

# Optimización de condiciones para la producción de lacasa por *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel y su aplicación en el biotratamiento de vinazas de caña de azúcar

Rosa Elena Caballero<sup>1</sup>, Víctor Jiménez<sup>1</sup>, Mónica Miranda<sup>1</sup>, Dalys Rovira<sup>1</sup>, Pedro González<sup>1</sup> & Juana Ramos-Chue de Pérez<sup>2</sup>

1 Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad Autónoma de Chiriquí, 0427, Chiriquí, Panamá.

2 Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad Tecnológica de Panamá, 0819-07289, El Dorado, Panamá.

## Resumen

Correspondencia

RE. Caballero

E-mail: [rosa.caballero@unachi.ac.pa](mailto:rosa.caballero@unachi.ac.pa)

**Recibido:** 14 octubre 2020

**Aceptado:** 18 diciembre 2020

**Publicado on-line:** 16 febrero 2021

Se optimizaron condiciones para la producción de lacasa por *Trametes villosa* mediante la metodología de superficie de respuesta: relación C:N, nivel de  $\text{Cu}^{+2}$  (mM) y tiempo de fermentación. El extracto crudo se inoculó en vinaza diluida al 25% y se evaluó el cambio en algunos parámetros de calidad de agua residual. La optimización produjo un aumento en la actividad de lacasa de 2,86 veces con respecto al medio no optimizado. Se observó reducción en los valores de DQO, fenoles y color en la vinaza tratada de 46,33%, 73,98% y 52,87% respectivamente. El pH aumentó de 6,50 a 6,57 y la actividad enzimática mostró un marcado aumento en medio con vinaza. Se confirma la utilidad de la metodología de superficie de respuesta en la optimización de condiciones en procesos de fermentación.

**Palabras clave:** Residuo; Carga orgánica; Diseño de Box-Behnken.

## Abstract

*Optimization of conditions for the production of laccase by Trametes villosa (Sw.) Kreisel and its application in the bio-treatment of sugar cane vinasse*

Selected conditions for laccase production by *Trametes villosa* were optimized by surface response methodology: C:N ratio,  $\text{Cu}^{+2}$  level (mM), and fermentation time. The crude extract was inoculated on 25% (v/v) diluted sugarcane vinasse and some residual water quality parameters were evaluated. A 2.86-fold increase in the enzymatic activity was obtained upon optimization. Reduction of COD, phenol and color values on the treated vinasse were 46.33%, 73.98% and 52.87% respectively. pH increased from 6.50 to 6.57 and laccase enzymatic activity in vinasse media increased considerably. The advantage of surface respond methodologies for optimization of fermentation conditions is confirmed.

**Key words:** Residue; Organic load; Box-Behnken design.



## Introducción

Las vinazas son el principal residuo del proceso de destilación para la obtención de bebidas alcohólicas. Existen distintos tipos de vinazas de acuerdo con su origen: vinazas de caña de azúcar, vinazas de remolacha, vinazas tequileras y mezcaleras (Moran-Salazar *et al.* 2016). Independientemente de su tipo, representan un problema de manejo agroindustrial por su carácter recalcitrante y por la elevada proporción en la que se producen (Tapie 2015, Morán-Salazar *et al.* 2016). Poseen una elevada carga orgánica, un pH muy ácido, elevada concentración de sólidos totales y color oscuro (Ahmed *et al.* 2013, Morán-Salazar *et al.* 2016). Si las vinazas no se manejan adecuadamente pueden afectar las aguas superficiales, subterráneas y el manto freático. La elevada carga orgánica causa eutrofización, aumento de temperatura y reducción del oxígeno disuelto (Cabrera-Díaz *et al.* 2014, Ferreira *et al.* 2013).

Según Rajasundari & Murugesan (2011) y Chanfón & Lorenzo (2014), el color oscuro se asocia a la presencia de varios compuestos entre ellos melanoidinas, fenoles, caramelos y derivados del furano. Las melanoidinas y los fenoles presentes en las vinazas pueden ser tóxicos para la microbiota en suelos y aguas; el color oscuro puede bloquear el paso de la luz en ríos y cursos de agua donde sean vertidas, afectando la fotosíntesis (Agarwal *et al.* 2010, Rajasundari & Murugesan 2011, Ferreira *et al.* 2013).

Una de las alternativas de biotratamiento y valorización de vinazas es la fermentación anaerobia para la producción de biogás (Christofolletti *et al.* 2013, Chanfón & Lorenzo 2014, Rodríguez & Hu 2017). La valorización de las vinazas se ha potenciado con tratamientos aerobios. Los procesos aerobios pueden utilizarse como pretratamiento o como postratamiento (Mikucka & Zielińska 2020). Algunas opciones de pretratamiento se fundamentan en el efecto negativo que tienen monómeros fenólicos presentes en la vinaza, sobre el crecimiento de los organismos metanogénicos (Kayembe *et al.* 2013). La coloración oscura permanece después de la fermentación anaerobia, por lo cual el postratamiento aerobio se dirige hacia la biodegradación de las melanoidinas. Lacina *et al.* (2003), Kharayat (2012) y Vilar *et al.* (2018) documentan el uso de hongos de pudrición blanca en el biotratamiento de vinazas en procesos aerobios simples o en procesos combina-

dos como alternativa de tratamiento.

Estos procesos son posibles gracias a los sistemas enzimáticos fúngicos extracelulares y no específicos, que biotransforman una variedad de compuestos recalcitrantes (Harms *et al.* 2011, Deshmukh *et al.* 2016, Ellouze & Sayadi 2016). También se aplican pretratamientos con enzimas extracelulares lignolíticas para potenciar la acción de celulasas sobre residuos sólidos como pajas o rastrojos (Wang Y. *et al.* 2018).

Las lacasas (EC 1.10.3.2, p-difenol:dioxígeno oxidorreductasas) constituyen uno de los sistemas enzimáticos, relacionados especialmente con la degradación aerobia de fenoles y la decoloración de residuos agroindustriales (Selvam *et al.* 2012, Bernats & Juhna 2015, Kumar & Thankaman 2016). Estas polifenoloxidasas contienen cobre y catalizan la formación de agua por reducción del oxígeno molecular y la oxidación de un electrón en el sustrato (Shraddha *et al.* 2011, Arregui *et al.* 2019).

En Panamá, el manejo de las vinazas de caña de azúcar representa un reto. Sin embargo, no se han explorado opciones de desarrollo tecnológico que apliquen las capacidades biotransformadoras de la biodiversidad fúngica nativa para el biotratamiento y valorización de vinazas. Dentro de esta biodiversidad se encuentra el hongo lignolítico *Trametes villosa* (Sw.) Kriese. El uso del género *Trametes* Fr. en experimentos a escala de laboratorio, para la bioprospección de actividades enzimáticas con fines de biorremediación ha sido reportado por distintos autores (Yamanaka *et al.* 2008, Selvam *et al.* 2012, España-Gamboa *et al.* 2016). Nuestro grupo de investigación cuenta con algunas cepas nativas, entre ellas la cepa *Trametes villosa* LG 72 en condiciones de conservación en cepario y cultivo *in vitro* en distintos medios, que ha sido evaluada en ensayos de adaptación en medios de cultivo con vinazas de caña de azúcar (Caballero *et al.* 2018).

Por lo anterior, el presente trabajo propuso el biotratamiento de vinazas con extractos crudos de la cepa LG 72, previa optimización de condiciones de cultivo para la producción de lacasa. La optimización se realizó mediante la metodología de análisis de superficie de respuesta (MSR), con la cual se puede determinar el efecto combinado de distintos factores que inciden en las variables dependientes (Jiménez-Careaga 2015, Warda *et al.* 2016). Por su parte, el biotratamiento de la vinaza se evaluó en función de algunos paráme-

tros de calidad de agua residual de acuerdo con el Reglamento Técnico DGNTI-COPANIT 35-2019 (Gaceta Oficial Digital 2019).

## Material y métodos

### Cepas

Se utilizó la cepa LG 72, *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel Polyporales, con generales de colecta e identificación descritas previamente (Caballero *et al.* 2018). Especímenes frescos se conservaron a 24 °C con iluminación y oscuridad alternada de 12 horas y transferencias periódicas cada 20 días en medio agar papa dextrosa y medio basal para basidiomicetos con agar al 2% (Gutiérrez *et al.* 2015). La composición del medio basal (g/L) fue: KCl 0,5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5, FeSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0,01 de cada uno), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0, tiamina 0,001, asparagina 2,0, Glucosa 10, en 1L de agua destilada. Paralelamente, la cepa se conservó en medios agar papa dextrosa y basal con vinaza diluida en agua desionizada al 25% v/v.

### Muestras de vinaza

La muestra de vinaza fue obtenida de la Central Industrial Chiricana S.A. Los recipientes plásticos con la vinaza se almacenaron a -5 °C. Para preparar los medios de conservación *in vitro* y los reactores, la vinaza fue tamponada a un pH de 6,5, se centrifugó a 5.000 rpm a temperatura ambiente y finalmente se diluyó al 25% v/v. En todos los casos se utilizó agua desionizada.

### Análisis de la vinaza

La muestra de vinaza fue analizada antes y después del biotratamiento de acuerdo con los procedimientos estándar (AOAC 2005, APHA-AWWA-WEF 2017) para los siguientes parámetros de calidad: pH, DQO y fenoles. La determinación del color y el cálculo del porcentaje de decoloración después del biotratamiento se realizaron de acuerdo con Pakshirajan & Radhika (2013) y Vilar *et al.* (2018), utilizando un espectrofotómetro *Thermo Scientific Biomate™ 6* y una longitud de onda de 420 nm. Las muestras se analizaron por triplicado.

### Condiciones de cultivo

El inóculo se preparó a partir de la cepa cultivada *in vitro* en medio basal, resuspendiendo el contenido de una placa Petri en sendos matraces de cul-

tivo celular de 250 mL que contenían 50 mL de medio basal sin agar, con pH ajustado a 6,5 y previamente esterilizado a 121 °C. Los matraces fueron cubiertos con tapones de espuma sintética esterilizados y se agitaron a 120 rpm y 33,6 °C, en períodos alternados de luz y oscuridad por 10 días. Estas condiciones se establecieron en experimentos realizados con anterioridad (De Gracia & Navarro 2013).

Los reactores se prepararon utilizando 50 mL de medio basal, en matraces de cultivo celular, con glucosa y cloruro de amonio como fuentes de carbono y de nitrógeno respectivamente. La relación C:N y el tiempo de fermentación se establecieron en los experimentos de optimización. La selección de estas fuentes se verificó en un estudio previo (Aparicio *et al.* 2013). El resto de las condiciones fueron idénticas a las utilizadas para la preparación del inóculo, del cual se adicionó 20 mL a cada matraz.

### Optimización de las condiciones para la producción de lacasa

Se empleó un diseño Box-Behnken para evaluar el efecto de tres factores (tiempo de fermentación, relación C:N y nivel de Cu<sup>+2</sup> mM). Se consideró el cobre divalente por su efecto estimulante sobre la producción de lacasa (Viswanath *et al.* 2014). Cada factor se representó en tres niveles como se muestra en la tabla 1. Las muestras se colectaron a los 10, 20 y 30 días. Los contenidos de los matraces se filtraron a través de papel Whatman 3 y se colocaron en tubos con tapa de rosca a temperatura de 7 °C.

Factor	Código	Unids.	Nivel		
			bajo (-1)	medio (0)	alto (+1)
Tiempo	A	Días	10	20	30
Relación C:N	B	-	10	20	30
Nivel de [Cu <sup>+2</sup> ]	C	mM	0	1	2

**Tabla 1.** Factores analizados mediante en experimentos de optimización y sus niveles.

**Table 1.** Levels of the studied factors in the optimization experiment.

El diseño, análisis estadístico y elaboración de los gráficos de superficie y de contorno se realizaron con el software Design Expert® v10.0.1.0 (Stat Ease Inc. USA). Se propuso un polinomio de segundo orden para explicar la producción de lacasa:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Donde  $Y$  es la actividad volumétrica,  $\beta_0$  corresponde al intercepto,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ ,  $\beta_{ij}$  corresponden a los coeficientes lineales, cuadráticos y de interacción respectivamente;  $X$  corresponde a los factores o variables independientes (Zhang *et al.* 2012, Si & Cui 2013).

### Análisis enzimático

Para la determinación de la actividad volumétrica de la lacasa (U/L), se utilizó como sustrato la siringaldazina (Madhavi & Lele 2009) según el método espectrofotométrico continuo reportado por Palmieri *et al.* (1998).

### Biotratamiento de la vinaza

Una vez que se establecieron las condiciones óptimas para la producción de lacasa y manteniendo el resto de las condiciones se prepararon reactores en matraces de cultivo celular de 250 mL por triplicado para la producción del extracto enzimático crudo. Al final del proceso los contenidos de los matraces se filtraron a través de papel Whatman 3 y se colocaron en tubos con tapa de rosca a temperatura de 7 °C. Se midió la actividad enzimática como validación de los resultados de optimización.

Empleando 50 mL de vinaza pretratada al 25 % v/v con pH ajustado a 6,5 en matraces de cultivo celular de 250 mL, se procedió a inocular 20 mL de extracto crudo manteniendo todas las condiciones establecidas. Las variables de respuesta para evaluar el biotratamiento fueron: decoloración (%), DQO (mg/L), pH y fenoles (mg/L). También se reporta la actividad volumétrica (U/L). Los ensayos se realizaron por triplicado en dos tiempos, al inicio y al final del proceso de fermentación establecido de acuerdo con el resultado del experimento de optimización.

## Resultados

### Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de lacasa

La tabla 2 muestra el plan de muestreo según el diseño de Box-Behnken. Se realizaron 13 experimentos aleatorizados en los que la variable de respuesta fue la actividad volumétrica (U/mL). El modelo cuadrático propuesto para explicar la producción de lacasa en función de los factores seleccionados fue optimizado mediante una transformación potencia. El análisis estadístico mostró al-

gunos factores no significativos ( $p > 0,05$ ) los cuales se eliminaron del modelo. El modelo reducido resultante se expresa en forma codificada de la siguiente manera:

$$Y^{0,05} = 1,14 + 0,025A + 0,013B - 0,096C + 0,12AC - 0,13A^2 - 0,090B^2$$

La tabla 2 muestra los resultados reales y de predicción a partir del modelo y la tabla 3 resume el análisis estadístico. Se observa en esta tabla que el efecto lineal de los factores tiempo de fermentación (A) y relación C:N (B) no fue significativo, sin embargo resultaron significativos sus efectos cuadráticos por lo cual se conservaron dentro del modelo. El tiempo tiene un efecto de interacción significativo con el factor nivel de  $Cu^{+2}$  (C). El nivel de  $Cu^{+2}$  tiene un efecto individual significativo sobre la actividad de lacasa.

Se obtuvo un  $R^2 = 0,953$  y un valor  $p < 0,05$  por lo cual el modelo cuadrático reducido con trans-

Ensayo	A: tiempo	B: C/N	C: $[Cu^{+2}]$	$Y^{0,05}$ (real)	$Y^{0,05}$ (predicción)
1	0	0	0	1,14	1,14
2	+1	+1	0	1,01	0,96
3	+1	0	-1	1,00	1,02
4	+1	-1	0	0,94	0,94
5	0	-1	-1	1,12	1,14
6	0	-1	+1	0,96	0,95
7	0	0	0	1,15	1,14
8	0	+1	-1	1,16	1,16
9	0	+1	+1	0,93	0,97
10	0	0	0	1,17	1,14
11	+1	0	+1	1,04	1,06
12	-1	-1	0	0,89	0,89
13	0	0	0	1,16	1,14

**Tabla 2.** Plan de muestreo y resultados según el diseño de Box-Behnken para la optimización de condiciones para la producción de lacasa.  $[Cu^{+2}] = \text{mM}$ ;  $Y = \text{actividad de lacasa (U/L)}$ .

**Table 2.** Box-Behnken design plan and results of the optimization of culture conditions for laccase production.  $[Cu^{+2}] = \text{mM}$ ;  $Y = \text{laccase activity (U/L)}$ .

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Modelo	6	0,120	0,020	20,54	0,0009
Residual	6	$5,820 \times 10^{-3}$	$9,699 \times 10^{-4}$		
Lack of fit	3	$5,184 \times 10^{-3}$	$1,728 \times 10^{-3}$	8,16	0,0592
Error	3	$6,354 \times 10^{-4}$	$2,118 \times 10^{-4}$		
Total corregido	12	0,130			

SD: 0,031;  $R^2 = 0,953$ ; Media: 1,05;  $R^2$  ajustado = 0,907; CV%: 2,96

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
A-días	1	$1,642 \times 10^{-3}$	$1,642 \times 10^{-3}$	1,69	0,2409
B-C:N	1	$1,056 \times 10^{-3}$	$1,056 \times 10^{-3}$	1,09	0,3369
C- $[Cu^{+2}]$	1	0,037	0,037	37,76	0,0009
AC	1	0,018	0,018	18,39	0,0052
A <sup>2</sup>	1	0,033	0,033	33,61	0,0012
B <sup>2</sup>	1	0,024	0,024	24,90	0,0025

**Tabla 3.** Análisis estadístico para el modelo cuadrático reducido/transformación potencia.

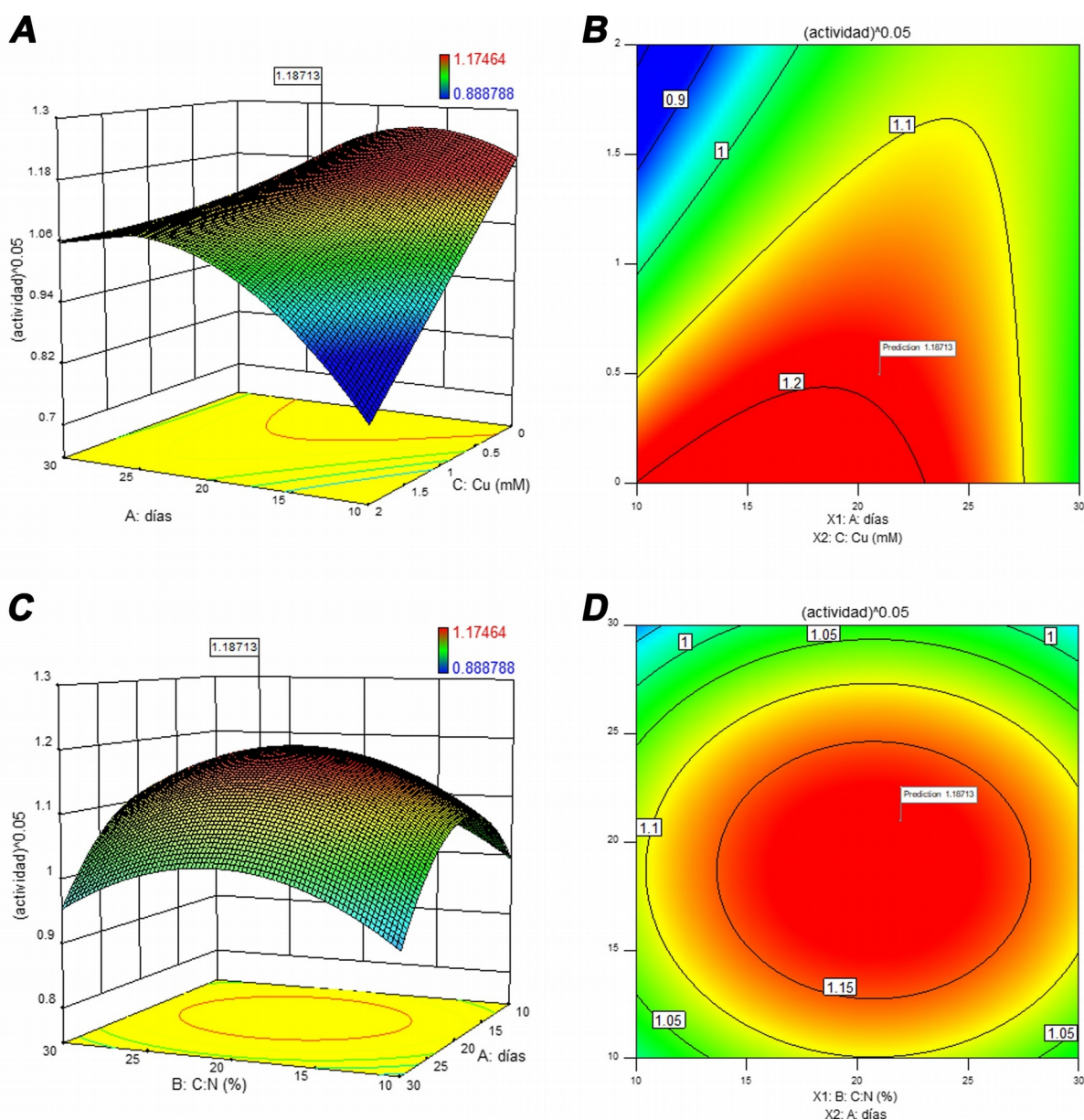
**Table 3.** Statistical analysis for the power transformed reduced quadratic model.

formación potencia resultó significativo y explicó en un 95,3% la variación observada. La falta de ajuste resultó no significativa ( $p > 0,05$ ) lo cual sugiere que el modelo fue adecuado para explicar la relación entre la variable de respuesta (actividad volumétrica de lacasa) y las variables independientes. Así mismo se observa que no hay otros factores que deban ser incluidos en el modelo matemático.

El coeficiente del factor codificado (C) tiene signo negativo; esto significa que la respuesta aumenta a medida el nivel de cobre disminuye. El

coeficiente del factor codificado (AC) es positivo y mayor en magnitud que el coeficiente del factor codificado (C); esto indica que el efecto de interacción entre el factor tiempo y el factor nivel de  $\text{Cu}^{+2}$ , tiene una mayor contribución sobre la variable de respuesta que el factor individual nivel de  $\text{Cu}^{+2}$ .

La figura 1 muestra los gráficos de superficie y de contorno (Figura 1A y 1B respectivamente) para la actividad volumétrica de la lacasa en función del factor tiempo y nivel de  $\text{Cu}^{+2}$ , manteniendo la tercera variable (C:N) fija en el nivel 0.



**Figura 1.** Gráfico de superficie (A) y de contorno (B) para la actividad volumétrica de la lacasa en función de los factores días y nivel de  $\text{Cu}^{+2}$  (mM), manteniendo el tercer factor (C:N) fijo en el nivel 0. Gráfico de superficie (C) y de contorno (D) para la actividad volumétrica de la lacasa en función de los factores días y relación C:N, manteniendo el factor nivel de  $\text{Cu}^{+2}$  (mM) en el nivel 0.

**Figure 1.** Surface (A) and contour (B) plots for the laccase volumetric activity as a function of time (days) and  $\text{Cu}^{+2}$  concentration (mM). The third factor (C:N) is fixed at zero level. Surface (C) and contour (D) plots for the laccase volumetric activity as a function of time (days) and C:N ratio. The third factor ( $\text{Cu}^{+2}$  concentration mM) is fixed at zero level.

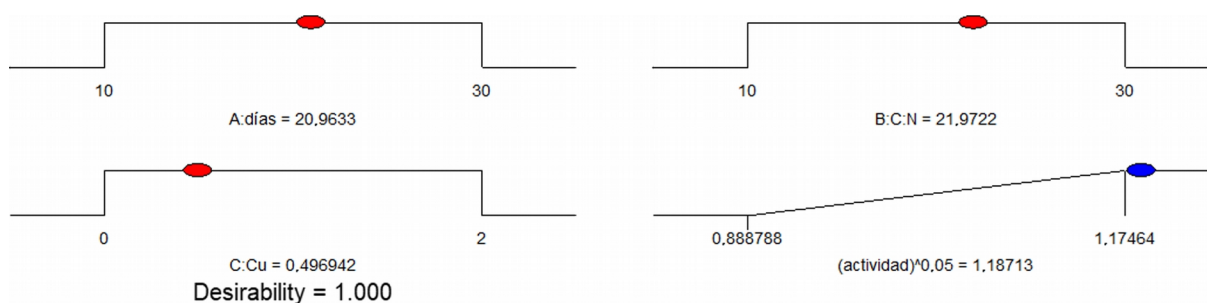
El efecto lineal del nivel de  $\text{Cu}^{+2}$  se observa en el gráfico de superficie (Fig. 1A). También es evidente a partir del gráfico de superficie, el efecto cuadrático negativo del factor tiempo. La forma elíptica del gráfico de contorno (Fig. 1B) ilustra la interacción significativa entre las variables. Se obtiene una mayor respuesta en una región alrededor del punto medio del rango de estudio establecido para el factor tiempo (alrededor de 20 días) y niveles de  $\text{Cu}^{+2}$  menores a 0,5 mM.

La figura 1 también muestra los gráficos de superficie y de contorno (Figs. 1C y 1D respectivamente) para la actividad volumétrica de la lacasa en función de los factores tiempo y relación C:N, manteniendo el nivel de  $\text{Cu}^{+2}$  en el nivel 0. La forma del gráfico (Fig. 1C) muestra el efecto cuadrático negativo de ambos factores el cual tiene una mayor contribución sobre la variable de respuesta que sus efectos individuales. El gráfico de contorno (Fig. 1D) muestra la ausencia de interacción entre estas variables. Se obtiene una mejor respuesta alrededor de los puntos medios de cada factor.

Las condiciones óptimas para la producción de lacasa obtenidas a partir del menú de optimización del software Design Expert® v 10.0.1.0 (Stat Ease Inc. USA) con un criterio de deseabilidad de 1,00 se observan en la figura 2. En estas condiciones se obtuvo un valor de predicción para la actividad volumétrica de 30.90 U/L.

### Biotratamiento de vinazas

La actividad volumétrica del extracto crudo obtenido, aplicando las condiciones establecidas por el modelo (nivel de cobre 0,49 mM, 20,96 días de fermentación y relación C:N de 21,97), manteniendo el resto de las condiciones fijas fue de 29,23 U/L, un valor cercano al valor obtenido con la predicción. En condiciones no optimizadas, aplicando la misma metodología de cultivo, la ac-



**Figura 2.** Condiciones óptimas para la producción de lacasa por *T. villosa* obtenidas con el modelo (Deseabilidad = 1,00).

**Figure 2.** Optimal conditions for laccase production by *T. villosa* predicted by the model (Desirability = 1.00).

Parámetro	$t_0$	$t_{20,96}$
pH	6,50	6,57
Actividad (U/mL)	0	243,29
DQO (mg/L)	25 814 ± 800	13 853 ± 533
Fenoles totales (mg/L)	56,93	14,81
% de decoloración	-	52,87

**Tabla 4.** Parámetros de calidad de agua residual y actividad de lacasa en el medio con vinaza:  $t_0$  antes del biotratamiento,  $t_{20,96}$  después del biotratamiento.

**Table 4.** Residual water quality parameters and laccase activity in vinasse media:  $t_0$  before biotreatment,  $t_{20,96}$  after biotreatment.

tividad volumétrica fue de 10,21 U/L (no se muestran datos).

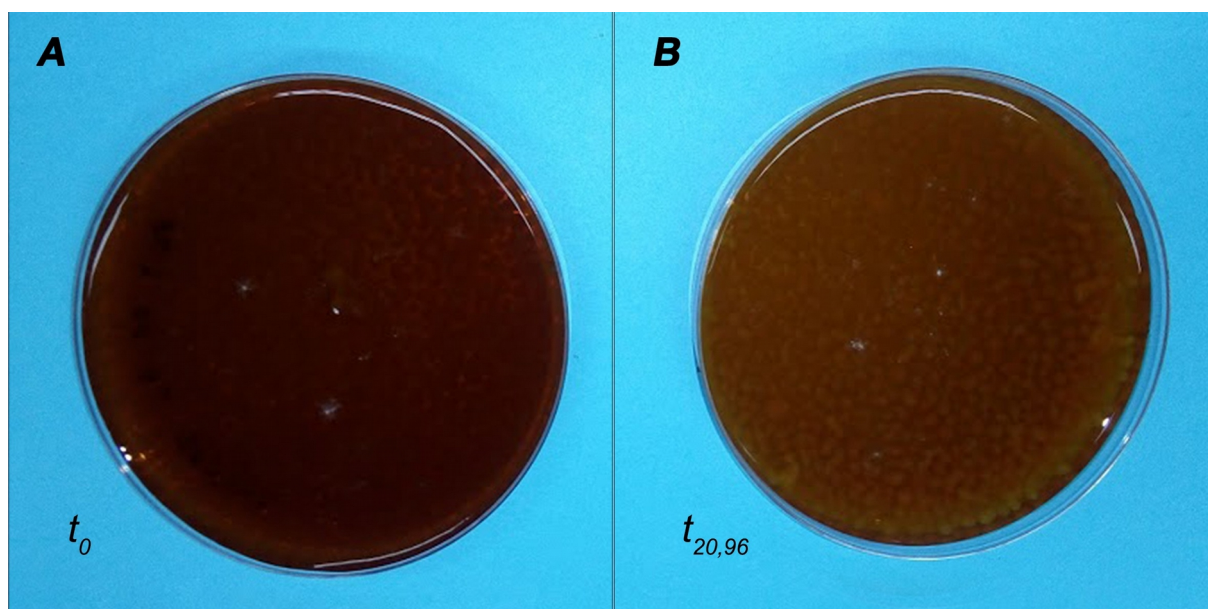
La tabla 4 resume el resultado del biotratamiento de la vinaza y de la actividad enzimática producida en el medio de fermentación tratado con el extracto crudo. El tiempo  $t_0$ , corresponde al contenido del reactor, es decir vinaza tamponada diluida al 25% en agua desionizada, luego de adicionar el extracto crudo.

La actividad de lacasa en el medio fue significativamente mayor en el medio con vinaza que en el medio basal ensayado en la optimización; este es un resultado esperado debido al efecto de la vinaza y sus componentes sobre la producción enzimática en el medio de reacción (Tapia-Tussell *et al.* 2015). El pH registró un aumento de 6,50 a 6,57, lo cual es deseable en términos de los valores de pH aceptados para muestras de agua residual de acuerdo con la normativa (Gaceta Oficial Digital 2019). Respecto a la carga orgánica se muestra un 46,33% de reducción del DQO. Los fenoles mostraron una reducción 73,98%, y la decoloración fue de 52,87%. En la figura 3 se muestra la diferencia de color del contenido de los reactores antes y después del biotratamiento.

### Discusión

Diversos estudios sobre producción de enzimas lignolíticas y capacidad de biodegradación de





**Figura 3.** Contenido de los reactores. **A:**  $t_0$  vinaza centrifugada y tamponada, diluida al 25% v/v con inóculo; **B:**  $t_{20,96}$  después de 20,96 días.

**Figure 3.** Reactors' contents. **A:**  $t_0$  buffered and centrifuged vinasse 25%v/v with inoculum; **B:**  $t_{20,96}$  after 20.96 days.

contaminantes por el género *Trametes* y otros hongos lignolíticos evidencian la importancia de la prospección de la actividad enzimática para el desarrollo de bioprocesos de micorremediación y valorización de residuos (Machado *et al.* 2005, Yamanaka *et al.* 2008, Selvam *et al.* 2012, Silva *et al.* 2014). La transición efectiva hacia mayores escalas de aplicación requiere de la información obtenida dentro de la escala de laboratorio. Para ello, los diseños de superficie de respuesta son una herramienta útil que permite analizar en paralelo las variables independientes que inciden en la producción enzimática, de biomasa o en el cambio de alguna característica del residuo, maximizando recursos económicos y el tiempo de los procesos (Zhang *et al.* 2012, Silva *et al.* 2014, Mohamad *et al.* 2015, Araújo *et al.* 2020).

El diseño de Box-Behnken aplicado a los datos de actividad enzimática permitió la optimización de las condiciones de cultivo estudiadas, la descripción de la relación entre las variables independientes y entre éstas y la variable de respuesta. Por otro lado, la validación del modelo produjo resultados muy cercanos a los valores de predicción. En condiciones no optimizadas se obtuvo una actividad volumétrica de 10,21 U/L por lo que los resultados de la optimización (29,23 U/L) representan un aumento en la producción de lacasa de 2,86 veces.

Las condiciones de cultivo son importantes para la producción de enzimas extracelulares. La producción de lacasa depende del pH, de la tem-

peratura, de la aireación, del tiempo de fermentación y de la composición del medio entre otros factores (Brijwani *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2012, Bertrand *et al.* 2013, Zhu *et al.* 2016). El tipo de fuente de carbono y de nitrógeno y la proporción óptima entre éstos ha sido estudiado en distintas especies (Wu *et al.* 2004, Asgher *et al.* 2012, Montoya & Levin 2015). Si bien es aceptado el hecho de que una proporción elevada de C:N favorece la producción de lacasa en distintos basidiomicetos, varios reportes evidencian el aumento en la producción de lacasa en medios en los que la concentración de nitrógeno no es limitante (Viswanath *et al.* 2014).

En este estudio, se optimizó la proporción C:N evaluando tres niveles: 10:1, 20:1 y 30:1. El nivel óptimo de 21,97:1 establecido en los experimentos de optimización coincide con estas observaciones.

La relación C:N no presentó interacciones significativas con las otras dos variables evaluadas. Su efecto cuadrático fue significativo y negativo (Tabla 3). La actividad enzimática aumenta a partir de 10:1, alcanza un valor máximo y desciende hacia relaciones C:N más altas (Figs. 1C, D).

El cobre divalente es un micronutriente esencial para distintos procesos celulares y su efecto inductor sobre la producción de lacasa ha sido estudiado en varias especies de hongos macroscópicos (Bertrand *et al.* 2013, Bettin *et al.* 2014, Wang Q. *et al.* 2018, Wehaidy *et al.* 2018). Se reporta además, que cantidades excesivas de cobre

divalente pueden resultar tóxicas para estos organismos (Wang Q. *et al.* 2018). La producción de lacasa en respuesta a la presencia de cobre (II) se relaciona con el rol de detoxificación de este complejo multienzimático extracelular (Bertrand *et al.* 2013) y se ha estudiado la inducción de ciertas isoenzimas (Piscitelli *et al.* 2011, Wang Q. *et al.* 2018). Elsayed *et al.* (2012) evaluaron el efecto de distintos niveles de cobre sobre la producción de lacasa por una cepa de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P.Kumm. cultivada en medio mínimo basal con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  y encontraron que la adición de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  aumenta la actividad volumétrica con respecto al medio mínimo basal. Wang Q. *et al.* (2018) evaluaron el efecto del cobre sobre la actividad de la lacasa producida por una cepa de *Trametes* sp. cultivado en caldo papa dextrosa, encontrando que la mejor concentración de cobre divalente fue 2,5 mM. Bakkiyaraj *et al.* (2013) reportan que para *Trametes hirsuta* (Wulfen) Lloyd cultivado en medio mínimo basal con 1 mM de  $\text{CuSO}_4$ , la suplementación con cantidades de hasta 1 mM producen un aumento en la producción de lacasa.

Algunos autores han encontrado que los efectos del cobre divalente no solamente dependen de la dosis sino del momento en el que se suplementa el medio de cultivo (Zhu *et al.* 2016). De acuerdo con el diseño aplicado en este trabajo, la única variable evaluada fue la dosis y la suplementación se adicionó al inicio de la fermentación.

En el presente estudio, el efecto individual del cobre fue significativo y negativo, lo cual indica que la actividad aumenta con la disminución de sus niveles. Este factor presentó una interacción significativa con el factor tiempo, el cual individualmente presentó un efecto cuadrático negativo. Para valores de cobre por debajo de 0.5 mM el factor días aumenta hasta un valor máximo para luego disminuir hacia el límite superior establecido para este factor. La actividad lacasa se expresa generalmente como parte del metabolismo secundario del hongo (Yang *et al.* 2017). El perfil de variación de lacasa en función del tiempo en general, muestra un incremento progresivo hasta la obtención de un valor máximo y esta actividad puede caer o bien no variar. La expresión de lacasa y sus isoenzimas está regulada de manera diferencial a través del proceso de fermentación, y responde a los factores discutidos previamente, entre ellos los niveles de iones como el  $\text{Cu}^{+2}$ . La interacción entre los días de cultivo y el contenido

de cobre se explican en términos del papel del cobre en la inducción de esta enzima así como en la estabilización estructural, lo cual también contribuye con la actividad enzimática (Yang *et al.* 2017).

La producción de lacasa fue mayor en medio con vinaza que en medio primario (Tabla 4). Este resultado es de esperarse ya que los fenoles presentes en la vinaza pueden actuar como inductores enzimáticos (Strong 2011). Los fenoles tienen una relación estructural con la lignina, el sustrato natural de estas enzimas, y juegan un papel importante en la producción de lacasa en hongos lignolíticos. Tapia-Tussell *et al.* (2015) realizaron un análisis del efecto inductor de distintos compuestos fenólicos en la transcripción de genes de lacasa en la cepa *Trametes hirsuta* Bm-2 y confirmaron que el efecto de inducción está relacionado con la estructura química del derivado fenólico. Diversos estudios evidencian la posibilidad de valorización de la vinaza mediante su utilización como medio principal o como suplemento en medios de fermentación para la producción lacasa a partir de cepas de hongos lignolíticos, lo cual a su vez genera opciones de biotratamiento de este residuo (Saglam *et al.* 2018). Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con estas evidencias.

El biotratamiento de la vinaza a una dilución del 25% presentó una disminución de la DQO, del contenido de fenoles y del color. Estos resultados coinciden con varios estudios de biotratamiento, en los que se reporta un mejoramiento en estos parámetros al final del período de fermentación cuando se utilizan hongos lignolíticos (España-Gamboa *et al.* 2015, Tapia-Tussell *et al.* 2015, Tapie 2015, Junior *et al.* 2020).

Puesto que la vinaza es un medio complejo, se debe profundizar en el diseño metodológico para el biotratamiento de vinazas con *T. villosa*. Tanto los factores fisicoquímicos como los factores bioquímicos asociados a la fermentación requieren ser ajustados para este medio. Este constituye un estudio preliminar, ya que se optimizaron las condiciones tomando como punto de partida el medio basal para basidiomicetos. Se recomienda la aplicación de un diseño de cribado para la selección de factores relevantes en presencia de vinaza como paso previo a la optimización; de esta manera se podrá conocer los factores que contribuyen significativamente con la producción enzimática en presencia de vinaza.



## Agradecimiento

Se agradece la colaboración de las siguientes personas: Dra. Tina Hofmann por su asesoría en el mantenimiento de la cepa; Dr. Esmir Camargo, Profesor Rafael Rincón y Profesor Javier Torres por el apoyo con infraestructura y equipo. Así mismo se agradece a la Central Industrial Chiricana S.A. por permitirnos el muestreo de la vinaza.

## Referencias

- Agarwal R, Lata S, Gupta M & Singh P. 2010. Removal of melanoidin present in distillery effluent as a major colorant: A review. *Journal of Environmental Biology* 31 (4): 521-528. Disponible en [http://www.jeb.co.in/journal\\_issues/201007\\_jul10/paper\\_22.pdf](http://www.jeb.co.in/journal_issues/201007_jul10/paper_22.pdf) (accedido el 15-XII-2019).
- Ahmed O, Sulieman AME & Elhardallou SB. 2013. Physicochemical, chemical, and microbiological characteristics of vinasse, a byproduct from ethanol industry. *American Journal of Biochemistry* 3(3): 80-83. <http://dx.doi.org/10.5923/j.ajb.20130303.03>
- Aragão M, Menezes DB, Ramos LC, Oliveira HS, Bhargava RN, Ferreira LFR, ...Silva DP. 2020. Mycoremediation of vinasse by surface response methodology and preliminary studies in air-lift bioreactors. *Chemosphere* 244 [9]. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125432>
- Arregui L, Ayala M, Gómez-Gil X, Gutiérrez-Soto G, Hernández-Luna CE, Herrera M, ...Valdés-Cruz N. 2019. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories* 18:(200) [33]. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>
- Asgher M, Jamil F & Iqbal HMN. 2012. Bioremediation Potential of Mixed White Rot Culture of *Pleurotus ostreatus* IBL-02 and *Coriolus versicolor* IBL-04 for Textile Industry Wastewater. *Journal of Bioremediation and Biodegradation* S1:007. <http://dx.doi.org/10.4172/21556199.S1-007>
- AOAC. 2005. *Official Methods of Analysis*. Washington D.C: Association of Official Analytical Chemists (AOAC).
- Aparicio M, De Gracia D, Navarro G, Vega K, González L, Hoffman T, ...Miranda M. 2013. Evaluación de la capacidad de crecimiento de cepas nativas de *Flaviporus* sp. y *Trametes villosa* en medios complejos preparados con vinazas de destilería. En *Memorias del III Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal (SOLABIAA)*, Panamá: Imprenta Universitaria de la Universidad Autónoma de Chiriquí. p. 134.
- APHA-AWWA-WEF. 2017. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23rd edition. Rice E, Baird R, Eaton A, Clescer L. (eds). Washington D.C: AWWA-APHA-WEF.
- Bakkiyaraj S, Aravindan R, Arrivukkarasan S & Viruthagiri T. 2013. Enhanced laccase production by *Trametes hirsuta* using wheat bran under submerged fermentation. *International Journal on Chem Tech Research* 5 (3): 1224-1238. Disponible en [http://sphinxσαι.com/2013/vol\\_5\\_3/pdf/CT=18\(1224-1238\)IPACT.pdf](http://sphinxσαι.com/2013/vol_5_3/pdf/CT=18(1224-1238)IPACT.pdf)(accedido el 18-XI2019).
- Bernats M & Juhna T. 2015. Factors governing degradation of phenol in pharmaceutical wastewater by white-rot fungi: a batch study. *The Open Biotechnology Journal* 9 (S1-M10): 93-99. <http://dx.doi.org/10.2174/1874070701509010093>
- Bertrand B, Martínez-Morales F & Trejo-Hernández MR. 2013. Fungal laccases: Induction and production. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12(3): 473-488. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62029966010> (accedido el 27-XI-2019).
- Bettin F, Montanari Q, Calloni R, Gaio TA, Silveira MM & Dillon AJP. 2014. Additive effects of CuSO<sub>4</sub> and aromatic compounds on laccase production by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 using sucrose as a carbon source. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 31(2): 335-346. <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20140312s00002241>
- Brijwani K, Huss A & Vadlani P. 2010. Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing. *Enzyme research*, volume 2010 [10]. <http://dx.doi.org/10.4061/2010/149748>
- Caballero RE, Miranda M, Jiménez V, González, P & Hofmann T. 2018. Evaluación del crecimiento micelial de *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel en medios suplementados con cobre (II) y vinaza de caña de azúcar. *Anales de Biología* 40:153-160. <http://dx.doi.org/10.6018/analesbio.40.17>
- Cabrera-Díaz A, Dueñas-Moreno J, Véliz-Lorenzo E, Díaz-Marrero MA, Menéndez-Gutiérrez CL, Oliva-Merencio D...Zaiat I. 2014. Tratamiento combinado de vinaza mediante digestión. *Conference Paper. XI Simposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia*. La Habana.
- Chanfón JM & Lorenzo Y. 2014. Alternativas de tratamiento de las vinazas de destilería. experiencias nacionales e internacionales. *Revista Centro Azúcar* 41(2): 56-67. Disponible en <http://centroazucar.uclv.edu.cu/media/articulos/PDF/2014/2/6.pdf> (accedido el 10-I-2020).
- Christofoletti C, Escher J, Correia J, Marinho, J & Fontanetti C. 2013. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste management* 33: 2752-2761. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09>
- De Gracia D & Navarro G. 2013. Efecto de las condiciones fisicoquímicas de cultivo sobre la actividad enzimática de la lacasa secretada por *Trametes villosa* cultivada en medios con vinazas. Chiriquí, Panamá: Universidad Autónoma de Chiriquí. Tesis de Licenciatura.
- Deshmukh R, Khardnavis AA & Purohit HJ. 2016. Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation. *Indian Journal of Microbiology* 56(3): 247-264. <https://dx.doi.org/10.1007/s12088-016-0584-6>
- Elouze M & Sayadi S. 2016. White-Rot Fungi and their Enzymes as a Biotechnological Tool for Xenobiotic Bioremediation. En *Management of Hazardous Wastes* (El-Din M & Saleh H, eds.). London: Intech Open Limited, pp. 103-120. <http://dx.doi.org/>

- 10.5772/64145
- Elsayed MA, Hassan MM, Elshafei AM, Haroun BM & Othman AM. 2012. Optimization of Cultural and Nutritional Parameters for the Production of Laccase by *Pleurotus ostreatus* ARC280. *British Biotechnology Journal* 2(3): 115-132. <http://dx.doi.org/10.9734/BBJ/2012/1305>
- España-Gamboa E, Vicent T, Font X, DomínguezMaldonado J, Canto-Canché B, & Alzate-Gaviria L. 2016. Pretreatment of vinasse from the sugar refinery industry under non-sterile conditions by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor and its effect when coupled to an UASB reactor. *Journal of Biological Engineering* 11(1): 1-11. <https://dx.doi.org/10.1186/s13036-016-0042-3>
- España-Gamboa E, Vicent T, Font X, MijangosCortés J, CantoCanché B & Alzate-Gaviria L. 2015. Phenol and color removal in hydrous ethanol vinasse in an airpulsed bioreactor using *Trametes versicolor*. *Journal of Biochemical Technology* 6(3): 982-986. Disponible en <https://jbiochemtech.com/en/article/phenol-andcolor-removal-in-hydrous-ethanol-vinasse-in-anair-pulsed-bioreactor-using-trametes-versicol> or (accedido el 15-I-2020).
- Ferreira LFR, Lopez AMQ, Monteiro RTR, Ruzne DS, Silva DP. 2013. Biodegradation of vinasse: fungal lignolytic enzymes and their application in the bioethanol industry. En *Fungal enzymes* (Polizeli MLTM & Rai M, eds.). Boca Raton Florida: CRC Press, pp. 65-93
- Gaceta Oficial Digital. 2019.. Descarga de Efluentes Líquidos a Cuerpos y Masas de Aguas Continentales y Marinas. Reglamento Técnico DGNTI-COPANIT 35-2019, Medio Ambiente, Protección de la Salud, Seguridad y Calidad del Agua. Disponible en [https://www.gacetaoficial.gob.pa/pdfTemp/28806\\_B/GacetaNo\\_28806b\\_20190628.pdf](https://www.gacetaoficial.gob.pa/pdfTemp/28806_B/GacetaNo_28806b_20190628.pdf) (accedido el 25-VIII-2019).
- Gutiérrez-Soto G, Medina-González GE, Treviño-Ramírez JE & Hernández-Luna CE. 2015. Native macrofungi that produce lignin-modifying enzymes, cellulases, and xylanases with potential biotechnological applications. *BioResources* 10: 6676-6689. <http://dx.doi.org/10.15376/biores.10.4.6676-6689>
- Harms H, Schlosser D & Wick LY. 2011. Untapped potential: Exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology* 9(3): 177-192. <https://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2519Har>
- Jiménez-Careaga MG. 2015. Superficies de Respuesta mediante un Diseño Central Compuesto. *Revista Varianza* 31. Disponible en [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S9876-67892015000100007&lng=es&nrm=iso](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S9876-67892015000100007&lng=es&nrm=iso) (accedido el 3-VII-2019).
- Junior JA, Vieira YA, Cruz IA, da Silva Vilar D, Aguiar MM, Torres NH, ...Ferreira LFR. 2020. Sequential degradation of raw vinasse by a laccase enzyme producing fungus *Pleurotus sajor-caju* and its ATPS purification. *Biotechnology. Reports*. 25: e0041 [8] <https://doi.org/10.1016/jbtre.2019.e00411>
- Kayembe K, Basosila L, Mpiana PT, Sikulisimwa PC, Mbuyu K. 2013. Inhibitory Effects of phenolic monomers on methanogenesis in anaerobic digestion. *British Microbiology Research Journal* 3(1): 32-41. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2013/2291>
- Kharayat Y. 2012. Distillery wastewater: bioremediation approaches. *Journal of Integrative Environmental Sciences* 9(2): 69-91. <https://dx.doi.org/10.1080/1943815X.2011.2.688056>
- Kumar NS & Thankamani V. 2016. Biodegradation of Distillery Melanoidins By a Novel Fungus in Optimized Medium. *International Journal of Scientific & Engineering Research* 7(8): 532-538. Disponible en <https://www.ijser.org/researchpaper/BIODEGRADATION-OF-DISTILLERY-MELANOIDINSBY-A-NOVEL-FUNGUS-IN-OPTIMIZEDMEDIUM.pdf> (accedido el 3-XII-2019).
- Lacina C, Germain G & Spiros A. 2003. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. *African Journal of Biotechnology* 2(12): 620-630. <https://dx.doi.org/10.5897/AJB2003.000-1116>
- Machado KMG, Matheus DR & Bononi VLR. (2005). Lignolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical Brazilian basidiomycetes fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(3): 246-252. <https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822005000300008>
- Madhavi V & Lele SS. 2009. Laccase properties and applications. *BioResources* 4(4): 1694-1717. Disponible en [https://bioresources.cnr.ncsu.edu/BioRes\\_04/BioRes\\_04\\_4\\_1694\\_Madhavi\\_Lele\\_Laccase\\_Properties\\_Applications\\_Review\\_567.pdf](https://bioresources.cnr.ncsu.edu/BioRes_04/BioRes_04_4_1694_Madhavi_Lele_Laccase_Properties_Applications_Review_567.pdf) (accedido el 17- VIII-2019).
- Mikucka W & Zielińska M. 2020. Distillery Stillage: Characteristics, Treatment, and Valorization. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 192: 770-793 <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03343-5>
- Mohamad SA, Awang MR, Rashid RA, Ling LS, Daud F, Hammid AA, ...Yusof WMW. 2015. Optimization of Mycelial Biomass Production in Submerged Culture Fermentation of *Pleurotus flabellatus* Using Response Surface Methodology. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 6: 419-426. <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2015.66041>
- Montoya S & Levin L. 2015. Production of lignocellulolytic enzymes from three white-rot fungi by solid-state fermentation and mathematical modeling. *African Journal of Biotechnology* 14: 1304-1317. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2014.14331>
- Moran-Salazar RG, Sanchez-Lizarraga AL, Rodriguez-Campos J, Davila-Vazquez G, MarinoMarmolejo EN, Dendooven L & Contreras-Ramos SM. 2016. Utilization of vinasses as soil amendment: consequences and perspectives. *Springer Plus* 5(1): [11] <https://dx.doi.org/10.1186/s40064-016-2410-3>
- Pakshirajan K & Radhika P. 2013. Enzymatic Decolourization of Textile Dyeing Wastewater by the White Rot Fungus *Phanerochaete Chrysosporium*. *Textiles and Light Industrial Science and Technology* 2(1): 42-48. Disponible en <https://archive.org/details/TLIST10022/mode/2up> (accedido el 12-VIII-2019).
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A & Sannia G. 1998. A Novel White Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 31301-31307. <https://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.50.31301>

- Piscitelli A, Giardina P, Lettera V, Pezzella C, Sannia G & Faraco V. 2011. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current genomics* 12(2): 104-112. <https://dx.doi.org/10.2174/138920211795564331>
- Rajasundari K & Murugesan R. 2011. Decolourization of Distillery Waste Water - Role of Microbes and Their Potential Oxidative Enzymes. *Journal of Applied, Environmental and Biological Sciences* 1(4) 54-68. Disponible en <http://www.textroad.com/JAEBS-Abril%202011.html> (accedido el 7-III-2020).
- Rodrigues CE & Hu B. 2017. Vinasse from Sugarcane Ethanol Production: Better Treatment or Better Utilization? *Frontiers in Energy Research*. 5:[7]. <https://dx.doi.org/10.3389/fenrg.2017.00007>
- Saglam N, Yesilada O, Saglam S, Apohan E, Sam M, & Ilk S, .....Ekrem G. 2018. Bioremediation Applications with Fungi. En *Mycoremediation and Environmental Sustainability* (Prasad R, ed.). Cham, Suiza: Springer, pp. 1-37. [https://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-77386-5\\_1](https://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-77386-5_1)
- Selvam K, Priya M, Yamuna M. 2012. Decolourization of azo dyes and dye industry effluents by lignin degrading fungus *Trametes versicolor*. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* 3(3): 666-672. Disponible en: <http://www.ijpba.info/ijpba/index.php/ijpba/article/view/696> (accedido el 6- XII-2019).
- Silva MLC, Souza,VB, Santos VS, Kamida HM, Vasconcelos-Neto JRT, Góes-Neto A & Koblitz MGB. 2014. Production of Manganese Peroxidase by *Trametes villosa* on Unexpensive Substrate and Its Application in the Removal of Lignin from Agricultural Wastes. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 5: 1067-1077. <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2014.514122>
- Shraddha, Shekher R, Sehgal S, Kamthania M & Kumar A. 2011. Laccase: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Research* 2011: 2011:[11] <http://dx.doi.org/10.4061/2011/217861>
- Si J & Cui B. 2013. Dye Congo Red adsorptive decolorization by adsorbents obtained from *Trametes pubescens* pellets. *Desalination and Water Treatment* 51: 7088-7100. <http://dx.doi.org/10.1080/19443994.2013.792445>
- Strong PJ. 2011. Improved laccase production by *Trametes pubescens* MB89 in distillery wastewaters. *Hindawi Volume* 2011: [8]. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/379176>
- Tapia-Tussell R, Pérez-Brito D, Torres-Calzada C, Cortés-Velázquez A, Alzate-Gaviria, L, Chablé-Villacís R & Solís-Pereira S. 2015. Laccase gene expression and vinasse biodegradation by *Trametes hirsuta* strain Bm-2. *Molecules* 20(8): 15147-15157. <https://dx.doi.org/10.3390/molecules200815147>
- Tapie WA. 2015. Evaluacion in vitro del tratamiento de la vinaza de caña de azucar con *Pleurotus ostreatus* en produccion animal. Palmira, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Tesis de maestría. Disponible en <http://www.bdigital.unal.edu.co/47980/> (accedido el 12-I-2020).
- Vilar DS, Carvalho GO, Pupo MMS, Aguiar MM, Torres NH, Américo JHP, Ferreira LFR. 2018. Vinasse de-gradation using *Pleurotus sajor-caju* in a combined biological-electrochemical oxidation treatment. *Separation and Purification Technology* 192: 287-296. <https://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2017.10.017>
- Viswanath B, Rajesh B, Janardham A, Praven A, & Narasimha T. 2014. Fungal laccases and their application in bioremediation. *Hindawi Publishing Corporation*, volume 2014: [21]. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/163242>
- Wang Q, Qian Y, Ma Y, Zhu C. 2018. A Preliminary Study on the Newly Isolated High Laccase-producing Fungi: Screening, Strain Characteristics and Induction of Laccase Production. *Open Life Sciences* 13: 463-469. <https://doi.org/10.1515/biol-2018-0055>
- Wang Y, Shao Y, Zou X, Yang M & Guo L. 2018. Synergistic action between extracellular products from white-rot fungus and cellulase significantly improves enzymatic hydrolysis. *Bioengineered* 9(1): 178-185. <https://dx.doi.org/10.1080/21655979.2017.1308991>
- Warda EA, Abeer AAEA, Eman RH, Mahmoud A. S & Ahmed IE-D. 2016. Applications of Plackett- Burman and Central Composite Design for the Optimization of Novel *Brevundimonas diminuta* KT277492 Chitinase Production, Investigation of its Antifungal Activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 59: [14]. <https://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2016160245>
- Wehaidy HR, El-Hennawi HM, Ahmed SA, AbdelNaby MA. 2018. Comparative study on crude and partially purified laccase from *Polyporus durus* ATCC 26726 in the decolorization of textile dyes and wastewater treatment. *Egyptian Pharmaceutical Journal* 17:94-103. [https://dx.doi.org/10.4103/epj.epj\\_2\\_18](https://dx.doi.org/10.4103/epj.epj_2_18)
- Wu J-Z, Cheung P, Wong Ka-H & Huang N. 2004. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuberregium* (Fr.) Singer. Part 2: Effect of carbonto-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. *Food Chemistry* 85: 101-105. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.06.009>
- Yamanaka R, Soares CF, Matheus DR & Machado KMG. 2008. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. *Brazilian Journal of Microbiology* 39(1): 78-84. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000100019>
- Yang J, Li W, Ng TB, Deng X, Lin J & Ye X. 2017. Laccases: Production, Expression Regulation, and Applications in Pharmaceutical Biodegradation. *Frontiers in microbiology* 8: 832. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00832>
- Zhang Y, Sun S, Hu K, & Lin X. 2012. Improving production of laccase from novel basidiomycete with response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*, 11(27): 7009-7015. <https://dx.doi.org/10.5897/AJB11.3615>
- Zhu C, Bao G & Huang S. 2016. Optimization of laccase production in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ACCC 52857) induced through yeast extract and copper. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 30: 270-276. <https://dx.doi.org/10.1080/13102818.2015.1135081>