas generalmente se producen en bajas concentraciones por WRF, pero se pueden obtener concentraciones mayores adicionando inductores a los medios de cultivo. Compuestos como sulfato de cobre, 2,5-xilidina, ácido ferúlico, lignina, alcohol veratrílico, entre otros, aumentan e inducen la actividad de Lacasa.

Eggert et al. (1996) reportaron que la adición de 2,5-xilidina 10 µM después de 24 h de cultivo produjo una inducción en la actividad de la Lacasa, aumentándola nueve veces. En concentraciones más altas, este compuesto tuvo un efecto reducido, debido a la toxicidad (Ballesteros et al., 2007).

Suplementar el medio de cultivo con alcohol veratrílico o 2,5-xilidina mejoró los niveles de actividad de Lacasa, lo que demuestra que la producción de la enzima aumenta siete veces cuando se agregaba 2,5-xilidina como inductor a cultivos de *Trametes sp. CJ-105* (Couto et al., 2002).

El cobre (Cu⁺²) juega un papel importante en la producción de Lacasas, ya que su adición al medio de cultivo, en bajas concentraciones, aumenta la actividad enzimática. En específico, Palmieri et al. (2000) encontraron que la adición de sulfato de cobre 150 µM da como resultado un aumento

de 50 veces en la actividad de Lacasa, en comparación con un medio base. Asimismo, la adición de sulfato de cobre 1 mM tuvo un efecto significativo en la actividad de Lacasa, obteniendo que son aproximadamente 3,5 veces superiores a las alcanzadas en los cultivos de referencia, del mismo modo, Galhaup et al. (2002) informaron que la adición de 2 mM de sulfato de cobre estimuló la producción de Lacasas por parte de *Trametes pubescens* en cultivos discontinuos. Estos resultados muestran el efecto positivo del sulfato de cobre como inductor de la actividad de Lacasa (Rosales et al., 2007), en particular, un aumento en la concentración de cobre provoca un incremento en la actividad de las Lacasas en *Trametes versicolor* (Hernández-Monjaraz et al., 2018).

Sin embargo, en el hongo *Grammothele subargentea* se observó que en el rango de concentración de 0,6 - 1,2 mM de sulfato de cobre, se produce mayor actividad enzimática de Lacasa, mientras que a concentraciones más altas (1,5 y 1,8 mM) la actividad disminuye. Lo mismo ocurre utilizando la cepa *Trametes versicolor*, donde la actividad Lacasa se induce con sulfato de cobre hasta en un 17%, pero disminuye significativamente con niveles elevados (80 mM) (Hernández-Monjaraz et al., 2018).

3.3.3. Condiciones operacionales para *Trametes versicolor*

Se ha identificado que para que la mayoría de los hongos produjeran Lacasa, las condiciones óptimas son temperaturas entre 25 - 30 °C y un ambiente ligeramente ácido. En cuanto a las fuentes de carbono y nitrógeno, se pueden utilizar desde fuentes simples como glucosa y cloruro de amonio, hasta fuentes compuestas como residuos agrícolas lignocelulósicos (H. Wang et al., 2024). Donde, una concentración de 20 g/L de glucosa favoreció la producción de Lacasa (Viswanath et al., 2014).

Para la producción de Lacasa a partir del hongo *Trametes versicolor*, se reportaron condiciones operacionales como: temperatura de 22 °C, pH 4,5 - 5,5, velocidad del impulsor 200 - 350 rpm y tasa de flujo de aire 0,2 - 1 vvm en un volumen de 1,25 L (Thiruchelvam & Ramsay, 2007). Asimismo, para un cultivo SmF en un volumen 3 L y un 8% v/v inóculo, las condiciones indicaron un flujo de aire de 1 vvm y una temperatura de 25, 30 y 35 °C, sin ajuste de pH (Atilano-Camino et al., 2020).

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1. Materiales

4.1.1. Microorganismo y pre-inóculo

Se utilizó la cepa *Trametes versicolor*, la cual fue cedida por el Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid (Dra. María Jesús Martínez). La cepa fue mantenida en slants a una temperatura de 4°C en el Laboratorio Contaminantes Emergentes de la Universidad Técnica Federico Santa María.

A partir de los slants, se cultivó el microorganismo en placas Petri en medio agar extracto de malta (MEA) por 7 d a 30 °C, o hasta que el hongo cubriese toda la superficie de la placa y se almacenaron

a 4°C. Luego, se realizó un cultivo Fernsbach (UTFSM, 2020), utilizando matraces Erlenmeyer de 2 L, los cuales contenían 200 mL de medio de cultivo y 8-10 plugs de hongo proveniente de las placas Petri, los cuales fueron extraídos con sacabocados y pinzas. Se incubó por 9 d a 30 °C o hasta que la superficie del medio se cubriese por completo por el hongo y finalmente, se trituró en blender 1 - 2 min para su almacenaje en botellas esterilizadas previamente a 4 °C hasta su uso, obteniendo el pre-inóculo.

4.1.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo consistió en una solución de pasta de tomate pomodoro marca MUTTI al 15% v/v como fuente de nutrientes para el cultivo en SmF, sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) como inductor de la actividad enzimática a una concentración de 400 μM y agua destilada tipo II.

4.1.3. Fermentador Minifors 2

Para los experimentos de fermentación batch se utilizó un fermentador de laboratorio automático Minifors 2 (Infors HT) de 3 L (Figura 3), el cual se encontraba equipado con un dos impulsores, un deflector, sensores de espuma, temperatura, pH (Hamilton Medical) y oxígeno disuelto (Hamilton Medical). Estos dos últimos se deben calibrar antes y después de la esterilización en autoclave respectivamente. Para mantener la temperatura a un valor constante, se inyectó agua tipo III recirculada al fermentador por medio de una bomba peristáltica, además, se añadió un matraz atrapa espuma conectado a la salida del condensador. El fermentador se llenó con 1.350 mL de medio de cultivo y se autoclavó a 121 °C por 30 min, posteriormente, se agregaron 150 mL de pre-inóculo, tomando muestras de 12 mL cada 24 h por 7 d.



Figura 3. Montaje fermentador Minifors 2.

4.2. Diseño experimental

El estudio contempló cuatro fermentaciones bajo diferentes condiciones de operación, las cuales tienen por objetivo evaluar el efecto de estas en el comportamiento metabólico de *Trametes versicolor* y sobre la producción de enzima Lacasa, para ello, se modificó la inoculación, concentración de oxígeno disuelto (OD), agitación y pH. Todas estas variables (Tabla 3) son fundamentales en la producción enzimática, ya que determinan la cantidad de enzima producida durante la fermentación.

En todas las fermentaciones en SmF realizadas se trabajó en el fermentador Minifors 2 (Figura 3) con un volumen de 1,5 L en sistemas batch, donde el medio de cultivo como fuente de nutrientes fue pasta de tomate al 15% v/v, suplementado con sulfato de cobre a 400 μ M y la temperatura se mantuvo constante a 30°C, con una concentración de inóculo de 10% v/v (Chavarría Ortiz, 2016). Donde, para evaluar la efectividad de la fermentación se tomaron muestras diarias y se midió la actividad enzimática de Lacasa, además de la concentración de la fuente de carbono (carbono orgánico total y glucosa) y nitrógeno (nitrógeno total y como amonio) suministrada. En cuanto a las variables manipuladas, estas fueron evaluadas mediante cuatro corridas experimentales en sistema batch (Tabla 4).

Tabla 3. Variables asociadas al diseño experimental.

Fijas		Manipuladas	Monitorizadas
Concentración de inóculo	10% v/v	Inoculación	Actividad enzimática
Temperatura	30 °C	Agitación	
Concentración de inductor	400 μ M	Aireación	
Tipo de fermentación	SmF	pH	Concentración de fuentes de carbono
Volumen del fermentador	1,5 L		
		Espuma	
Concentración medio cultivo	15% v/v	Porcentaje oxígeno disuelto (OD)	Concentración de fuentes de nitrógeno
Modo de operación	Batch		

Tabla 4. Corridas experimentales realizadas.

Fermentación	Agitación	Aireación	OD	pH	Inoculación	Espuma
1	200 rpm	1,5 L/min	Sin control	Sin control	Directa sin preincubación	Sin control
2	200 rpm	1,5 L/min	Sin control	Sin control	Preincubación directa 24 h	Controlada
3	200 rpm	Manipulada	Controlado con set point 100%	Sin control	Preincubación de micelio durante 48 h	Controlada
4	200 - 500 rpm	Manipulada	Controlado con set point 80%	Controlado con set point en 4,5	Preincubación de micelio durante 48 h	Controlada

Para el control de OD, en la fermentación 3 se utilizó como variable manipulada la aireación para mantener un set point de 100%, en cambio, para la fermentación 4, el set point se estableció en 80%, realizando un control en cascada que manipulaba primeramente la aireación entre 0 – 4 L/min y luego la agitación entre 200 - 500 rpm. Asimismo, para el control de pH se utilizó ácido clorhídrico e hidróxido de sodio, ambos en una concentración de 0,5 N para mantener un set point de 4,6.

En cuanto a la inoculación, se realizó de dos maneras, directa (desde el Fernsbatch almacenado) o con una cantidad conocida de micelio (sólidos suspendidos volátiles del Fernsbatch), y con o sin preincubación del inóculo, esto es, realizando una adaptación del hongo a las condiciones del proceso de fermentación, con el fin de disminuir el tiempo en que ocurre la fase de latencia.

Para llevar a cabo la preincubación directa, se trituró el Fernsbatch o pre-inóculo almacenado y posteriormente, se añadieron 160 mL en un matraz de 500 mL con 150 mL de medio de cultivo (concentración de 50% v/v) y se llevó a un shaker a 200 rpm y 30 °C durante 24 h.

En el proceso de preincubación de micelio, se dosificó el Fernsbatch homogenizado en tubos Falcon estériles de 50 mL, la cantidad necesaria para obtener 31 mL de micelio de acuerdo con los SST (Apéndice B), luego, este fue llevado a una centrífuga a 7.000 rpm durante 5 min para eliminar el líquido sobrenadante, así en un matraz de 250 mL se añadió 150 mL de medio y el micelio para mantener una concentración de inóculo de 17% v/v y se llevó a un shaker a 200 rpm y 30 °C, durante 48 h o hasta que la concentración de glucosa disminuyera al menos un 30% con respecto a la concentración inicial.

En ambos casos, el inóculo preincubado se extrajo con jeringas estériles y se inyectó al fermentador una vez que se alcanzaron las condiciones de agitación, temperatura y aireación dentro del fermentador.

A las fermentaciones 3 y 4 se le incorporó el sensor de espuma, el cual acciona una bomba que incorporaba Antifoam B Emulsion (A5757), el cual es una emulsión acuosa al 10% de polydimethylsiloxane diluida en 3 partes de agua destilada tipo I.

4.3. Métodos de análisis

Lacasa

Se utilizó el método de oxidación de ABTS (2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico] sal de diamonio), adquirido desde Sigma Aldrich. Los reactivos utilizados fueron ABTS a una concentración de 20 mM y acetato buffer pH 5 a 400 mM. El procedimiento se realizó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 436 nm, registrando valores de absorbancia a 0, 5, 10 y 15 s. La actividad se obtuvo utilizando un coeficiente de extinción molar de $29.300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Muñoz et al., 1997) (Apéndice C). Una unidad de Lacasa se definió como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μmol de ABTS por minuto (U/L).

Azúcares reductores

Para determinarlos, se utilizó el método de DNS (ácido 3,5-dinitrobenzoico) (Miller, 1959), utilizando como solución estándar glucosa a una concentración de 2 mg/mL. La concentración se obtuvo con los valores de absorbancia medidos a 640 nm y mediante la pendiente de la curva calibración (Apéndice D) de la solución patrón (Apéndice C).

Amonio

Se utilizó el método desarrollado por Weatherburn (1967), midiendo la absorbancia en espectrofotómetro Specord 210 plus a 635 nm, utilizando una solución de trabajo de 10 ppm de N-NH_4^+ . La concentración se obtuvo a partir de los valores de absorbancia (Apéndice C) y la pendiente de la curva de calibración (Apéndice D).

Carbono y nitrógeno total

Para la medición de carbonos orgánicos totales (TOC) y nitrógeno total (TN) se utilizó el equipo Multi N/C 3100 de Analytik-Jena, utilizando una dilución de 1 en 25 partes (2 mL de muestra en 50 mL de agua destilada tipo I), la cual fue previamente filtrada mediante filtros de membrana.

Sólidos suspendidos totales

La medición se realizó utilizando el método de APHA et al. (1998), por medio de un proceso de filtración a vacío en un matraz Kitasato con un filtro de membrana y una muestra homogénea de la (en agitación) para su posterior secado a $105 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas, determinando el peso seco por diferencia (Apéndice B).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las fermentaciones 2, 3 y 4, se realizó una preincubación del inóculo con el objetivo de favorecer la adaptación del hongo a las condiciones que se llevó a cabo la fermentación y con ello reducir la fase de latencia para iniciar el proceso en su fase exponencial. Para ello, se siguió el procedimiento descrito en la Sección 4.2, el cual permitió alcanzar una disminución de glucosa de 33 y 63% para las fermentaciones 3 y 4 respectivamente luego de 48 h de preincubación. Esta etapa permitió una fase de crecimiento inicial o latencia controlada para las dos últimas fermentaciones, asegurando que las células estuvieran metabólicamente activadas y adaptadas a las condiciones del medio antes del inicio del proceso en escala mayor. No obstante, estas fermentaciones difieren en variables operacionales, como la agitación, el control de pH y porcentaje de OD establecido.

Durante la fermentación 1 se evidenció la formación de espuma dentro del equipo (Figura 4) producida por el hongo cuando se encuentra en su fase de crecimiento exponencial y los azúcares de la pasta de tomate, lo cual provocó que parte del medio de cultivo se desbordara y quedara almacenado en el matraz atrapa espuma, por lo cual, en la fermentación 2, se incorporó un sensor antiespumante que añadió Tween 80, surfactante que promueve la actividad enzimática (Sung & Jong, 2003), para evaluar su efecto en la espuma producida por el fermentador. Sin embargo, no disminuyó este problema ni mejoró la actividad, por lo que se decidió incorporar el Antifoam B Emulsión a las fermentaciones 3 y 4, siendo efectivo para evitar el desbordamiento del medio de cultivo, no obstante parte de la biomasa del hongo se quedó alojada igualmente en la superficie del fermentador, lo cual impidió que este pudiera consumir sus nutrientes, por lo que cuando esto ocurrió, se agitó manualmente el equipo para homogenizar.



Figura 4. Problema operacional asociado a la espuma en la fermentación 1.

5.1. Consumo de fuentes de carbono y nitrógeno

A partir de la concentración de nutrientes en función del tiempo de fermentación, se obtuvieron las tasas de consumo para el TOC, TN, glucosa y nitrógeno amoniacal, considerando la pendiente máxima alcanzada (Tabla 5).

Tabla 5. Tasas de consumo en las fermentaciones realizadas.

Tasa consumo Fermentación	TOC, g/d	TN, g/d	Glucosa, g/d	N-NH ₄ ⁺ , g/d
1	3,13	0,30	3,37	0,028
2	2,72	0,16	3,93	0,025
3	1,94	0,10	4,67	0,049
4	2,27	0,12	4,70	0,017

El consumo de carbono y nitrógeno también se aprecian de manera gráfica, en específico, en la Figura 5, se observa la evolución del consumo de carbono orgánico total en el tiempo, donde, de manera general, este fue consumido por el microorganismo, por lo cual disminuyó su concentración conforme transcurrió la fermentación. En particular, los valores fueron casi constantes para la fermentaciones 1 y 2 durante los primeros días, lo cual indica que el hongo aún no llevaba a cabo un consumo de carbono orgánico, en cambio, un descenso significativo se aprecia durante los primeros tres días en las fermentaciones 3 y 4. Esto sugirió un gran consumo de estos compuestos por parte del microorganismo, lo cual responde principalmente a la inoculación utilizada y a la preincubación, ya que en este caso, el hongo se encontraba adaptado para comenzar su crecimiento y alimentación. Sin embargo, al finalizar el cultivo, los cuatro casos no muestran diferencias significativas, ya que la concentración permaneció estable durante los últimos días del proceso.

Las gráficas obtenidas en todas las fermentaciones indican que las condiciones establecidas en cada caso no tuvieron un impacto significativo en el consumo de TOC, puesto que en todas se observó una reducción en la concentración desde aproximadamente 6.000 mg/L hasta 1.000 mg/L. No obstante, la diferencia radica en el día en que se alcanza la mínima concentración de TOC, correspondiente al día cinco para las fermentaciones 1 y 2, en cambio, para las fermentaciones 3 y 4 ocurre aproximadamente al día tres.

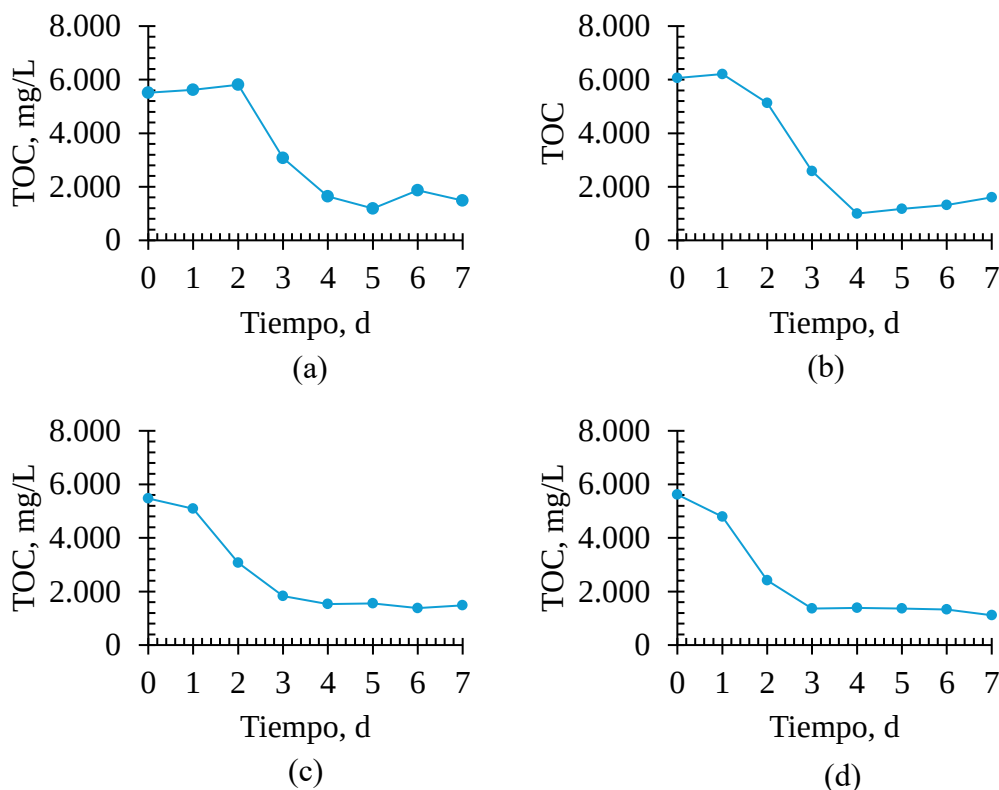


Figura 5. Variación en la concentración de carbono orgánico total. (a) Fermentación 1, (b) Fermentación 2, (c) Fermentación 3, (d) Fermentación 4.

Análogamente, la Figura 6 muestra la concentración de nitrógeno total, donde en las cuatro fermentaciones se aprecia un descenso al inicio del proceso, luego una estabilización y posterior aumento. En estas se presentaron valores iniciales que estuvieron en un rango de 250 - 300 mg/L en todos los casos. Asimismo, al término de las fermentaciones se evidenció una cantidad residual de nitrógeno en el medio, sin embargo, este alcanzó valores mayores en la fermentación 3, donde aumentaron más abruptamente en comparación con las otras fermentaciones, que es más gradual, lo cual podría estar asociado al metabolismo secundario del hongo desencadenado por la limitación de nutrientes y por tanto, a la liberación de compuestos nitrogenados como resultado de la descomposición de biomasa o la desnaturalización de proteínas, para suplir los requerimientos del microorganismo.

Al igual que en los resultados anteriores, la concentración de TN se vio afectada por la inoculación, reflejándose en que la concentración se agotó un día antes en las fermentaciones que se realizó una preincubación de micelio, de aproximadamente al día dos, en comparación con el día tres para la fermentación 1 y 2. Esto responde al nivel de nitrógeno alcanzado al final del proceso, pues al agotarse más rápido, el microorganismo tiene la necesidad de buscar otras fuentes de nutrientes para utilizarlas para su crecimiento y desarrollo, por lo que hay una mayor liberación de metabolitos secundarios que degradan otras células, liberando nitrógeno al final de la fermentación.

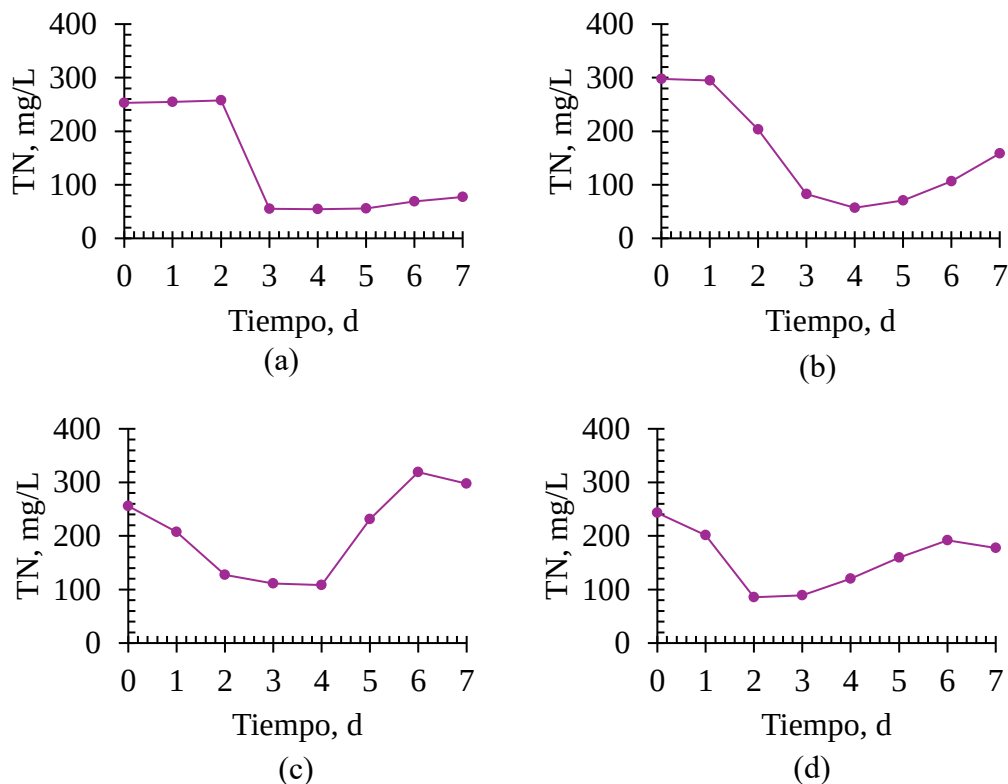


Figura 6. Variación en la concentración nitrógeno total. (a) Fermentación 1, (b) Fermentación 2, (c) Fermentación 3, (d) Fermentación 4.

Si bien los gráficos de concentración de TOC y TN en función del tiempo reflejan el consumo general de los nutrientes en el medio, es importante visualizar el comportamiento de la glucosa (Figura 11) y nitrógeno amoniacal (Figura 12), ya que ambos actúan como fuente principal de carbono y nitrógeno dentro del proceso.

En la Figura 11 se evidencia una concentración inicial de glucosa que varió entre 6.000 y 8.000 mg/L, la cual estuvo dada por el medio de cultivo y el azúcar residual que quedó del proceso de preincubación, esto indicó la presencia de una de las principales fuentes de carbono en el medio, la cual se encontraba disponible para favorecer el crecimiento de *Trametes versicolor*. Luego, esta disminuyó debido a su consumo, alcanzando valores inferiores a 1.000 mg/L al cuarto, tercer y segundo día para la fermentación 1, 2, 3 y 4 respectivamente, esto concuerda con el estudio realizado por Thiruchelvam & Ramsay (2007), cuyo cultivo inicia con aproximadamente 9 g/L de glucosa que se consume alcanzando valores inferiores a 1 g/L, lo cual coincide con los peak de actividad y biomasa alcanzados.

El proceso de preincubación tuvo implicancias en el crecimiento celular del hongo y por tanto en el consumo de nutrientes. Esto se refleja, por ejemplo, en que la tasa de consumo de glucosa fue aumentando tras las fermentaciones (Tabla 5), alcanzando 16, 38 y 39% más para las fermentaciones 2, 3 y 4 respectivamente con respecto al caso base (fermentación 1), donde no hubo un consumo significativo durante los primeros dos días, porque su actividad metabólica fue menor.

Esto supondría una mayor cantidad de células activas que consumieron la fuente al inicio del proceso producto de una disminución en la fase de latencia del hongo. Cabe destacar que en la fermentación 2, la duración de la fase de latencia no disminuyó debido a que la concentración de Fernsbatch en la preincubación fue alta, sin embargo, el consumo de glucosa aumentó pese a que el número de células fuera menor y la concentración inicial mayor, con respecto al caso base, lo cual indica que el método de preincubación permitió un consumo más rápido de esta fuente.

El consumo de glucosa también se aprecia cualitativamente en las Figuras 7, 8, 9 y 10, las cuales ilustran la evolución de los cultivos durante las fermentaciones respectivas, donde se observó un cambio de color a medida que transcurrieron los días y el azúcar fue consumida por el hongo para promover su crecimiento, evidenciado por pequeños pellets que se desarrollaron a lo largo del proceso. Este mismo comportamiento se reportó en los cultivos en matraces de 250 mL realizados por LLona Villarroel (2016) durante 15 d.



Figura 7. Evolución del estado del fermentador en la fermentación 1.

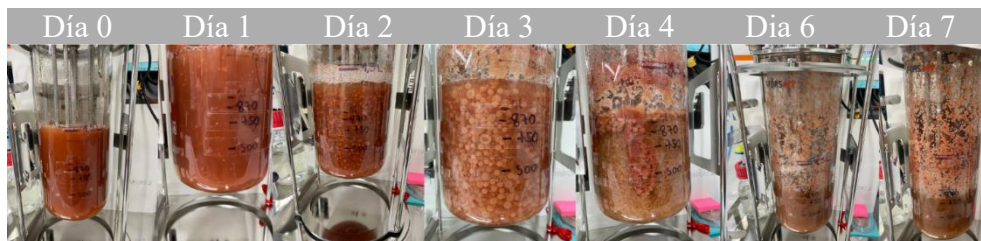


Figura 8. Evolución del estado del fermentador en la fermentación 2.

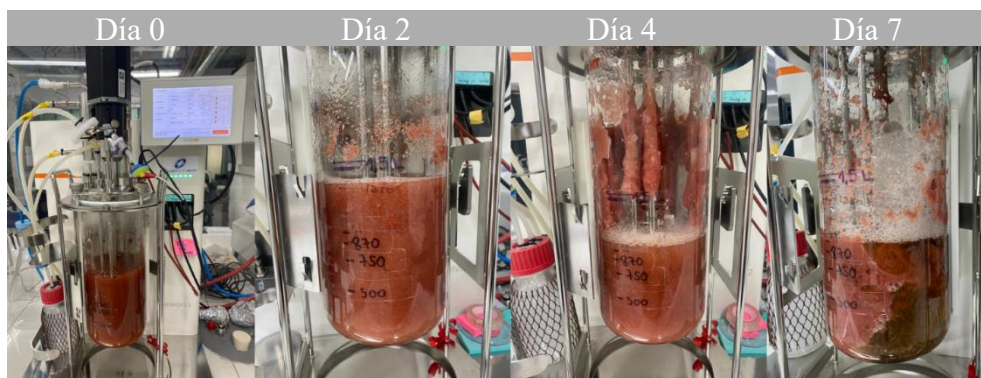


Figura 9. Evolución del estado del fermentador en la fermentación 3.

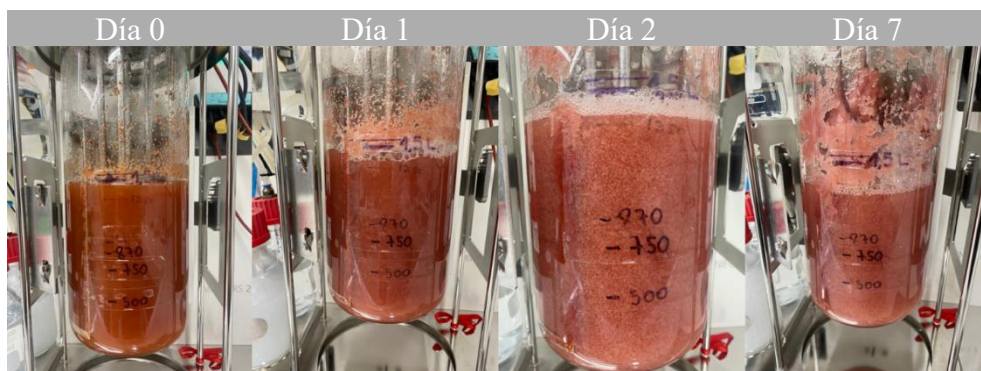


Figura 10. Evolución del estado del fermentador en la fermentación 4.

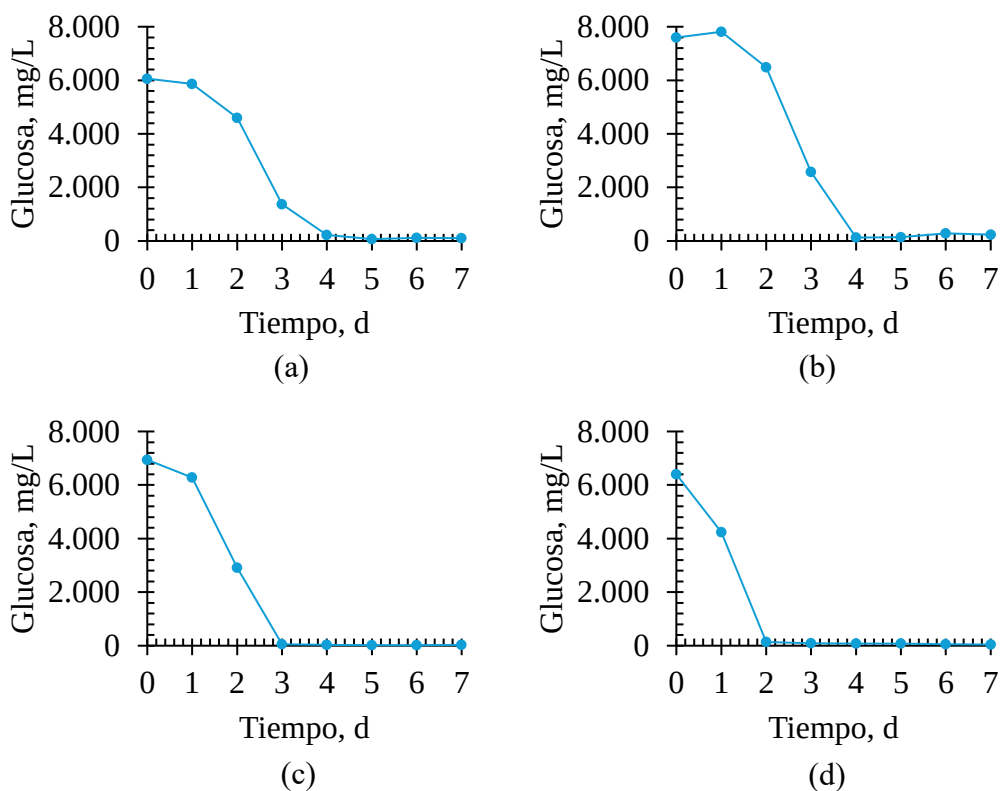


Figura 11. Consumo de glucosa. (a) Fermentación 1, (b) Fermentación 2, (c) Fermentación 3, (d) Fermentación 4.

De manera similar, la concentración de nitrógeno amoniacal en el medio (Figura 12) comenzó en valores cercanos a los 30 mg/L, los cuales se consumieron a medida que transcurrió la fermentación, alcanzando valores inferiores a 5 mg/L en el día tres y dos, para las fermentaciones 1, 2, 3 y 4 respectivamente, posteriormente, la concentración aumentó siguiendo el mismo comportamiento descrito para el consumo de TN, obteniendo entre 100 - 200 mg/L de nitrógeno amoniacal en el medio al término de las últimas dos fermentaciones, en comparación con las dos primeras, lo cual refleja que la cantidad de metabolitos secundarios producidos por el hongo fueron menor en estos casos, por lo que se esperaría una menor concentración de enzima. Este

comportamiento coincide con lo obtenido por Couto et al. (2002), quienes registraron la concentración de amonio en función del tiempo en la producción de Lacasa con *Trametes versicolor*, obteniendo que una limitación de este compuesto y de glucosa coincide con el inicio de la actividad enzimática, además, reportó un aumento en la concentración de amonio en los últimos días de fermentación, lo cual podría indicar que se está produciendo autólisis del hongo, indicando el fin del cultivo. Cabe destacar que la tasa de consumo de N-NH_4^+ (Tabla 5) disminuyó para la fermentación 4 debido a que la concentración inicial de esta fuente fue menor.

A nivel general, se observó que la tasa de consumo de glucosa (Tabla 5) fue mayor en el caso de la fermentación 4, donde se aumentó un 39% con respecto al caso base, ya que se consumió casi por completo al segundo día, mientras que en las otras fermentaciones fue uno o dos días después, debido al proceso de adaptación que tuvo que experimentar el hongo para llevar a cabo su crecimiento, lo cual estuvo ligado a la cantidad de nutrientes que consumió durante la preincubación, que fue mayor cuando se realizó para la fermentación 4, por lo que se esperaría una mayor cantidad de células activas al momento de la inoculación en el fermentador, traduciéndose en un consumo rápido de nutrientes. Finalmente, los resultados obtenidos para la fermentación 2, reflejan que el metabolismo del hongo estuvo más enfocado en el crecimiento celular que en la producción de enzima Lacasa, lo cual se evidenció en el tamaño de los pellets producidos (Figura 8), dado que la concentración inicial de nutrientes fue mayor en este caso.

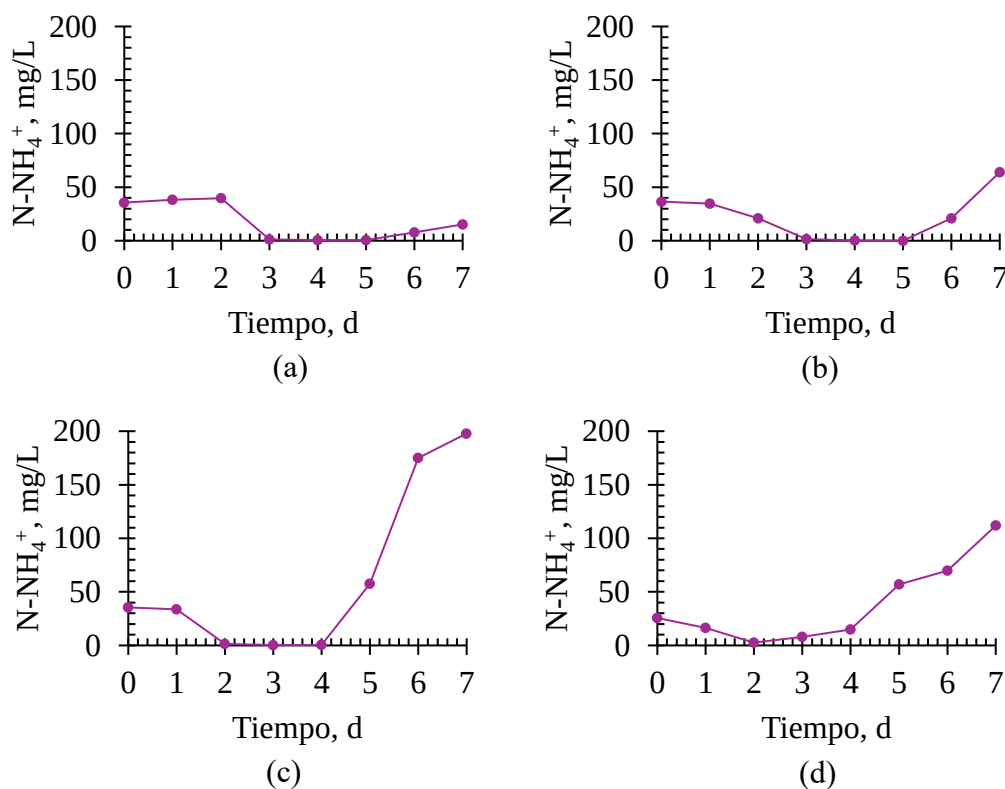


Figura 12. Consumo de nitrógeno amoniaco. (a) Fermentación 1, (b) Fermentación 2, (c) Fermentación 3, (d) Fermentación 4.

5.2. Producción enzimática

La actividad enzimática de Lacasa se determinó considerando un factor de dilución de 10 y 20, ya que la analítica se realizó a partir de 100 y 50 μL de muestra respectivamente en un volumen total de reacción de 1 mL. Los resultados se ilustran en la Figura 13, donde se aprecia que las fermentaciones 3 y 4, presentaron un aumento gradual de actividad enzimática, alcanzando valores superiores a 1.000 U/L a partir del quinto día de fermentación. Además, en ambos casos, los resultados indicaron actividad enzimática desde el día cero, esto debido al proceso preincubación, ya que el microorganismo se encontraba activo antes de inocular, por lo que es posible que haya comenzado a producir una pequeña cantidad de enzima durante el pre-cultivo que luego fueron transferidas al fermentador iniciando la fase de crecimiento exponencial. Por el contrario, en las fermentaciones 1 y 2, las actividades máximas alcanzadas no superaron las 500 U/L.

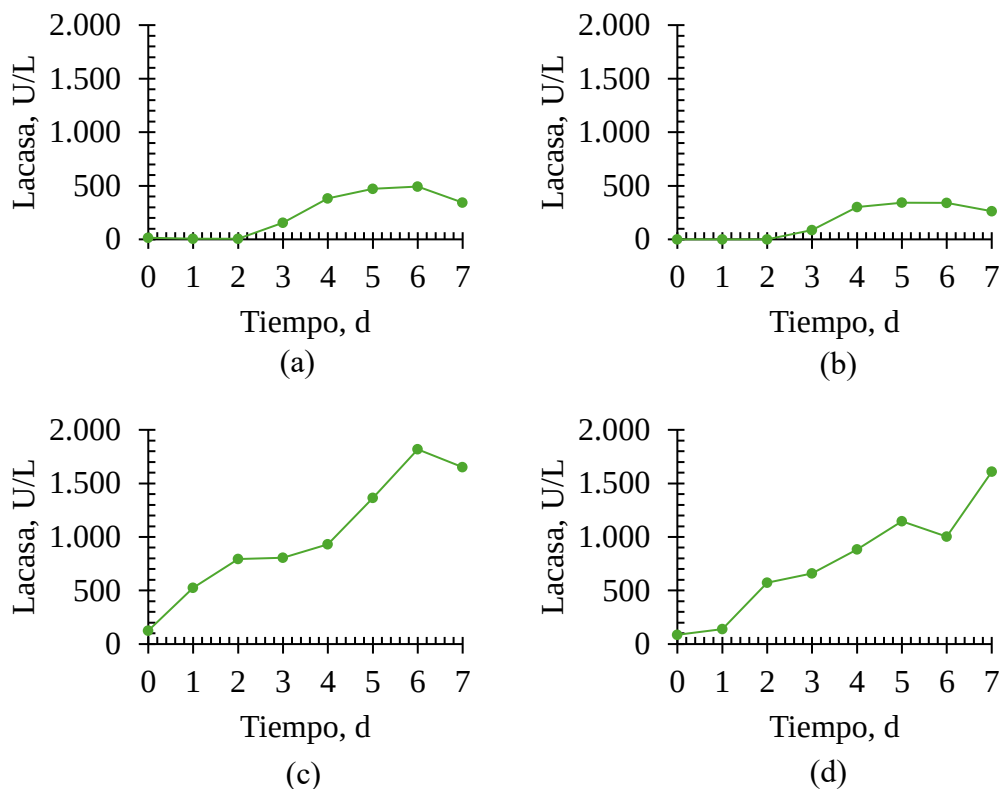


Figura 13. Producción de enzima Lacasa. (a) Fermentación 1, (b) Fermentación 2, (c) Fermentación 3, (d) Fermentación 4.

Los resultados obtenidos en las fermentaciones 1 y 2 revelaron que el método de inoculación implementado no fue efectivo para obtener altos niveles de actividad enzimática. Para la fermentación 1 esto se debió a que el pre-inóculo, al estar almacenado en refrigeración, redujo la actividad metabólica del hongo, lo que pudo prolongar el período de adaptación en el fermentador, retrasando su crecimiento y por tanto, el de la de actividad enzimática, en cambio, en la fermentación 2, las 24 h y la composición de pre-inóculo en la preincubación no permitió alcanzar valores mayores de actividad, debido a que en este caso la cantidad de células inoculadas fue menor

en comparación con el caso base, sin embargo, el consumo de glucosa aumentó en un 16%. Así, como el volumen total en la preincubación fue de 310 mL y solo se utilizaron 150 mL para inocular el fermentador, es probable que una fracción significativa de las células quedara retenida en el pre-cultivo, disminuyendo la cantidad de microorganismos que fueron transferidos al equipo, lo que, a su vez, redujo la liberación de la enzima Lacasa en el sistema. Debido a esto, la preincubación de micelio se presentó como una solución efectiva para aumentar el crecimiento del hongo y posterior actividad enzimática de Lacasa, pues contribuyó a disminuir la fase de adaptación o latencia del microorganismo y obtener mayores valores de actividad en las fermentaciones 3 y 4, en particular, para la fermentación 3, significó un aumento de 3,7 veces la actividad obtenida en el caso base y 1,8 veces la concentración de Lacasa producida en matraces de 250 mL. Lo anterior es consistente con el estudio de Rancaño et al. (2003), quienes mencionan la relevancia de realizar pre-cultivos, puesto que esto garantiza una cantidad suficiente de biomasa en el fermentador. De lo contrario, el crecimiento del hongo podría verse comprometido, llevando a un retraso en su desarrollo y a una velocidad inadecuada de producción de enzimas.

En las cuatro fermentaciones, el aumento en la actividad enzimática fue consistente con el déficit de fuentes de carbono y nitrógeno, ya que cuando estos se limitaron, la actividad aumentó, alcanzando su máximo valor, con 492, 342, 1.818 y 1.609 U/L al sexto, quinto, sexto y séptimo día para las cuatro fermentaciones respectivamente, esto demuestra que la Lacasa actúa como un metabolito secundario que se libera cuando el hongo se encuentra en condiciones de estrés por falta de nutrientes, para continuar con su crecimiento, así también lo indica Xavier et al. (2007), quien reportó que la restricción de carbono por sí sola es capaz de incrementar la producción de Lacasa y que las actividades enzimáticas más altas no necesariamente se logran durante la fase de crecimiento exponencial, lo cual indica que el hongo produce la enzima como resultado de un metabolismo secundario. Asimismo, Tavares et al. (2005), señala que la producción de Lacasa depende de la concentración de glucosa. Sin embargo, se han realizado diversos estudios que señalan que la producción de enzimas ligninolíticas pueden estimularse cuando las concentraciones de nitrógeno son bajas (Patel et al., 2009) lo cual es consistente con los resultados obtenidos, ya que en las cuatro fermentaciones la actividad incrementó significativamente cuando este se agotó.

Es preciso mencionar la relación entre la biomasa y la actividad, ya que, si bien en la fermentación 2 se obtuvo pellets de mayor tamaño (Figura 8) en comparación con las otras fermentaciones, esto no se tradujo en una mayor concentración de Lacasa, en ese sentido Philippoussis et al. (2011) demostraron relaciones negativas entre el rendimiento de biomasa y la actividad de Lacasa.

Los resultados concuerdan con estudios previos realizados a la cepa *Trametes versicolor*, Thiruchelvam & Ramsay (2007) realizaron una fermentación en condiciones similares a la de este estudio, con preincubación y utilizando 100 mL de micelio en 1,25 L de medio, a 22°C y pH 4,5 - 5,5, 200 - 350 rpm y aireación 0,2 - 1 vvm para un mínimo de 60% de saturación de OD, en sistema batch y obtuvieron una concentración de Lacasa de 1.385 U/L. Asimismo, F. Wang et al. (2013) obtuvieron una actividad de 1.219 U/L en un fermentador de columna de burbujeo de 2 L, a 26°C y aireación 200 mL/min. Del mismo modo, Rancaño et al. (2003) produjeron Lacasa en un

fermentador airlift batch de 2 L a 30°C, aireación de 1 L/min, pH libre, utilizando el inductor 2,5-xilidina y alcanzaron valores cercanos a 1.500 U/L.

Este estudio permitió obtener niveles de actividad enzimática de Lacasa que se asemejan o superan a estudios previos realizados en condiciones similares y en matraces de 250 mL. Donde, además, la reducción del tiempo necesario para alcanzar el peak de actividad es una ventaja significativa, particularmente en el escalamiento de la producción, donde la reducción del tiempo de fermentación y el uso de sustratos como la pasta de tomate, reduce costos.

5.3. Efecto del oxígeno disuelto y el pH

Se monitorearon los parámetros oxígeno disuelto y pH a lo largo del tiempo para evaluar su influencia en la producción de Lacasa. En este contexto, el oxígeno disuelto se refleja como un consumo por parte del hongo, puesto que es un microorganismo aerobio, en cambio, las variaciones en el pH están asociadas con el consumo de nutrientes, la producción de metabolitos, entre otras.

En las Figuras 14, 15 y 16, se presentan los gráficos de OD obtenidos para las fermentaciones 2, 3 y 4 respectivamente, donde para la primera solo fue monitoreado, en cambio, en las dos últimas se controló el porcentaje de OD mediante la aireación en un rango de 0 – 4 L/min para ambos casos, y mediante un control en cascada manipulando la agitación en un rango de 200 – 500 rpm para la fermentación 4, fijando un set point de 100% (7,6 mg/L) y 80% (6,08 mg/L) para las fermentaciones 3 y 4 respectivamente.

En la fermentación 2 (Figura 14), se observa que el OD comenzó con 100%, el cual se mantuvo dentro de este rango hasta el día uno, donde empezó a descender debido a que el microorganismo inició su fase de crecimiento, consumiendo nutrientes y oxígeno, alcanzando un valor mínimo de aproximadamente 20% al tercer día, lo que coincidió con la aparición de actividad enzimática. En ese sentido, Pinheiro et al. (2020) reporta que la concentración de OD en un fermentador productor de Lacasa disminuyó al comienzo de la fermentación y se consumió, cuando aumentó la producción de Lacasa. Posteriormente, el porcentaje varió entre 20 y 90% aproximadamente, debido a que la liberación de nitrógeno durante el metabolismo secundario causó un consumo relativo de esta fuente y de oxígeno por parte de las células que aún se encontraban activas. Además, no hubo una variable que supliera los requerimientos del hongo, ya que la agitación y aireación estaban seteadas a un valor fijo (Apéndice E), indicando una limitación periódica en la transferencia de oxígeno.

La deficiencia de oxígeno disuelto durante los primeros días de fermentación supuso un problema asociado a la baja actividad enzimática conseguida bajo las condiciones establecidas, por lo que, en la fermentación 3 y 4 se controló esta variable mediante la aireación y la agitación, con el fin de mantener un porcentaje de OD adecuado para que la actividad enzimática fuera eficiente.

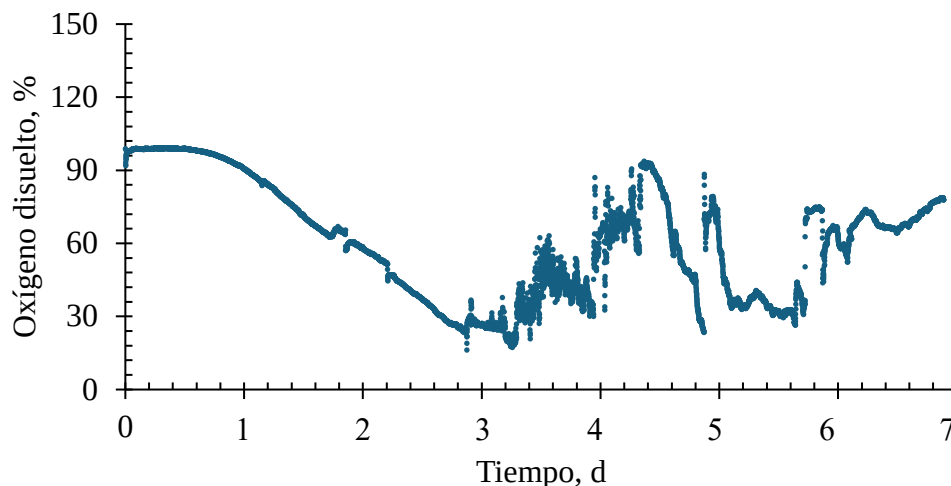


Figura 14. Porcentaje de oxígeno disuelto en la fermentación 2.

Los resultados de porcentaje de OD en las dos últimas fermentaciones (Figura 15 y 16), representaron la variabilidad de este a lo largo del proceso. En particular, en la fermentación 3 (Figura 15), se aprecia una mayor fluctuación en los valores, con una caída cercana al 20% que comenzó desde el primer día. Esto pudo deberse a que el hongo se encontraba en su fase de crecimiento, por lo que consumió una gran cantidad de oxígeno, relacionado con el aumento en la actividad enzimática y el consumo de fuentes de carbono y nitrógeno en las fermentaciones 3 y 4. Cabe destacar que las desviaciones en los días 2 y 3 de la Figura 15 se debieron a que, al realizar la agitación manual del equipo, la biomasa que se encontraba en las paredes se homogenizó en el medio, por lo cual la concentración de oxígeno aumentó. Asimismo, el aumento de OD en los días posteriores se debió a la misma razón mencionada para la fermentación 2, sin embargo, en este caso, la acumulación de biomasa en las paredes del fermentador también contribuyó a que el oxígeno disponible variara dentro del equipo.

Pinheiro et al. (2020) señala que cuando se alcanzó la máxima actividad de Lacasa, la concentración de OD aumentó. Esto se asemeja al comportamiento descrito en las fermentaciones 3 y 4, donde el porcentaje de OD se incrementó a valores en torno a 100% a partir de sexto día de fermentación, que fue cuando la actividad enzimática fue máxima. Sin embargo, en la fermentación 3, a pesar de haber establecido un control de esta variable, no se logró alcanzar el set point establecido, porque la acumulación de micelio en el aireador no permitió el ingreso correcto de aire, lo cual activó la alarma de aumento de presión en el equipo, por lo que el control detuvo el ingreso de este y el flujo no superó los 2 L/min (Apéndice E), que no fue suficiente para alcanzar el valor esperado durante el proceso. Un comportamiento similar se observó en la fermentación 4 (Figura 16), no obstante, en este caso, al no depender únicamente de la aireación, el periodo de bajo porcentaje fue menor con respecto al caso anterior, pues la agitación se encontraba en su máximo valor (Apéndice E), además, esto aumentó el porcentaje de OD dentro del equipo, alcanzando valores entre 60 y 120% a partir del día tres. Cabe destacar que, en este caso, el flujo de aire no superó 1 L/min (Apéndice E), por la misma razón descrita anteriormente, además, en

este caso la aireación se encendió y apagó constantemente. Esto sugiere un problema desde el punto de vista operacional, pues el fermentador no fue capaz de abastecer con mayores flujos de aire cuando se realizaron los cultivos, ya que al realizar la prueba con agua este si pudo controlar el OD a través de la aireación, manteniendo el set point (Apéndice E).

Es preciso mencionar que a pesar de haber logrado establecer concentraciones de OD mayores en la fermentación 4 que en la 3, fue en esta última en la que la actividad enzimática fue mayor, lo cual se podría asociar a que, en la fermentación 4, se aumentó la agitación en el equipo, tal como lo afirma Couto & Toca-Herrera (2007), pues altos valores de agitación pueden producir estrés mecánico sobre los hongos, lo cual pudo conllevar a un efecto represor en la producción de Lacasa. Del mismo modo, la fermentación 4 sufrió alteraciones entre los días 5 y 6, debido a que durante los últimos días del proceso, el OD aumentó, por lo que, al estar controlado y encontrarse en el set point de 80%, el sistema no aumentó la aireación e incluso la disminuyó (Apéndice E), lo mismo ocurrió con la agitación, la cual se mantuvo en el valor mínimo establecido (Apéndice E), esto conllevó a que la actividad disminuyera en el día seis por la falta de oxígeno durante el metabolismo secundario y luego aumentara al cambiar el set point a 100%. Esta caída en la aireación pudo significar que la actividad enzimática no se desarrollara correctamente, alterando los resultados esperados, pues el método de preincubación utilizado, el consumo de nutrientes tanto en el pre-cultivo como en el fermentador y el aumento en los valores de OD, deberían haber supuesto un aumento en la actividad enzimática para la fermentación 4.

El control de OD influyó de manera significativa en la producción, ya que en las dos fermentaciones que se controló esta variable, la actividad alcanzó valores superiores a 1.000 U/L, consistentes con los que reportan estudios en condiciones similares.

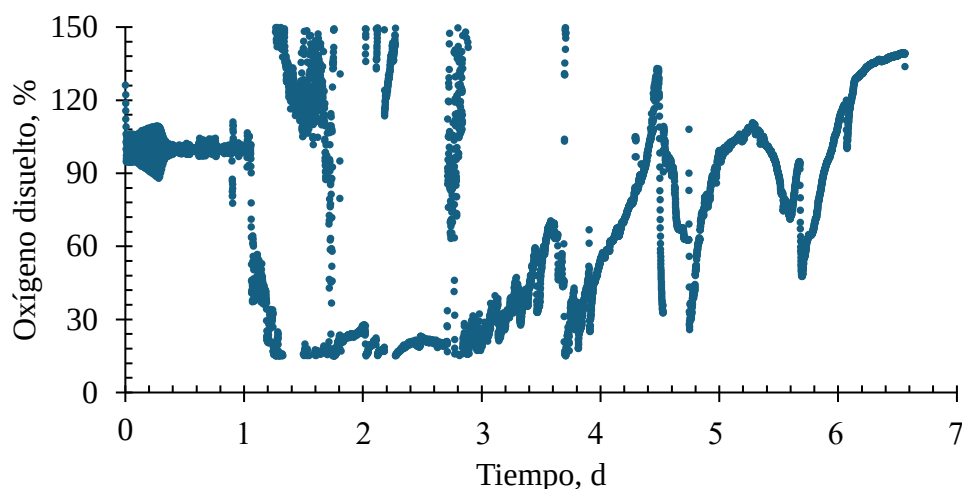


Figura 15. Porcentaje de oxígeno disuelto en la fermentación 3.

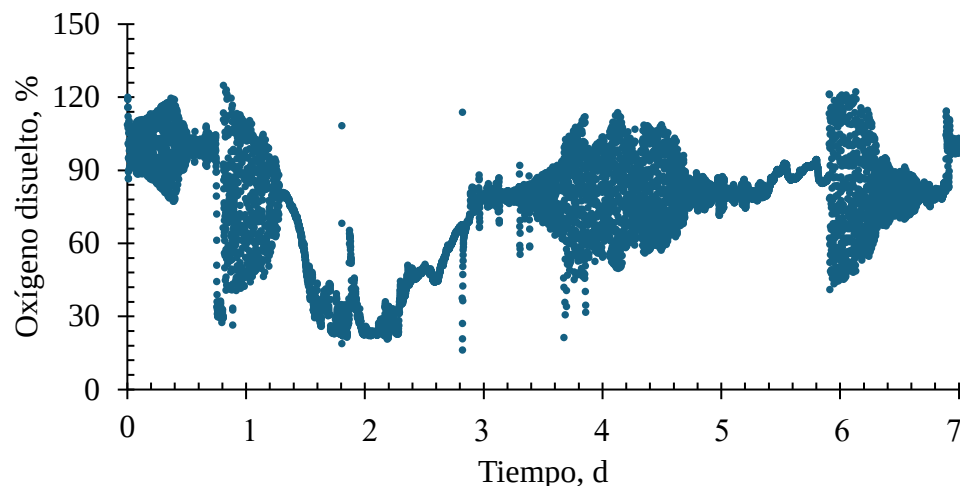


Figura 16. Porcentaje de oxígeno disuelto en la fermentación 4.

Otra de las variables que tiene implicancias sobre la actividad enzimática es el pH. En las Figuras 17 y 18 se ilustra el comportamiento del pH en función del tiempo, donde, en las cuatro fermentaciones, el pH inicial estuvo dado por el medio de cultivo, con un valor de aproximadamente 4,5, luego, este aumentó a partir del día tres, cuatro y dos para las fermentaciones 1, 2 y 3 respectivamente. Estas variaciones estuvieron relacionadas con la concentración de nutrientes, ya que el aumento en el pH coincidió con el consumo total de nitrógeno amoniacal y con su posterior aumento, el cual fue liberado por la acción del metabolismo secundario y destrucción de biomasa, haciendo más básico el medio. Este motivo que justifica el aumento del pH en el medio, también lo señala Atilano-Camino et al. (2020) quien asocia el incremento a la acumulación de células muertas y metabolitos extracelulares secretados por el hongo durante la fermentación. Esto explicaría el aumento abrupto de las fermentaciones 1 y 2 al quinto día, los cuales alcanzan valores cercanos a 7, pues coinciden con la actividad máxima de Lacasa, que actúa como metabolito secundario.

En la fermentación 3, se aprecia un aumento más gradual del pH en comparación con las otras dos fermentaciones, que al igual que los casos anteriores, tiene relación con la concentración de nitrógeno, sin embargo, en este caso se alcanzaron valores mayores, debido a que el metabolismo secundario fue favorecido. Comportamiento similar obtuvo Atilano-Camino et al. (2020), donde el pH aumentó hasta alcanzar valores cercanos a la neutralidad. Esto pudo haber limitado la concentración máxima de Lacasa, ya que el pH óptimo para su producción varía entre 4,5 – 5,5. Debido a esto, en la fermentación 4, el pH se controló y se mantuvo cercano a 4,6 durante todo el proceso (Figura 18), en este se observa que después del día uno el pH se incrementó debido al aumento de actividad enzimática, causado por la limitación de nitrógeno y carbono, pero este fue controlado. También, entre el día seis y siete, como se mencionó previamente, ocurrió un problema operacional que causó una disminución en la aireación, por lo que se evidenció una caída en el pH.

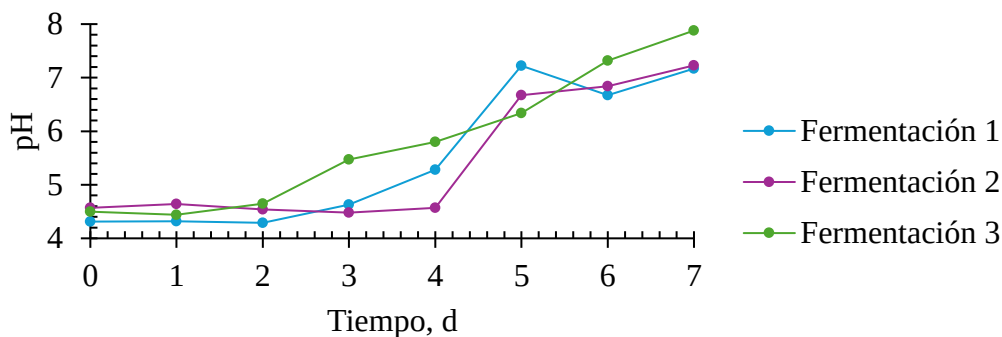


Figura 17. Variación en la concentración del pH para las fermentaciones 1, 2 y 3.

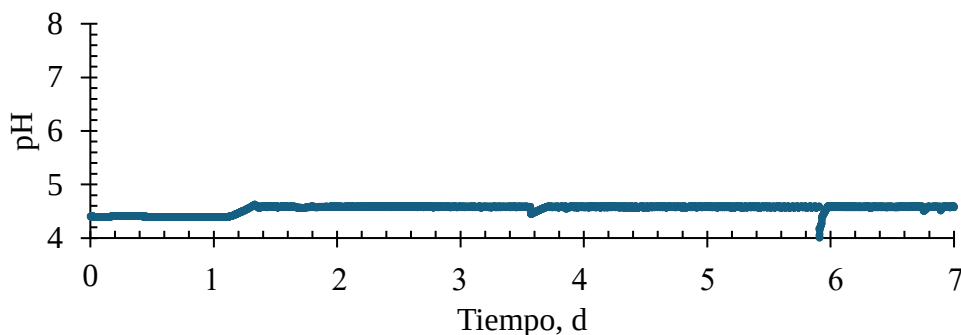


Figura 18. Variación en la concentración del pH para la fermentación 4.

En resumen, la actividad de Lacasa se vio favorecida por la limitación de fuentes de nutrientes como el carbono y el nitrógeno, los que a su vez, fueron consumidos rápidamente cuando se realizó una preincubación con micelio fúngico. Por otra parte, establecer variables óptimas de pH, agitación, aireación y oxígeno disuelto fueron claves para obtener altas concentraciones de enzimas. En este estudio, las condiciones que permitieron alcanzar la mayor actividad de Lacasa fueron las establecidas en la fermentación 3, cuando se fijó un 100% de OD controlado por la aireación, con una agitación de 200 rpm a 30°C, sin control de pH. Estas condiciones permitieron obtener niveles de actividad de Lacasa superiores a los alcanzados en matraces de 250 mL y en menor cantidad de días, cuando la concentración de glucosa alcanzó valores inferiores a los 50 g/L en SmF utilizando pasta de tomate al 15% v/v con 10% v/v de inóculo elaborado a partir del hongo de pudrición blanca *Trametes versicolor*.

Se concluye que las variables recomendadas para realizar una fermentación con las características de este estudio son: preincubación de 48 h con micelio al 17% v/v, 100% de OD controlado con aireación y agitación y pH controlado en 4,6. Cabe destacar que se recomienda establecer 100% de OD, a pesar de que el equipo no alcanza este valor, para evitar que no se activen las variables manipuladas los días en que este valor aumenta. Finalmente, este trabajo es una prospección de cómo se debería realizar la producción de enzima Lacasa para poder validar una metodología que maximice su producción, donde se necesita hacer réplicas en las condiciones de operación recomendadas, dado que los resultados presentados solo contemplan una franja de operación.

6. CONCLUSIONES

De acuerdo con el estudio realizado, fue posible escalar la producción de la enzima Lacasa mediante fermentación sumergida en un fermentador automático Minifors 2 operado en condiciones batch, utilizando como microorganismo productor al hongo de pudrición blanca *Trametes versicolor* al 10% v/v. Donde el medio de cultivo empleado consistió en pasta de tomate marca Mutti al 15% v/v como fuente de carbono y nitrógeno, además de sulfato de cobre 400 μM como inductor de la actividad enzimática. Este trabajo respondió a la necesidad de incrementar la productividad del proceso actual de producción enzimática, que se realiza en matraces Erlenmeyer de 250 mL, bajo condiciones similares a las aplicadas en este estudio, pero a menor escala. Para ello, se consideraron las siguientes variables: pH, oxígeno disuelto, actividad enzimática de Lacasa, concentración de glucosa, nitrógeno amoniacal, carbono orgánico total, nitrógeno total, temperatura, aireación, agitación y formación de espuma.

Al implementar la producción de enzima Lacasa, se obtuvieron como condiciones base: 30°C, 200 rpm y 1,5 L/min de aireación. Bajo estas condiciones, se alcanzó una actividad enzimática máxima de 492 U/L al sexto día de fermentación, lo cual coincidió con el agotamiento de las fuentes de carbono y nitrógeno. Sin embargo, los resultados evidenciaron que la secreción de Lacasa por parte del hongo mostró una estrecha relación con la limitación de nitrógeno en el medio de cultivo.

El análisis comparativo de los métodos de preincubación evidenció que la estrategia base de inoculación directa del pre-inóculo fue la menos eficiente en términos de consumo de carbono y nitrógeno, así como en la actividad enzimática de Lacasa. En contraste, la preincubación de 48 h utilizando micelio permitió una mejor activación celular, logrando una mayor cantidad de células activas al inicio de la fermentación. Este enfoque significó un consumo más eficiente de los nutrientes y un incremento en la actividad enzimática de Lacasa, alcanzando una concentración de 1.818 U/L al sexto día de fermentación.

El control del oxígeno disuelto (OD) tuvo un impacto significativo en la actividad enzimática y el consumo nutrientes. Cuando no se controló el OD, se observó una menor actividad enzimática debido a niveles insuficientes de oxígeno durante la etapa de crecimiento del hongo. Por otro lado, cuando se implementó un control efectivo con agitación y aireación, se alcanzaron valores mayores de OD, lo que se reflejó en un mayor consumo de nutrientes y un incremento en la actividad enzimática. Sin embargo, se identificó una limitación importante en el equipo utilizado, ya que no fue capaz de proporcionar la cantidad suficiente de aireación para mantener un set point alto de OD durante los primeros días de fermentación, cuando el hongo está iniciando su crecimiento y requiere mayor disponibilidad de oxígeno para su metabolismo.

Finalmente, la evaluación de la influencia del pH en el proceso de producción de Lacasa permitió identificar que un incremento en el pH está relacionado con la acumulación de metabolitos secundarios y eventualmente, con la muerte celular. Sin embargo, debido a un problema operacional, no fue posible demostrar que el control de pH maximiza la producción de Lacasa.

7. REFERENCIAS

- Abd El Monssef, R. A., Hassan, E. A., & Ramadan, E. M. (2016). Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2015.11.007>
- APHA, AWWA, & WPCF. (1998). Total Suspended Solids Dried at 103-105°C. In *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 2540 D* (20th ed.). American Public Health Association.
- Atilano-Camino, M. M., Álvarez-Valencia, L. H., García-González, A., & García-Reyes, R. B. (2020). Improving laccase production from *Trametes versicolor* using lignocellulosic residues as cosubstrates and evaluation of enzymes for blue wastewater biodegradation. *Journal of Environmental Management*, 275. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111231>
- Babič, J., & Pavko, A. (2012). Enhanced enzyme production with the pelleted form of *D. squalens* in laboratory bioreactors using added natural lignin inducer. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(3), 449–457. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1036-2>
- Ballesteros, A. O., Plou, F. J., Alcalde, M., Kunamneni, A., & Ballesteros, A. (2007). *Fungal laccase-a versatile enzyme for biotechnological applications. I.* <https://www.researchgate.net/publication/237336757>
- Birhanli, E., & Yesilada, O. (2010). Enhanced production of laccase in repeated-batch cultures of *Funalia trogii* and *Trametes versicolor*. *Biochemical Engineering Journal*, 52(1), 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.06.019>
- Blánquez, M. A. (2015). *Caracterización y función biológica de lacasa producida por “Streptomyces ipomea” CECT 3341: Aprovechamiento de su potencial oxidativo para la degradación de contaminantes ambientales.* Universidad de Alcalá.
- Böhmer, U., Frömmel, S., Bley, T., Müller, M., Frankenfeld, K., & Miethe, P. (2011). Solid-state fermentation of lignocellulotic materials for the production of enzymes by the white-rot fungus *Trametes hirsuta* in a modular bioreactor. *Eng. Life Sci.*, 11(4), Art. 4. <https://doi.org/10.1002/elsc.201000162>
- Bourbonnais, R., Paice, M. G., Reid, I. D., Lanthier, P., & Yaguchi, A. M. (1995). Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of the Mediator 2,2-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) in Kraft Lignin Depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), 1876–1880. <https://doi.org/10.1128/aem.61.5.1876-1880.1995>
- Braga, D. M., Brugnari, T., Haminiuk, C. W. I., & Maciel, G. M. (2024). Production and immobilization of laccases from monoculture and co-culture of *Trametes villosa* and *Pycnoporus sanguineus* for sustainable biodegradation of ciprofloxacin. *Process Biochemistry*, 141, 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.03.012>

- Brinch, D. S., & Pedersen, P. B. (2002). Toxicological studies on laccase from *Myceliophthora thermophila* expressed in *Aspergillus oryzae*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 35(3), 296–307. <https://doi.org/10.1006/rtp.2002.1538>
- Chavarría Ortiz, M. (2016). *Determinación de la cinética de degradación de oxitetraciclina mediante Trametes versicolor con extracto de tomate*. Universidad Técnica Federico Santa María.
- Chmelová, D., Legerská, B., Kunstová, J., Ondrejovič, M., & Miertuš, S. (2022). The production of laccases by white-rot fungi under solid-state fermentation conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(2). <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03207-y>
- Colla, I. M., de, O. B. Q., Bertéli, M. B. D., de Freitas, J. D. S., Avelino, K. V., Ruiz, S. P., do Valle, J. S., Linde, G. A., & Colauto, N. B. (2023). Carbon-to-nitrogen ratios on laccase and mushroom production of *Lentinus crinitus*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20(4), 3941–3952. <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04233-5>
- Couto, S. R., Gundín, M., Lorenzo, M., & Sanromán, N. (2002). Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochemistry*, 38(2), 249–255. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00087-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00087-0)
- Couto, S. R., & Toca-Herrera, J. L. (2007). Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, 25(6), 558–569. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.002>
- Debnath, R., & Saha, T. (2020). An insight into the production strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101645>
- Dutta, R. (2008). *Fundamentals of Biochemical Engineering*. Springer.
- Eggert, C., Temp, U., & Eriksson, K.-E. L. (1996). The Ligninolytic System of the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterization of the Laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1151–1158. <https://doi.org/10.1128/aem.62.4.1151-1158.1996>
- Fogler, H. S. (2008). *Elementos de ingeniería de las reacciones químicas* (Cuarta). Pearson Education.
- Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., & Haltrich, D. (2002). Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4), 529–536. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00522-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00522-1)
- Gou, Z. C., Lu, M. J., Cui, X. Y., Wang, X. Q., Jiang, M. Y., Wang, Y. S., Wang, Z. Q., Yu, X. X., Tang, S. S., Chen, G., & Su, Y. J. (2022). Enhanced laccase production by mutagenized *Myrothecium verrucaria* using corn stover as a carbon source and its potential in the degradation of 2-chlorophen. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 45(9), 1581–1593. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02767-z>

- Ha, H. C., Honda, Y., Watanabe, T., & Kuwahara, M. (2001). Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(6), 704–711. <https://doi.org/10.1007/s002530100653>
- Hahn Schneider, W. D., Cavion Costa, P., Fontana, R. C., de Siqueira, F. G., Pinheiro Dillon, A. J., & Camassola, M. (2019). Upscale and characterization of lignin-modifying enzymes from *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a bioreactor under parameter optimization and the effect of inducers. *Journal of Biotechnology*, 295, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.03.002>
- Hernández-Monjaraz, W. S., Caudillo-Pérez, C., Salazar-Sánchez, P. U., & Macías-Sánchez, K. L. (2018). Influence of iron and copper on the activity of laccases in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.002>
- Hölker, U., Höfer, M., & Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2), 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1504-3>
- Infors HT. (2017). *The Cookbook: Basic knowledge, recipes and strategies for microbial bioprocesses*.
- Lettera, V., Del Vecchio, C., Piscitelli, A., & Sannia, G. (2011). Low impact strategies to improve ligninolytic enzyme production in filamentous fungi: The case of laccase in *Pleurotus ostreatus*. *Comptes Rendus - Biologies*, 334(11), 781–788. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2011.06.001>
- Li, G., Liu, X., & Yuan, L. (2017). Improved laccase production by *Funalia trogii* in absorbent fermentation with nutrient carrier. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(4), 381–385. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.05.002>
- Liu, J., Cai, Y., Liao, X., Huang, Q., Hao, Z., Hu, M., Zhang, D., & Li, Z. (2013). Efficiency of laccase production in a 65-L air-lift reactor for potential green industrial and environmental application. *Journal of Cleaner Production*, 39, 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.08.004>
- LLona Villarroel, S. (2016). *Remoción in vivo de oxitetraciclina, mediante un cultivo sumergido, con el hongo Pleurotus eryngii*. Universidad Técnica Federico Santa María.
- López, M. J., Elorrieta, M. A., Vargas-García, M. C., Suárez-Estrella, F., & Moreno, J. (2002). The effect of aeration on the biotransformation of lignocellulosic wastes by white-rot fungi. *Bioresource Technology*, 81(2), 123–129. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00112-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00112-2)
- Majeau, J. A., Brar, S. K., & Tyagi, R. D. (2010). Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*, 101(7), 2331–2350. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.087>
- Merck. (2024). *Laccase from Trametes versicolor*. Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/product/sigma/38429>

- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Minussi, R. C., Pastore, G. M., & Dura'ndura'n, N. (n.d.). *Potential applications of laccase in the food industry*.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A. T., & Martínez, M. J. (1997). Induction and Characterization of Laccase in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus eryngii*. *Current Microbiology*, 34(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s002849900134>
- Nicotra, S., Cramarossa, M. R., Mucci, A., Pagnoni, U. M., Riva, S., & Forti, L. (2004). Biotransformation of resveratrol: Synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*. *Tetrahedron*, 60(3), 595–600. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2003.10.117>
- Niedermeyer, T. H. J., Mikolasch, A., & Lalk, M. (2005). Nuclear amination catalyzed by fungal laccases: Reaction products of p-hydroquinones and primary aromatic amines. *Journal of Organic Chemistry*, 70(6), 2002–2008. <https://doi.org/10.1021/jo048454s>
- Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., & Rodríguez-Couto, S. (2011). Cost analysis in laccase production. *Journal of Environmental Management*, 92(11), 2907–2912. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.052>
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., & Sannia, G. (2000). Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 920–924. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.920-924.2000>
- Parra Guardado, A. L., Belleville, M. P., Rostro Alanis, M. de J., Parra Saldivar, R., & Sanchez-Marcano, J. (2019). Effect of redox mediators in pharmaceuticals degradation by laccase: A comparative study. *Process Biochemistry*, 78, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.032>
- Patel, H., Gupte, A., & Gupte, S. (2009). Effect of different culture conditions and inducers on production of Laccase by Basidiomycete fungal isolate *pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. *BioResources*, 4(1), 268–284. <https://doi.org/10.15376/BIORES.4.1.268-284>
- Philippoussis, A., Diamantopoulou, P., Papadopoulou, K., Lakhtar, H., Roussos, S., Parissopoulos, G., & Papanikolaou, S. (2011). Biomass, laccase and endoglucanase production by *Lentinula edodes* during solid state fermentation of reed grass, bean stalks and wheat straw residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(2), 285–297. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0458-8>
- Pinheiro, V. E., Michelin, M., Vici, A. C., de Almeida, P. Z., & Teixeira de Moraes Polizeli, M. de L. (2020). *Trametes versicolor* laccase production using agricultural wastes: a comparative study in Erlenmeyer flasks, bioreactor and tray. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(3), 507–514. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02245-z>

- Plácido, J., & Capareda, S. (2015). Ligninolytic enzymes: A biotechnological alternative for bioethanol production. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-015-0049-5>
- Rancaño, G., Lorenzo, M., Molares, N., Couto, S. R., & Sanromán, M. Á. (2003). Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor. *Process Biochemistry*, 39(4), 467–473. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00083-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00083-9)
- Riedi, H. de P., de Liz, M. V., Braga, D. M., Ianoski, A. B., de Freitas Pereira, T., Brugnari, T., Haminiuk, C. W. I., & Maciel, G. M. (2022). Synthesis and Characterization of Laccase Enzyme Aggregates From *Trametes villosa* for Simultaneous Elimination of Rifampicin and Isoniazid. *International Journal of Environmental Research*, 16(3). <https://doi.org/10.1007/s41742-022-00403-y>
- Rodríguez Couto, S., Sanromán, M. A., Hofer, D., & Gübitz, G. M. (2004). Stainless steel sponge: A novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. *Bioresource Technology*, 95(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.05.002>
- Rodríguez Couto, S., Sanromán, M., & Gübitz, G. M. (2005). Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsuta*. *Chemosphere*, 58(4), 417–422. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.09.033>
- Rodríguez Couto, S., & Toca Herrera, J. L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, 24(5), 500–513. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.04.003>
- Rosales, E., Couto, S. R., & Sanromán, M. Á. (2005). Reutilisation of food processing wastes for production of relevant metabolites: Application to laccase production by *Trametes hirsuta*. *Journal of Food Engineering*, 66(4), 419–423. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.04.010>
- Rosales, E., Rodríguez Couto, S., & Sanromán, M. A. (2007). Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1286–1290. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.09.015>
- Schuler, M. L., & Kargi, F. (2002). *Bioprocess Engineering: Basic Concepts* (Cuarta). Pretince Hall.
- Singh Arora, D., & Kumar Sharma, R. (2010). Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(6), 1760–1788. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8676-y>
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S. P., Nevo, E., & Hadar, Y. (2007). Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(1–2), 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.11.024>

- Songulashvili, G., Flahaut, S., Demarez, M., Tricot, C., Bauvois, C., Debaste, F., & Penninckx, M. J. (2016). High yield production in seven days of *Coriolopsis gallica* 1184 laccase at 50 L scale; enzyme purification and molecular characterization. *Fungal Biology*, 120(4), 481–488. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.01.008>
- Songulashvili, G., Spindler, D., Jimenéz-Tobón, G. A., Jaspers, C., Kerns, G., & Penninckx, M. J. (2015). Production of a high level of laccase by submerged fermentation at 120-L scale of *Cerrena unicolor* C-139 grown on wheat bran. *Comptes Rendus - Biologies*, 338(2), 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2014.12.001>
- Sung, S. L., & Jong, K. H. (2003). Influences of Surfactant Tween 80 on the Gas Production, Cellulose Digestion and Enzyme Activities by Mixed Rumen Microorganisms. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16, 1151–1157. <https://doi.org/10.5713/ajas.2003.1151>
- Tavares, A. P. M., Coelho, M. A. Z., Agapito, M. S. M., Coutinho, J. A. P., & Xavier, A. A. M. R. B. (2006). Optimization and Modeling of Laccase Production 233 Optimization and Modeling of Laccase Production by *Trametes versicolor* in a Bioreactor Using Statistical Experimental Design. *Appl Biochem Biotechnol*, 134, 233–248. <https://doi.org/10.1385/ABAB:134:3:233>
- Tavares, A. P. M., Coelho, M. A. Z., Coutinho, J. A. P., & Xavier, A. M. R. B. (2005). Laccase improvement in submerged cultivation: Induced production and kinetic modelling. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(6), 669–676. <https://doi.org/10.1002/jctb.1246>
- Thiruchelvam, A. T., & Ramsay, J. A. (2007). Growth and laccase production kinetics of *Trametes versicolor* in a stirred tank reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(3), 547–554. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0695-9>
- UTFSM. (2020). *Método producción de caldo de Lacasa con extracto de tomate*. Universidad Técnica Federico Santa María (UTFSM)).
- Viswanath, B., Rajesh, B., Janardhan, A., Kumar, A. P., & Narasimha, G. (2014). Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme Research*, 2014(163242). <https://doi.org/10.1155/2014/163242>
- Wang, F., Guo, C., & Liu, C. Z. (2013). Immobilization of *Trametes versicolor* cultures for improving laccase production in bubble column reactor intensified by sonication. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(1), 141–150. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1214-x>
- Wang, H., Tang, L. X., Ye, Y. F., Ma, J. X., Li, X., Si, J., & Cui, B. K. (2024). Laccase immobilization and its degradation of emerging pollutants: A comprehensive review. *Journal of Environmental Management*, 359(120984). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120984>
- Weatherburn, M. W. (1954). Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia. In *Proc. Assoc. Clin. Biochem* (Vol. 36, Issue 2). <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>

- Weatherburn, M. W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination ammonia. *Analytical Chemistry*, 39(8), 971–974. <https://doi.org/10.1021/ac60252a045>
- Xavier, A. M. R. B., Tavares, A. P. M., Ferreira, R., & Amado, F. (2007). Trametes versicolor growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(3), 445–451. <https://doi.org/10.2225/vol10-issue3-fulltext-1>
- Yang, J., Li, W., Bun Ng, T., Deng, X., Lin, J., & Ye, X. (2017). Laccases: Production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00832>
- Youshuang, Z., Haibo, Z., Mingle, C., Zhenzhen, W., Feng, H., & Peiji, G. (2011). Production of a thermostable metal-tolerant laccase from Trametes versicolor and its application in dye decolorization. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(5), 1027–1035. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0129-0>

APÉNDICE

Apéndice A: Métodos analíticos reportados por la literatura

Estudios relacionados con la producción de la enzima Lacasa han reportado diversos métodos analíticos que permiten cuantificar la actividad enzimática, así como la concentración de fuentes de carbono y nitrógeno. En la Tabla 6 se detallan algunas de las técnicas utilizadas para medir la concentración de Lacasa, especificando reactivos utilizados, concentraciones y la unidad establecida en cada caso.

Lacasa

La actividad enzimática se puede medir espectrofotométricamente, analizando los cambios en la absorbancia de luz a una longitud de onda específica durante una reacción catalizada por la enzima. En esta reacción, la enzima oxida el sustrato, lo cual se detecta y mide cuantitativamente con el espectrofotómetro, registrando la absorbancia antes y después de la reacción. La diferencia de absorbancia es proporcional a la cantidad de sustrato oxidado y se cuantifica en unidades por litro (U/L).

Tabla 6. Descripción de distintos ensayos empleados para la medición de actividad de la Lac.

Descripción de la metodología	Unidad de Lacasa	Referencia
• Sustrato: 0,5 mL 2,6- dimetoxifenol (DMP), 10 mM. • Longitud de onda: 469 nm. • Coeficiente de extinción: $49,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. • Volumen total: 3 mL. • Enzima: 0,1 mL. • Buffer: 2,4 mL citrato-fosfato de sodio 0,1 M, pH 3,5. • Temperatura de reacción: 45°C.	La cantidad de enzima que oxida 1 mmol de DMP por minuto.	(Liu et al., 2013)
• Sustrato: ABTS, 1 mM. • Longitud de onda: 420 nm. • Coeficiente de extinción: $36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. • Buffer: Citrato-fosfato 0,1 M, pH 4,6. • Temperatura de reacción: 30°C.	La cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μM de sustrato por minuto.	(Gou et al., 2022)
• Sustrato: ABTS, 5 mM. • Longitud de onda: 420 nm. • Buffer: Acetato 1 M, pH 5,0. • Equipo: Espectrofotómetro UV-Vis.	Se define como 1 μmol de ABTS oxidado por minuto por mililitro.	(Atilano-Camino et al., 2020)

Tabla 6 (continuación)

Descripción de la metodología	Unidad de Lacasa	Referencia
- Sustrato: ABTS, 0,15 mL. - Longitud de onda: 420 nm - Coefficiente de extinción: $36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. - Buffer: 0,45 mL acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0. - Temperatura de reacción: 30°C. - Tiempo de reacción: 10 min.	La cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto.	(Colla et al., 2023)
- Sustrato: ABTS, 8,25 mg. - Longitud de onda: 436 nm. - Coefficiente de extinción: $29.300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. - Cultivo <i>L. edodes</i> o <i>C. puteana</i>: 15 μL - Enzima: 0,4 μL. - Buffer: 3 mL succinato 0,025 M, pH 4,5- - Temperatura de reacción: Ambiente. - Tiempo de reacción: 5 min.	La cantidad de enzima que oxidaba 1 mol de ABTS por minuto.	(Rosales et al., 2007)
- Sustrato: 2 mL ABTS, 1 mM. - Longitud de onda: 436 nm. - Volumen total: 100 μL. - Buffer: Acetato de sodio 20 mM, pH 3,5. - Medición de reacción: 0 y 10 min. - Temperatura de reacción: 25°C.	La cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 mol de ABTS por minuto.	(Hernández-Monjaraz et al., 2018)
- Sustrato: ABTS, 0,5 mM. - Longitud de onda: 420 nm. - Coefficiente de extinción: $36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. - Buffer: Acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0.	1 mol de ABTS oxidado por minuto.	(Bourbonnais et al., 1995)
- Sustrato: ABTS 1 mmol. - Longitud de onda: 420 nm. - Buffer: Acetato de sodio 20 mM, pH 4,5. - Temperatura de reacción: $30 \pm 1^\circ\text{C}$	La cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 mmol de ABTS por minuto.	(Songulashvili et al., 2015)
- Sustrato: ABTS, 1 mM. - Longitud de onda: 420 nm. - Coefficiente de extinción: $36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. - Volumen total: 2 mL. - Buffer: Acetato de sodio 20 mM, pH 4,8.	La cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto.	(Youshuang et al., 2011)

Tabla 6 (continuación)

Descripción de la metodología	Unidad de Lacasa	Referencia
- Sustrato: ABTS, 1 mM - Longitud de onda: 420 nm. - Coeficiente de extinción: $36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. - Buffer: Acetato de sodio 50 mL, pH 5,0. - Equipo: Espectrofotómetro UV-Vis Bel Photonics, UV-M51. - Tiempo de reacción: 5 min. - Temperatura de reacción: 40°C.	La cantidad de enzima necesaria para transformar 1 μmol de ABTS por minuto.	(Braga et al., 2024)
- Sustrato: 0,7 mL ABTS, 0,02 M. - Longitud de onda: 436 nm. - Coeficiente de extinción: $29.300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. - Enzima: 2,3 mL. - Buffer: Ácido succínico 0,025 M, pH 4,5. - Temperatura de reacción: Ambiente	La cantidad de enzima que oxida 1 mmol de ABTS por minuto.	(Couto et al., 2002)
- Sustrato: 1 mL guaiacol, 2 mM. - Longitud de onda: 450 nm. - Coeficiente de extinción: $0,674 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. - Enzima: 1 mL. - Buffer: 3 mL acetato de sodio, 10 mM - Equipo: Espectrofotómetro UV. - Tiempo de reacción: 15 min. - Temperatura de reacción: 30°C.	La cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 mol de guaiacol por minuto.	(Abd El Monssef et al., 2016)
- Sustrato: ABTS, 5 mM. - Longitud de onda: 415 nm. - Coeficiente de extinción: $36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. - Buffer: Acetato de sodio 0,2 M, pH 5,0.	La cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 mmol de ABTS.	(Hahn Schneider et al., 2019)

Durante un cultivo es necesario medir el consumo de las fuentes de carbono y nitrógeno que se produce durante la fermentación. Esto se lleva a cabo tomando muestras durante el cultivo y analizándolas para determinar la concentración respectiva.

Fuentes de carbono

Galhaup et al. (2002) determinaron la concentración de glucosa enzimáticamente utilizando el ensayo comercial Infinity Glucose Reagent, Sigma. Couto et al. (2002), Rosales et al. (2005) y Songulashvili et al. (2015) determinaron la concentración de azúcares reductores utilizando el método DNS, el cual se basa en la reacción redox entre el ácido 3,5-dinitrosalicílico y los azúcares reductores presentes para su determinación en espectrofotómetro, utilizando D-glucosa como

estándar para la curva de calibración. Por otro lado, Thiruchelvam & Ramsay (2007) reportaron que la concentración de glucosa se determina utilizando un método colorimétrico, con hidracida del ácido p-hidroxibenzoico en ácido clorhídrico. Método similar llevaron a cabo Li et al. (2017), ya que determinaron el contenido total de azúcar mezclando ácido sulfúrico concentrado y fenol al 5 % p/v. expresando el contenido de azúcares totales mg de glucosa/g de residuos lignocelulósicos secos.

Fuentes de nitrógeno

Reportes bibliográficos indican que un método utilizado para la determinación de la concentración de amoníaco es el de hipoclorito de fenol. Weatherburn (1954) estudiaron el efecto de las concentraciones de los reactivos en la reacción fenol-hipoclorito para la determinación de amoníaco, utilizando un espectrofotómetro con longitud de onda de 625 nm y empleando como reactivos fenol nitroprusiato y alcalino de hipoclorito. Asimismo, lo hicieron Thiruchelvam & Ramsay (2007), mezclando una muestra de fenol nitroprusiato y alcalino de hipoclorito que se dejó reaccionar durante 30 min, luego se ralentizó en un baño de agua fría y la absorbancia se midió a 630 nm, determinando la concentración de amonio a partir de una curva de calibración.

Apéndice B: Sólidos suspendidos totales

La concentración de sólidos suspendidos en una muestra (Ecuación 1) se obtiene a partir de la diferencia de masa antes y después del proceso de secado y considerando el volumen que se utilizó para el análisis.

$$SST = \frac{m_f - m_p}{V_m} \quad (1)$$

Donde:

- SST : Sólidos suspendidos totales, en g/mL.
- m_f : Masa de la muestra + el papel filtro luego de 24 h de secado, en g.
- m_p : Masa del papel filtro antes del secado, en g.
- V_m : Volumen de muestra que se desea analizar, en mL.

Para obtener el volumen de Fernsbach o pre-inóculo que se necesita para el preincubación de 31 mL de micelio, se realizó un análisis de sólidos, donde a partir de 150 mL de Fernsbach, se obtuvieron 20 mL de micelio en tubos Falcon centrifugados a 7.000 rpm durante 5 min (Figura 19), además, se realizaron mediciones de SST al Fernsbach de la fermentación 1 y 3, obteniendo valores de 5,36 y 3,42 g/L respectivamente. Estos datos permitieron predecir el volumen de micelio que se espera utilizar en la preincubación (Ecuación 2) y el volumen de Fernsbach necesario para obtener esa cantidad (Ecuación 3).

$$V'_{mic} = \frac{SST^{obj} \cdot V_{mic}}{SST^{act}} \quad (2)$$

Donde:

- V'_{mic} : Volumen de micelio requerido para realizar el pre-inóculo, en mL.
- SST^{obj} : Sólidos suspendidos objetivo que se desea replicar, en g/L.
- V_{mic} : Volumen de micelio obtenido a partir de la centrifugación del Fernsbatch, g/L.
- SST^{act} : Sólidos suspendidos del Fernsbatch que se utilizará para el pre-inóculo, en g/L.

$$V'_{ferns} = \frac{V'_{mic} \cdot V_{ferns}}{V_{mic}} \quad (3)$$

Donde:

- V'_{ferns} : Volumen de Fernsbatch requerido para realizar el pre-inóculo, en mL.
- V_{ferns} : Volumen de Fernsbatch que se utilizará para la centrifugación, en mL.

En este estudio se determinó que el volumen de micelio que permite obtener una actividad enzimática de Lacasa superior a las 1.000 U/L es 31 mL, por lo que, si se requiere replicar las condiciones del proceso, para obtener el volumen de Fernsbatch que se debe centrifugar, bastaría con realizar una prueba de cuánto volumen se obtiene a partir de 50 mL de Fernsbatch.



Figura 19. Tubos Falcon con Fernsbatch obtenidos después de la centrifugación.

Apéndice C: Cálculo de concentraciones a partir de la absorbancia

A partir de las absorbancias obtenidas de las técnicas analíticas, es posible obtener la concentración de los compuestos de interés en la muestra analizadas para la Lacasa (Ecuación 4), glucosa (Ecuación 5) y nitrógeno amoniacal (Ecuación 6).

Actividad enzimática

$$Lacasa = \frac{V_f}{V_0} \cdot \frac{\Delta Abs}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\epsilon_\lambda} \cdot 60 \cdot 10^6 \quad (4)$$

Donde:

- *Lacasa*: Actividad enzimática, en U/L.
- V_f/V_0 : Relación entre el volumen de análisis y el volumen extraído de la muestra para análisis respectivamente, adimensional.
- $\Delta Abs/\Delta t$: Variación registrada de absorbancia en el tiempo, adimensional.
- $\varepsilon_{436\text{ nm}}$: Coeficiente de extinción molar a una longitud de onda de 436 nm, en $M^{-1}cm^{-1}$.

Concentración de glucosa

$$Glucosa = \frac{FD \cdot Abs}{m_{cc}^{DNS}} \quad (5)$$

Donde:

- *Glucosa*: Concentración de azúcares reductores, en mg/L.
- *FD*: Factor de dilución de la muestra, adimensional.
- *Abs*: Absorbancia, adimensional.
- m_{cc}^{DNS} : Pendiente curva de calibración de glucosa, en L/mg.

Concentración de nitrógeno amoniacal

$$N - NH_4^+ = \frac{FD \cdot Abs}{m_{cc}^{N-NH_4^+}} \quad (6)$$

Donde:

- $N - NH_4^+$: Concentración de nitrógeno como amonio, en mg/L.
- $m_{cc}^{N-NH_4^+}$: Pendiente de curva de calibración de nitrógeno amoniacal, en L/mg.

Apéndice D: Curvas de calibración

Para obtener la concentración de nitrógeno amoniacal y glucosa en función del tiempo, es necesario elaborar curvas de calibración cada vez que se renuevan los reactivos necesarios para realizar las analíticas correspondientes. De esta manera, es posible correlacionar los valores de absorbancia medidos en espectrofotómetro con la pendiente de la recta de la curva de calibración.

Glucosa

Se realizaron tres curvas de calibración (Figuras 20 y 21) a partir de la solución estándar en concentraciones que van desde 0 a 1.000 mg/L en un volumen total 1 mL, obteniendo coeficientes de regresión lineal mayores a 0,980 en los tres casos.

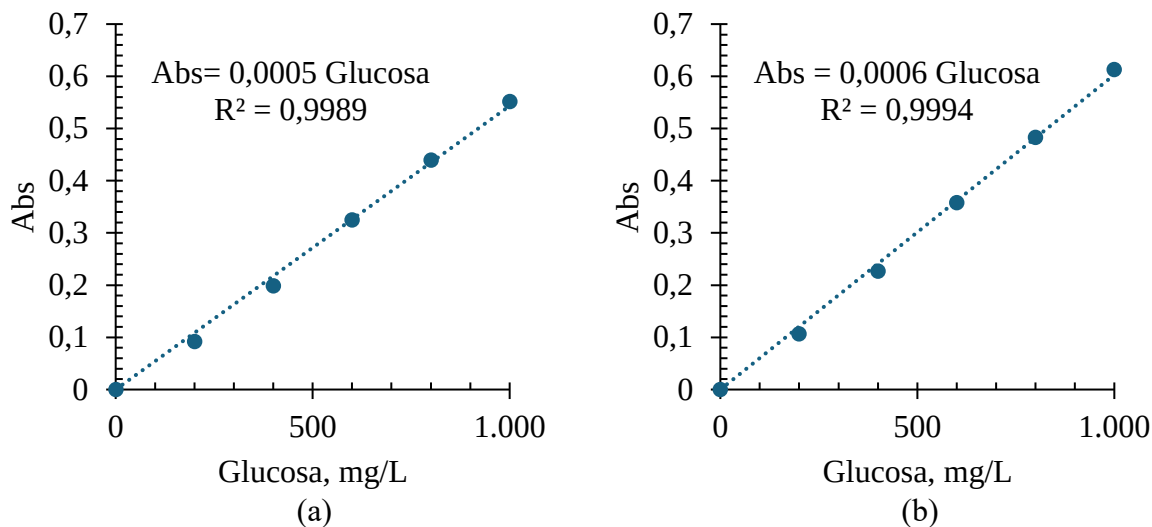


Figura 20. Curva de calibración para DNS. (a) Primera curva, (b) Segunda curva.

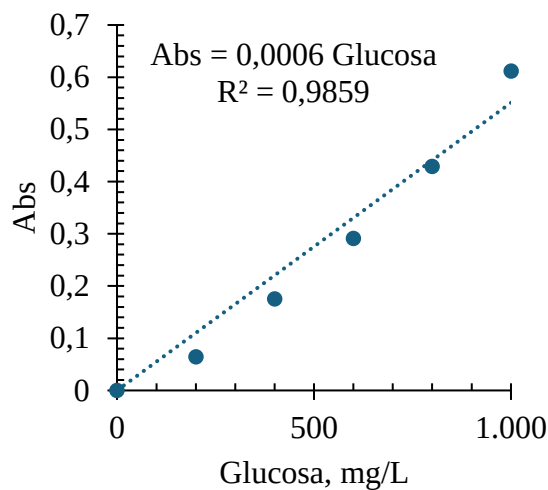


Figura 21. Tercera curva de calibración para DNS.

Nitrógeno amoniacal

Se realizaron cuatro curvas de calibración (Figuras 22 y 23) a partir de la solución de trabajo en concentraciones que van desde 0 a 1 mg/L en un volumen total de 2,5 mL, obteniendo coeficientes de regresión lineal mayores a 0,980 en todas las curvas.

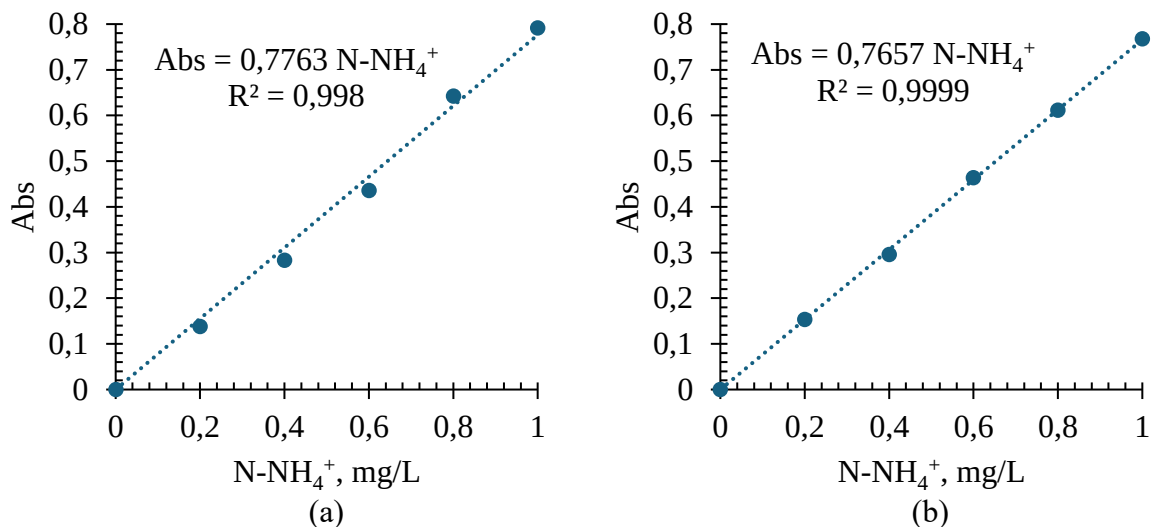


Figura 22. Curva de calibración de N-NH_4^+ . (a) Primera curva (b) Segunda curva.

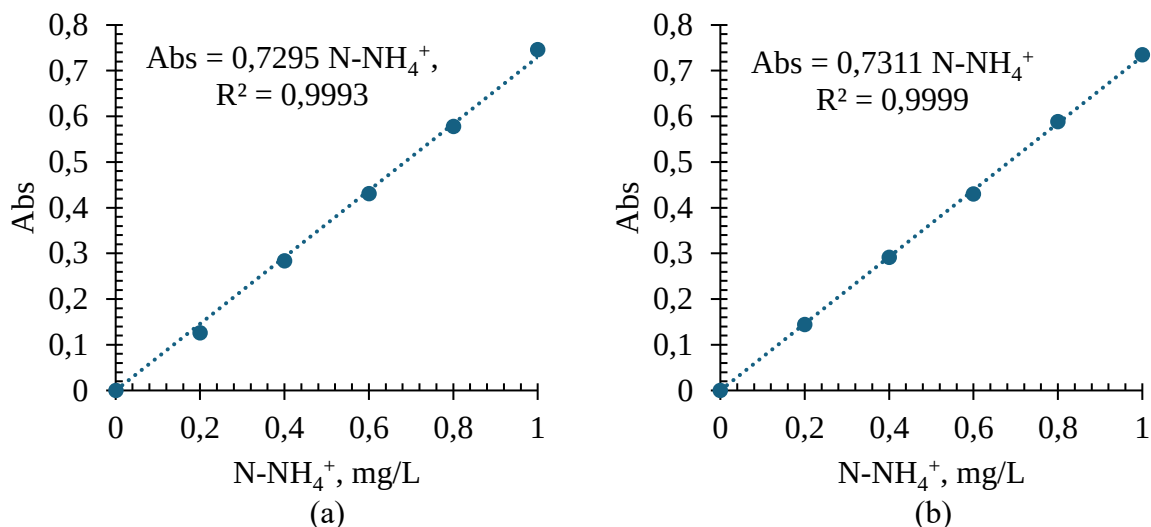


Figura 23. Curva de calibración de N-NH_4^+ . (a) Tercera curva, (b) Cuarta curva.

Apéndice E: Variables en el fermentador

La agitación y la aireación son variables manipuladas que se ajustan para garantizar que el porcentaje de OD se encuentre en el set point. En la Figura 24 se ilustran los gráficos de oxígeno disuelto y aireación obtenidos en una puesta en marcha con agua de 24 h del fermentador. Además, en las Figuras 25, 26 y 27 se encuentran gráficos de las mediciones de aireación para las fermentaciones 2, 3 y 4 respectivamente. Finalmente, en la Figura 28 representa la agitación en función del tiempo para la fermentación 4.

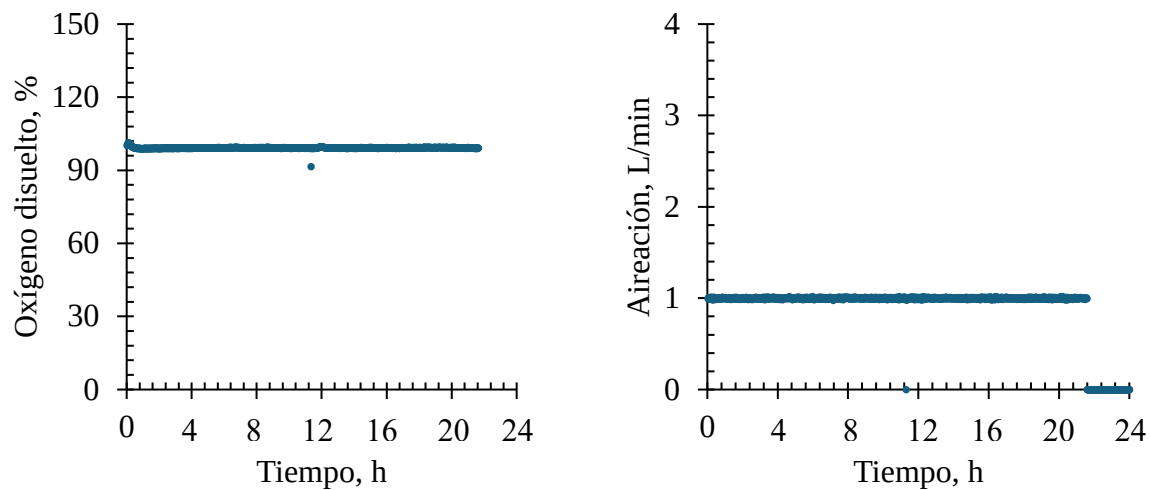


Figura 24. Prueba del fermentador con agua durante 24 h. (a) Porcentaje de oxígeno disuelto (b) Aireación.

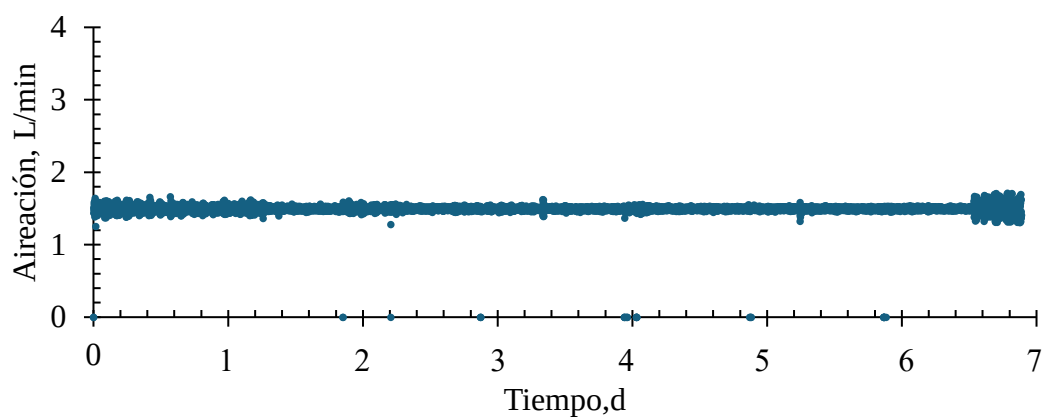


Figura 25. Aireación en función del tiempo para la fermentación 2.

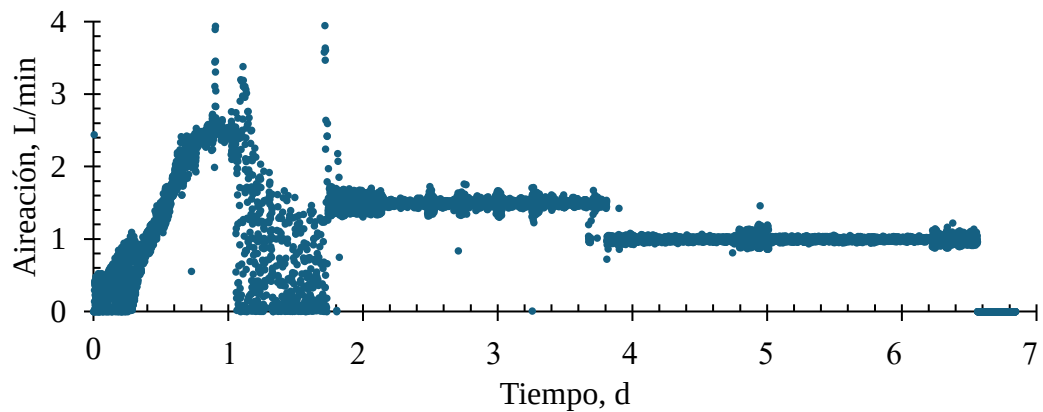


Figura 26. Aireación en función del tiempo para la fermentación 3.

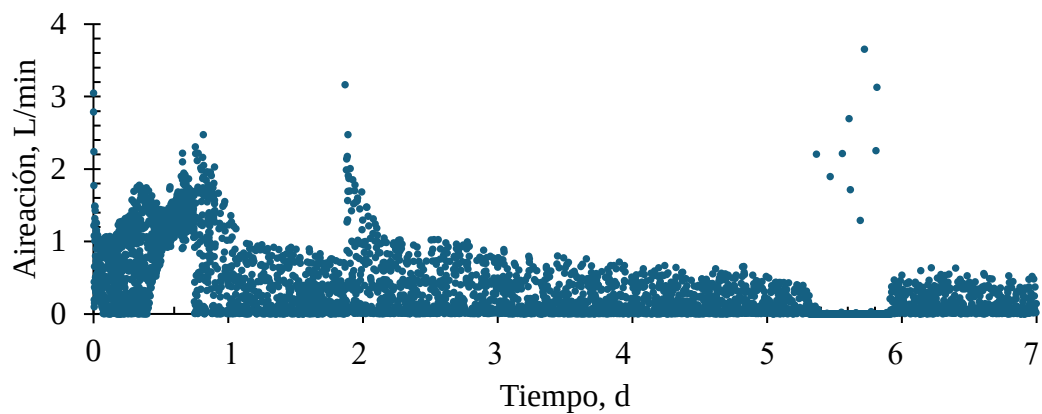


Figura 27. Aireación en función del tiempo para la fermentación 4.

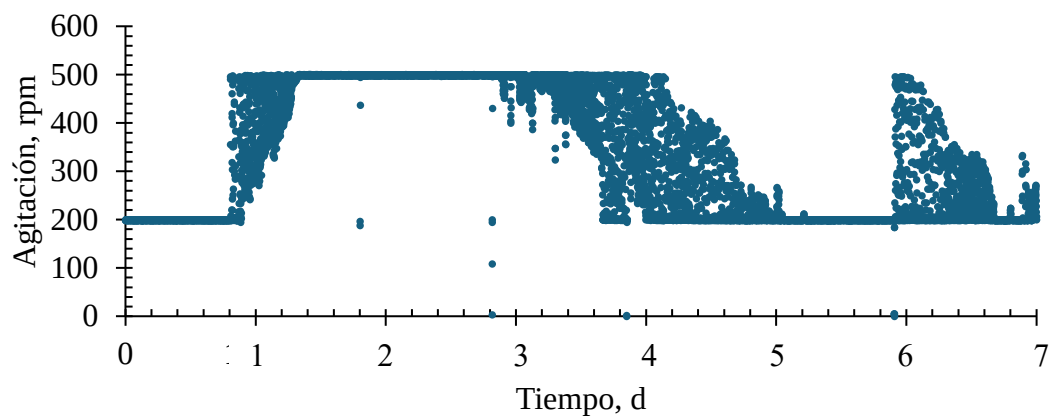


Figura 28. Agitación en función del tiempo para la fermentación 4.