

Exploración de las condiciones de cultivo del hongo *Ganoderma curtisii* para la producción de enzimas con actividad lignocelulósica

Exploring culture conditions of the fungus *Ganoderma curtisii* for the production of enzymes with lignocellulosic activity

Daniela Salas-Ciudad¹, Andrés Esquivel-Valerio², Catalina Rosales López³

Salas-Ciudad, D; Esquivel-Valerio, A; RosalesLópez, C. Exploración de las condiciones de cultivo del hongo *Ganoderma curtisii* para la producción de enzimas con actividad lignocelulósica. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 121-131.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7617>

1 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 daniela.salasciudad@gmail.com

 <https://orcid.org/0009-0009-9070-9737>

2 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 andesquivel13@estudiantec.cr

 <https://orcid.org/0000-0002-0095-6905>

3 Centro de investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 crosales@itcr.ac.cr

 <https://orcid.org/0000-0001-8336-0498>



Palabras clave

Degradación lignocelulósica; hongo de pudrición blanca; lacasa; manganeso peroxidasa.

Resumen

Ciertos hongos de pudrición blanca, como *Ganoderma* sp., son capaces de secretar ligninasas, tales como las manganeso peroxidases y las lacasas. Estas enzimas tienen un alto valor económico debido a su potencial para la degradación de residuos agroindustriales, tales como los residuos de la actividad piñera, los cuales tienen graves impactos negativos a nivel medioambiental en Costa Rica, y se ha resaltado la necesidad de integrar esos desechos a algún proceso para convertirlos en productos con mayor valor agregado. El objetivo de esta investigación consistió en determinar las condiciones óptimas de una fermentación en estado líquido para la producción de enzimas del hongo *Ganoderma curtsii*. con el potencial para la degradación lignocelulósica. Para obtener la mayor actividad enzimática se requirió el uso de un medio bajo en nutrientes, con un pH ácido, en ausencia de fibras de piña, y al menos 12 días de incubación. Los resultados mostraron que es posible el aprovechamiento de residuos agrícolas, específicamente enfocado en la integración de rastrojos de la actividad piñera en Costa Rica, a un proceso de economía circular.

Keywords

Laccase; lignocellulosic degradation; manganese peroxidase; white rot fungus.

Abstract

Certain white rot fungi, such as *Ganoderma* sp., are capable of secreting ligninases, such as manganese peroxidases and laccases. These enzymes have a high economic value due to their potential for the degradation of agroindustrial waste, such as waste from the pineapple activity, which has serious negative environmental impacts in Costa Rica, and the need to integrate these wastes into products with greater added value has been highlighted. The objective of this research was to determine the optimal conditions of a liquid fermentation for the production of enzymes from the fungus *Ganoderma curtsii* with the potential for lignocellulosic degradation. To obtain the greatest enzymatic activity, the use of a medium low in nutrients, with an acidic pH, in the absence of pineapple fibers, and at least 12 days of incubation was required. The results showed that it was possible to use agricultural waste, specifically focused on the integration of stubble from the pineapple activity in Costa Rica, into a circular economy process.

Introducción

Actualmente, la actividad piñera en Costa Rica tiene una alta importancia debido a su impacto económico, social y ambiental [1]. Dicha relevancia se refleja en el crecimiento acelerado de esta industria, impulsado por la venta internacional de piña, según datos de la Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (SEPSA) [2]. Sin embargo, la actividad piñera ha generado cuestionamientos sobre sus implicaciones negativas, específicamente a nivel ecológico y de salud pública [3], debido a los residuos lignocelulósicos que no han logrado ser integrados a algún proceso para convertirlos en productos con mayor valor agregado, como la alimentación animal o como abono [4] y que generan problemas de contaminación y proliferación de plagas [5].

La valorización de residuos agroindustriales se puede lograr a través de procesos biotecnológicos, particularmente mediante el uso de los residuos como sustrato [6]. Por ejemplo, se ha reportado el uso de hongos de pudrición blanca en residuos agroindustriales para la producción de enzimas [7]. Ciertos hongos de pudrición blanca, como *Ganoderma sp.*, son capaces de secretar ligninasas, enzimas con alto valor económico [8], como por ejemplo las manganeso peroxidasa y las lacasas [10], las cuales se podrían utilizar para el manejo de residuos de piña, entre otros residuos agroindustriales.

En esta investigación se buscó determinar las condiciones óptimas de una fermentación en estado líquido del hongo *Ganoderma curtisii* para la producción de enzimas con potencial lignocelulósico, con miras a la generación de alternativas para integrar los residuos de la actividad piñera en Costa Rica (rastros) a procesos de economía circular.

Materiales y métodos

Material vegetal. El proyecto se realizó en los laboratorios del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR). El hongo *Ganoderma curtisii* fue obtenido de la Colección de Hongos de la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica (accesión número CIIBI-007A; permiso de acceso a la biodiversidad CONAGEBIO N° R-CM-ITCR-002-2022).

Preparación de cultivo en placa de *G. curtisii*. El cultivo de *G. curtisii* en placa se realizó en medio agar papa-dextrosa (PDA) durante una semana a 30 °C [9].

Medios líquidos para el cultivo de *G. curtisii*. Se probaron dos medios de cultivo líquido a diferentes pH (pH 3.5 y pH 5.5), con el fin de determinar las condiciones óptimas para el cultivo del hongo y la producción enzimática: medio control reportado previamente [9] y un medio Sabouraud OXOID™ modificado para la producción enzimática (Cuadro 1). Además, ambos medios se probaron con 1 g de rastrojo de piña micronizada (3.35 mm, malla #6), como posible elicitador de actividad enzimática.

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo líquidos para el cultivo de *Ganoderma curtisii*.

Componente	Medio Control [9]	Medio Modificado
	Concentración	Concentración
Agua destilada	1 L	1 L
Glucosa	30 g/L	4 g/L
K ₂ HPO ₄	0.5 g/L	-
KH ₂ HPO ₄	0.5 g/L	-
Peptona	5 g/L	0.8 g/L
Extracto de levadura	5 g/L	0.8 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g/L	-
Tiamina	0.05 g/L	-
Aceite de oliva	4 mL	-
Caldo Sabouraud	-	1 g/L

Condiciones de crecimiento del hongo. En Erlenmeyers de 150 mL se montaron, por triplicado, cultivos con 75 mL medio (control y modificado) con tres gránulos de *G. curtisii* obtenido en placa y se incubaron a temperatura ambiente y agitación orbital a 100 rpm por 12 días. Se

probaron cuatro tratamientos en el medio control y cuatro tratamientos en el medio modificado, para evaluar los efectos del nivel de acidez (pH 3.5 y pH 5.5) y de la presencia y ausencia de fibra de piña micronizada (Cuadro 2) en la producción enzimática.

Cuadro 2. Nomenclatura asignada a los tratamientos empleados para el cultivo de *Ganoderma curtisii* con residuos del cultivo de piña.

Nomenclatura	Composición del medio de cultivo
1AX	Medio control con pH 3.5 sin fibra de piña
1BX	Medio control con pH 5.5 sin fibra de piña
1AC	Medio control con pH 3.5 con fibra de piña
1BC	Medio control con pH 5.5 con fibra de piña
2AX	Medio Sabouraud modificado con pH 3.5 sin fibra de piña
2BX	Medio Sabouraud modificado con pH 5.5 sin fibra de piña
2AC	Medio Sabouraud modificado con pH 3.5 con fibra de piña
2BC	Medio Sabouraud modificado con pH 5.5 con fibra de piña

Quantificación de actividad enzimática. Se evaluó la actividad enzimática de dos ligninasas, la manganeso peroxidasa (MnP) y la lacasa (Lac) en muestras de los medios de cultivo empleando la metodología descrita por Solano-Meza [10]. Se realizaron cuatro repeticiones en cada condición de cultivo. Cada cuatro días, durante 12 días se tomaron muestras de 1 mL de cada cultivo para su posterior análisis de cuantificación de actividad enzimática en espectrofotómetro.

La actividad enzimática de MnP se evaluó utilizando el método de oxidación de rojo fenol propuesto por Glenn y Gold [11]. La mezcla de reacción contenía lactato de sodio 25 mM, sulfato de manganeso 2 mM, albúmina de huevo al 0.1%, rojo fenol al 2%, amortiguador succinato-lactato (pH 4.5) 20 mM, y 150 µL de muestra de medio de cultivo. La reacción se inició con peróxido de hidrógeno (2 mM) y se detuvo a los 5 min con hidróxido de sodio (2 N), midiendo la absorbancia a 431 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. La actividad del MnP (UI) es la cantidad de enzima requerida para transformar 1 µmol de rojo fenol y es expresada como actividad específica volumétrica (UI/mL) en la fermentación líquida.

La actividad enzimática de Lac se basó en el método de oxidación del radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) descrito por More *et al.* [12]. La mezcla de reacción consistió en 5.0 mM de ABTS, 100 mM de amortiguador acetato de sodio a pH 4.5, y 150 µL de muestra de medio de cultivo. El cambio en la absorbancia se midió a 420 nm. Una unidad de actividad Lac (UI) es definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 µmol de ABTS y se reporta como actividad específica (U/mL) en la fermentación líquida.

Cinética enzimática de *G. curtisii* bajo las condiciones óptimas. Luego de determinar los tratamientos con las mejores condiciones para la actividad enzimática de MnP y Lac, se evaluó la cinética enzimática de *G. curtisii* en términos de MnP y Lac bajo estas condiciones. En Erlenmeyers de 250 mL se montaron seis réplicas, con 75 ml del medio optimizado, con tres gránulos de *G. curtisii* obtenido en medio semisólido, a temperatura ambiente, en agitador orbital a 100 rpm, durante 12 días. Cada tres días, se tomaron muestras de 1 mL de cada cultivo, para su posterior análisis de MnP y Lac como se indicó previamente.

Microscopía electrónica de barrido. En el Laboratorio Institucional de Microscopía (LIM) del ITCR se analizaron muestras de rastrojo de piña micronizado, incubado en las condiciones óptimas con extracto de *G. curtisii* por 12 días y 62 días. Se utilizó un microscopio electrónico

de barrido (Hitachi TM3000) siguiendo la metodología descrita por [13] para el análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés). Las muestras se fijaron al vacío por 30 min con fijador de Karnovsky, luego de 48 h se realizó un lavado con amortiguador Sorensen por 15 min, una post fijación con tetraóxido de osmio (concentración) por dos horas, y dos lavados con agua destilada, para su posterior deshidratación por 10 minutos utilizando etanol a diferentes concentraciones (30, 50, 70, 80, 90, 95, 100%) y por último, un secado de punto crítico con dióxido de carbono.

Análisis estadístico. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de tres vías utilizando GraphPad Prism v. 10.1.1. a los datos obtenidos en la optimización de producción enzimática, donde se analizaron los factores “tipo de medio de cultivo”, “presencia o ausencia de fibra de piña en el medio de cultivo” y el “tipo de enzima producida” bajo circunstancias de pH a 3.5 y a 5.5, a partir de los resultados del área bajo la curva (AUC) en la cinética enzimática. Adicionalmente, se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) por el método de Tukey para concluir estadísticamente bajo cuáles condiciones se obtuvieron los mejores resultados en obtención de producción enzimática, a través del software MINITAB versión 2018®.

Resultados y discusión

Se analizaron las condiciones óptimas para la actividad enzimática de MnP y Lac producidas por *G. curtsii*. En todos los casos, se obtuvo mayor actividad enzimática de MnP respecto a Lac (Figuras 1, 2 y 3). La mejor actividad enzimática de MnP se obtuvo en los medios Sabouraud modificados a pH 3.5 y pH 5.5 sin fibra de piña (Figura 3A, medios 2AX y 2BX), mientras que la actividad enzimática de Lac fue muy similar en todas las condiciones, con pocas diferencias significativas, aunque con resultados levemente mejores en los medios control a pH 3.5 y pH 5.5 con fibra de piña (Figura 3A, medios 1AC y 1BC).

Se obtuvo poca diferencia significativa entre pH 3.5 y pH 5.5 para la actividad MnP y ningún efecto significativo del pH en la actividad Lac (Figura 3, Cuadro 3). Esto concuerda con estudios previos, que han mostrado máxima actividad enzimática para las lacasas fúngicas en valores de pH entre 2.5 y 6.0 [14], [15], [16], [17] y con un pH óptimo alrededor de 3 [18], [19], y máxima actividad enzimática para las manganeso peroxidases en valores de pH entre 4 y 6 con un pH óptimo alrededor de 5 [20], [21].

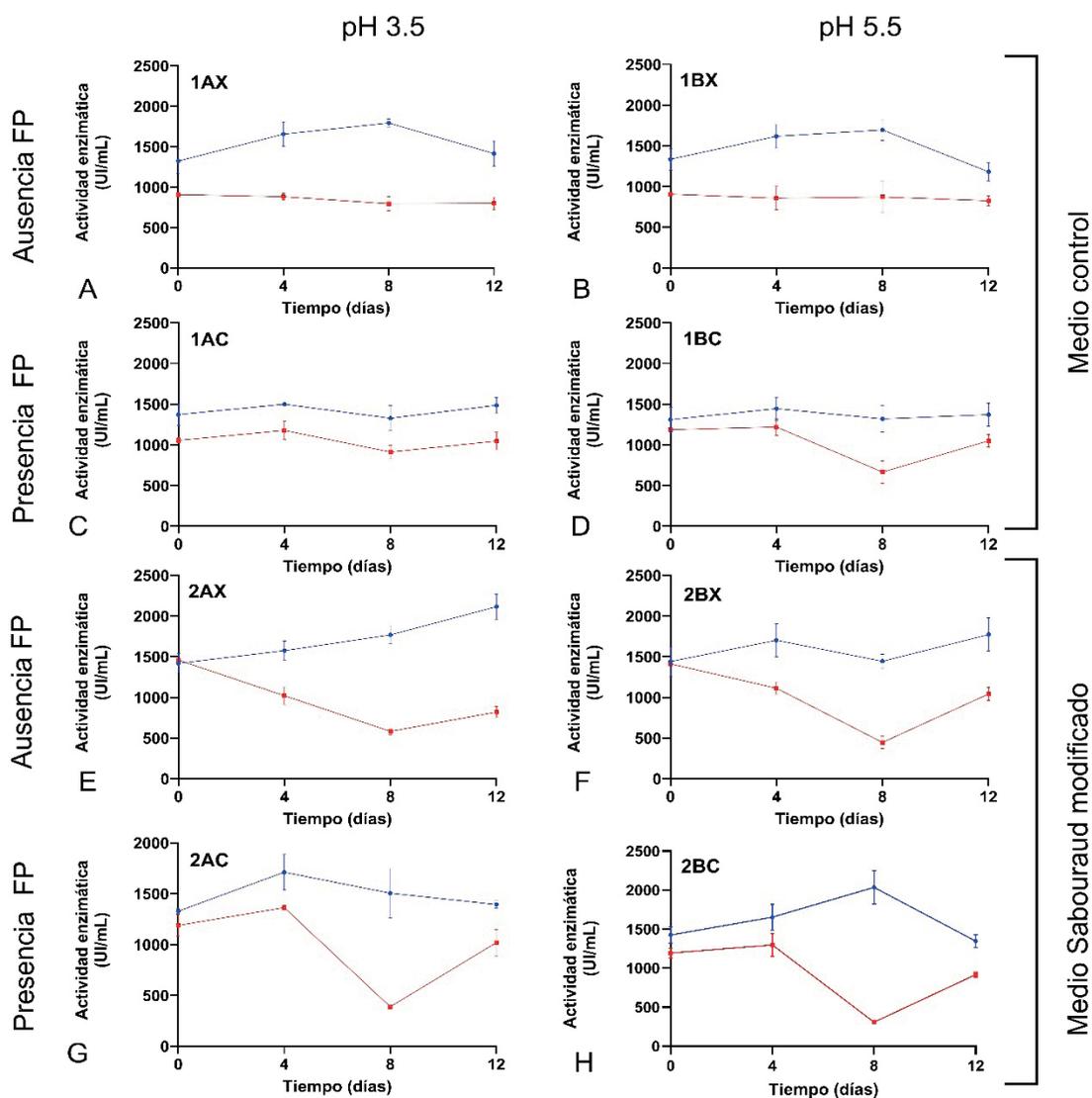


Figura 1. Cinética de las enzimas manganeso peroxidasa (MnP) (azul) y lacasa (Lac) (rojo) producidas por *G. curtsii* en dos medios de cultivo líquidos (medio control y medio Sabouraud modificado) a pH 3.5 y 5.5 cada uno, con y sin fibra de piña micronizada (FP), durante 12 días (promedio \pm desviación estándar, $n = 4$). A) 1AX B) 2AX C) 1BX D) 2BX E) 1AC F) 2AX G) 1BC H) 2BC. (GraphPad Prism v. 10.1.1., USA).

No hubo diferencia significativa en la actividad enzimática de MnP y Lac producidas por *G. curtsii* entre el medio de cultivo control y el medio Sabouraud modificado ($p > 0.05$) (Cuadro 3). Esto significa que el medio de cultivo por sí solo no influyó significativamente en la producción enzimática por parte del hongo, a pesar de que el medio control está más enriquecido con sales, vitaminas y nutrientes respecto al medio Sabouraud modificado, el cual tiene una composición más reducida en nutrientes (Cuadro 1).

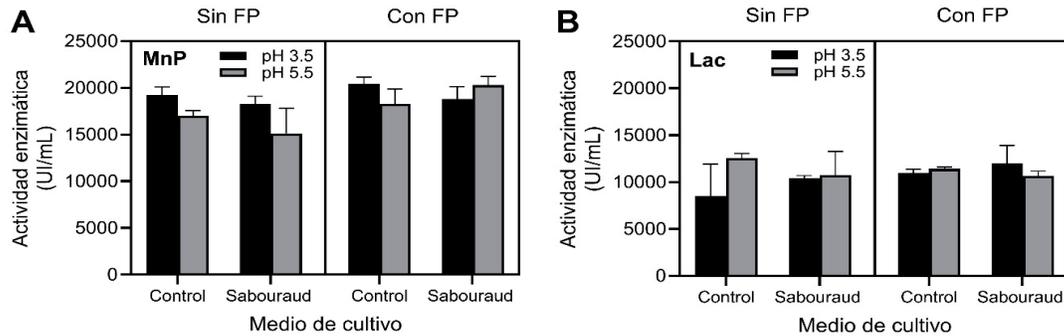


Figura 2. Área bajo la curva (promedio \pm desviación estándar, $n = 4$) de la actividad enzimática de manganeso peroxidasa (MnP; A) y lacasa (Lac; B) producidas por *G. curtisii* cultivado durante 12 días en medio control y medio Sabouraud modificado, con presencia y ausencia de fibra de piña (FP) micronizada, a pH de 3.5 y 5.5. (GraphPad Prism v. 10.1.1., USA).

Cuadro 3. Valor de significancia (p) del análisis de ANOVA de tres vías del área bajo la curva de la actividad enzimática de manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (Lac) producidas por *G. curtisii* cultivado durante 12 días en medio control y medio Sabouraud modificado, con presencia y ausencia de fibra de piña (FP) micronizada, a pH de 3.5 y 5.5.

Factores	Valor de p	
	MnP	Lac
Fibra de piña (presencia vs. ausencia)	0.0008	ns*
pH (3.5 vs. 5.5)	0.0085	ns*
Medio de cultivo (control vs. Sabouraud modificado)	ns*	ns*
Fibra de piña x pH x Medio de cultivo	0.0409	ns*

*ns = no significativo con $p > 0.05$ (GraphPad Prism v. 10.1.1., USA).

La fibra de piña micronizada se agregó al medio de cultivo como un posible inductor de la actividad enzimática. Investigaciones previas [22] han demostrado que es posible desencadenar la inducción de actividad ligninolítica con la presencia de altos niveles de lignina proveniente de sustratos lignocelulósicos naturales, ya que funcionan como un inductor natural y fuente de carbono para la producción enzimática. Otros autores han mostrado que al añadir rastros de piña se ofrece mayor disponibilidad de carbohidratos solubles, compuestos aromáticos y microelementos, que sirven como promotores de la producción de enzimas [23].

Sin embargo, la mejor fuente de carbono para Lac y MnP es la glucosa [24]. En otros hongos de pudrición blanca, un nivel alto de glucosa en el medio de cultivo reprimió la síntesis de estas dos enzimas, posiblemente por la represión de catabolitos de carbono, donde los hongos asimilan glucosa antes de cambiarse a fuentes de carbono menos favorables, reprimiendo los genes que codifican las enzimas lignocelulolíticas para utilizar fuentes secundarias de carbono como la lignocelulosa [25]. Esto coincide con los resultados obtenidos, donde la presencia de fibra de piña no tuvo efectos significativos en la actividad Lac, y la actividad de la MnP fue significativamente mejor en los medios sin fibra de piña (Cuadro 3, Figura 3).

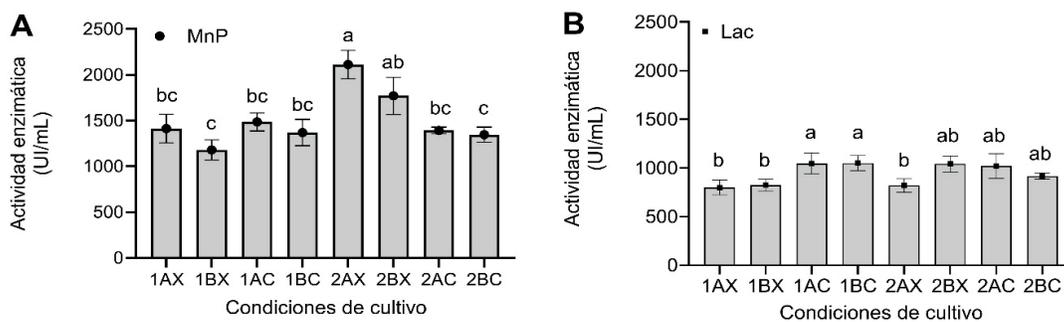


Figura 3. Actividad enzimática (promedio \pm desviación estándar, $n = 4$) de manganeso peroxidasa (MnP; A) y lacasa (Lac; B) producidas por *G. curtsii* a los 12 días de incubación en medio control y medio Sabouraud modificado, con presencia y ausencia de fibra de piña micronizada, a pH de 3.5 y 5.5. Letras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0.05$). (Análisis de varianza ANOVA con el método Tukey al 95% de confianza, MINITAB v. 2018; gráfico obtenido mediante GraphPad Prism v. 10.1.1., USA).

Para la elección del medio de cultivo optimizado, se eligió el medio 2AX (medio Sabouraud modificado, pH de 3.5 y sin fibra de piña). Se priorizó la actividad enzimática de MnP, ya que esta enzima se produjo en una cantidad considerablemente mayor que Lac. Además, la enzima MnP contribuye en gran manera a la obtención de biopulpa, que es de gran interés industrial para la elaboración de diversos productos [26], lo cual atribuye a su atractivo económico. Adicionalmente, la producción de ambas enzimas mostró una tendencia de aumento bajo este tratamiento (Figura 1). Además, el medio Sabouraud modificado presenta menos macro y micronutrientes que el medio control, abaratando los costos de eventuales fermentaciones (Cuadro 1).

Al evaluar la cinética de la actividad enzimática de *G. curtsii* en el tratamiento 2AX (medio Sabouraud modificado, pH 3.5 y sin fibra de piña) (Figura 4), la mayor actividad enzimática para MnP (1725 U/mL) se presentó a los 12 días, lo cual corresponde con lo reportado con otros autores [27], quienes indican que la actividad de MnP aumenta al llegar al 10 día y llega a su máximo en el día 15 al utilizar tres hongos de pudrición blanca en residuos lignocelulósicos. En el caso de la actividad enzimática de Lac de *G. curtsii*, se evidenció cómo desde el día 9 surge una tendencia a su disminución, lo cual coincide con otros estudios donde Lac llega a su máxima actividad (1059.2 U/L) en el día 10, después del cual empieza a reducirse [28].

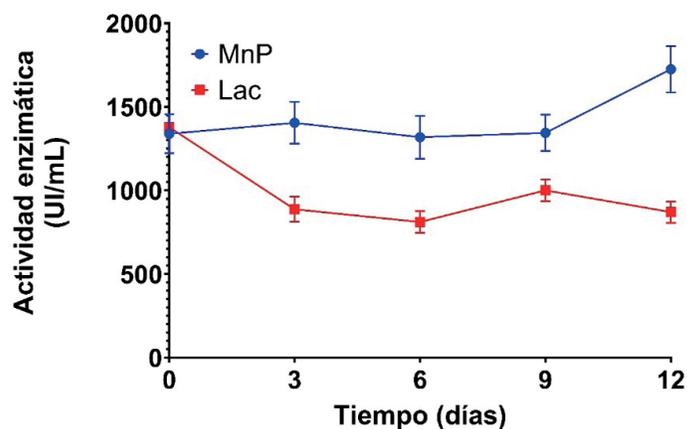


Figura 4. Cinética de las enzimas manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (Lac) de *Ganoderma curtsii* en medio Sabouraud modificado a pH 3.5 durante 12 días (promedio \pm desviación estándar, $n = 6$). (GraphPad Prism v. 10.1.1., USA).

Finalmente, mediante microscopía electrónica de barrido, se observó la ultraestructura de un rastrojo de piña micronizado sin ningún tratamiento (Figura 5A y 5B) y de un rastrojo de piña sometido a un tiempo de incubación de 12 (Figura 5C y 5D) y de 62 días (Figura 5E y 5F) en las condiciones optimizadas de cultivo para *Ganoderma curtsii*. En las muestras control, los rastrojos de piña muestran solamente los efectos del tratamiento mecánico (la molienda de los rastrojos), donde se visualizan fibras definidas y pequeños bloques de hojas. Tras solamente 12 días de degradación, es posible visualizar erosión en la pared celular de las fibras piña así como las esporas del hongo *Ganoderma curtsii* colonizando la lámina celular. Luego de dos meses, se observa cómo el tejido vegetal ha sido colonizado por micelio de *Ganoderma curtsii*, el cual es posible reconocer por sus esporas de forma ovalada y su tamaño [29]. En un estudio similar de degradación por hongos de pudrición blanca en palma aceitera, estos cambios sugieren una modificación de la lignina [30]. Las cavidades microscópicas formadas dentro de los tejidos (Figura 5E) y la migración de las hifas fúngicas son signos de una avanzada degradación en tejidos vegetales [31].

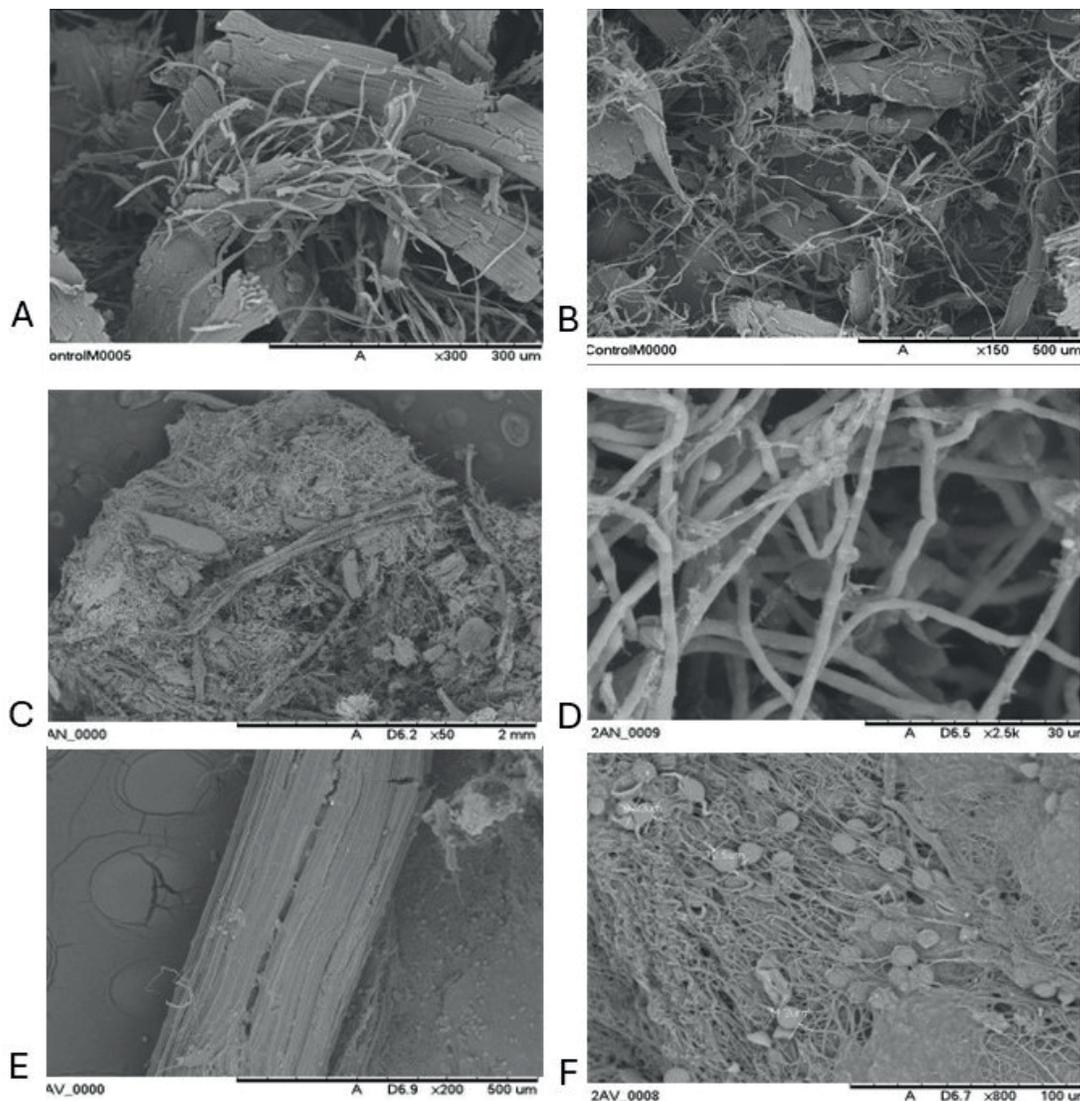


Figura 5. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de rastrojos de piña micronizada sin tratamiento (A y B), e incubada por 12 días (C y D) o 2 meses (E y F) con el hongo *Ganoderma curtsii* cultivado en medio líquido Sabouraud modificado a pH 3.5.

Conclusiones

Las condiciones óptimas para la producción enzimática de MnP de *G. curtsii* fueron las obtenidas a pH 3.5 en un medio Sabouraud modificado bajo en nutrientes durante un período de 12 días. La adición de fibras de piña no mejoró la producción de ninguna de las enzimas de interés (MnP y Lac); sin embargo, se verificó la capacidad de ambas enzimas para degradar rastrojos de piña. En experimentos futuros, se recomienda utilizar medios de cultivo con mínima o nula fuente de carbono en la forma de glucosa, lo cual podría mejorar la producción de estas enzimas.

Agradecimientos

Los resultados de este proyecto corresponden a un proyecto de investigación estudiantil financiado por la Vicerrectoría de Investigación del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Referencias

- [1] A. Obando Campos, "Acciones y omisiones del Estado costarricense en la expansión piñera: El caso de la Zona Norte-Norte de Costa Rica," *Anuario Centro de Investigación y Estudios Políticos*, no. 11, pp. 22–55, Nov. 2020, doi: 10.15517/aciep.v0i11.42226.
- [2] Ingrid Badilla Fallas, Eugenia Mora Monge, Ghiselle Rodríguez Muñoz, and Miriam Valverde Díaz, "Informe de gestión del Sector Agropecuario, Pesquero y Rural (Mayo 2019 - Abril 2020)," San José, Costa Rica, 2020. Accessed: Aug. 07, 2024. [Online]. Available: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/D10-11111.pdf>
- [3] Katzy O`neal Coto, "UCR investiga y aporta soluciones a polémico cultivo en Costa Rica," *Universidad de Costa Rica*, 2018. Accessed: Aug. 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.ucr.ac.cr/noticias/2018/06/21/ucr-investiga-y-aporta-soluciones-a-polemico-cultivo-en-costa-rica.html>
- [4] R. Gómez-García, M. A. Medina-Morales, R. Rodríguez, B. Farruggia, G. Picó, and C. N. Aguilar, "Production of a xylanase by *Trichoderma harzianum* (*Hypocrea lixii*) in solid-state fermentation and its recovery by an aqueous two-phase system," *Canadian Journal of Biotechnology*, vol. 2, no. 2, pp. 108–115, Sep. 2018, doi: 10.24870/cjb.2018-000122.
- [5] Rodolfo A. Hernández-Chaverri and Lilia Arely Prado Barragán, "Impacto y oportunidades de biorrefinería de los desechos agrícolas del cultivo de piña (*Ananas comosus*) en Costa Rica," *Cuadros de Investigación UNED*, vol. 10, no. 2, pp. 455–468, 2018, doi: 10.22458/urj.v10i2.2059.
- [6] J. Kumla *et al.*, "Cultivation of mushrooms and their lignocellulolytic enzyme production through the utilization of agro-industrial waste," Jun. 01, 2020, *MDPI AG*. doi: 10.3390/molecules25122811.
- [7] G. Šelo, M. Planinić, M. Tišma, S. Tomas, D. Kočeva Komlenić, and A. Bucić-Kojić, "A comprehensive review on valorization of agro-food industrial residues by solid-state fermentation," May 01, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/foods10050927.
- [8] A. Zerva, N. Tsafantakis, and E. Topakas, "Evaluation of basidiomycetes wild strains grown in agro-industrial residues for their anti-tyrosinase and antioxidant potential and for the production of biocatalysts," *Fermentation*, vol. 7, no. 1, 2021, doi: 10.3390/fermentation7010019.
- [9] C. Rosales-López, A. Vargas-López, M. Monge-Artavia, and M. Rojas-Chaves, "Evaluation of Conditions to Improve Biomass Production by Submerged Culture of *Ganoderma* sp.," *Microorganisms*, vol. 10, no. 7, Jul. 2022, doi: 10.3390/microorganisms10071404.
- [10] A. V. Solano-Meza, "Efecto de los cultivos fúngicos de *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum* en la obtención de celulosa a partir de hojas de piña," Tesis de grado, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2021.
- [11] J. K. Glenn and M. H. Gold, "Decolorization of Several Polymeric Dyes by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*," *Appl Environ Microbiol*, vol. 45, no. 6, pp. 1741–1747, 1983.
- [12] S. S. More, P. S. Renuka, K. Pruthvi, M. Swetha, S. Malini, and S. M. Veena, "Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp.," *Enzyme Res*, vol. 2011, no. 1, 2011, doi: 10.4061/2011/248735.
- [13] I. Vargas-Venegas, A. Medaglia-Mata, and L. Chavarría-Pizarro, "Desarrollo de un protocolo para producir quitosano a partir de la exuvia larval de *Tenebrio molitor*," *Tecnología en Marcha*, vol. 37, pp. 3–16, 2024, doi: 10.18845/tm.v37i2.6724.

- [14] J. Jordaan and W. D. Leukes, "Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungus," *Enzyme Microb Technol*, vol. 33, no. 2–3, pp. 212–219, Aug. 2003, doi: 10.1016/S0141-0229(03)00116-9.
- [15] L. Q. Guo, S. X. Lin, X. B. Zheng, Z. R. Huang, and J. F. Lin, "Production, purification and characterization of a thermostable laccase from a tropical white-rot fungus," *World J Microbiol Biotechnol*, vol. 27, no. 3, pp. 731–735, Mar. 2011, doi: 10.1007/s11274-010-0502-8.
- [16] C. Galhaup, S. Goller, C. K. Peterbauer, J. Strauss, and D. Haltrich, "Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions," *Microbiology (N Y)*, vol. 148, pp. 2159–2169, 2002, doi: 10.1099/00221287-148-7-2159.
- [17] W. T. Huang, R. Tai, R. S. Hseu, and C. T. Huang, "Overexpression and characterization of a thermostable, pH-stable and organic solvent-tolerant *Ganoderma fornicatum* laccase in *Pichia pastoris*," *Process Biochemistry*, vol. 46, no. 7, pp. 1469–1474, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.procbio.2011.03.020.
- [18] D. Zhongyang *et al.*, "Production and characterization of thermostable laccase from the mushroom, *Ganoderma lucidum*, using submerged fermentation," *Afr J Microbiol Res*, vol. 6, no. 6, pp. 1147–1157, Feb. 2012, doi: 10.5897/ajmr11.1257.
- [19] E. M. Ko, Y. E. Leem, and H. T. Choi, "Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 57, no. 1–2, pp. 98–102, 2001, doi: 10.1007/s002530100727.
- [20] B. Muhammad, A. Muhammad, and R. Muhammad, "Purification and biochemical characterization of extracellular manganese peroxidase from *Ganoderma lucidum* IBL-05 and its application," *Scientific Research and Essays*, vol. 10, no. 14, pp. 456–464, Jul. 2015, doi: 10.5897/sre2015.6268.
- [21] S. Hariharan and P. Nambisan, "Optimization of Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase, and Lac Production from *Ganoderma lucidum* Under Solid State Fermentation of Pineapple Leaf," *Bioresources*, vol. 8, no. 1, pp. 250–271, 2013.
- [22] H. Suryadi *et al.*, "Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi," *Heliyon*, vol. 8, no. 2, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e08865.
- [23] J. Čilerdžić, M. Stajić, and J. Vukojević, "Activity of Mn-Oxidizing Peroxidases of *Ganoderma lucidum* Depending on Cultivation Conditions," *Bioresources*, vol. 11, no. 1, pp. 95–104, 2016, doi: 10.15376/biores.11.1.95-104.
- [24] W. D. H. Schneider, R. C. Fontana, S. Mendonça, F. G. de Siqueira, A. J. P. Dillon, and M. Camassola, "High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources," *Process Biochemistry*, vol. 69, pp. 1–11, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.procbio.2018.03.005.
- [25] P. Thamvithayakorn, C. Phosri, N. Pisutpaisal, S. Krajangsang, A. J. S. Whalley, and N. Suwannasai, "Utilization of oil palm decanter cake for valuable laccase and manganese peroxidase enzyme production from a novel white-rot fungus, *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33," *3 Biotech*, vol. 9, no. 11, Nov. 2019, doi: 10.1007/s13205-019-1945-8.
- [26] G. Janusz, K. H. Kucharzyk, A. Pawlik, M. Staszczak, and A. J. Paszczynski, "Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation," *Enzyme Microb Technol*, vol. 52, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.enzmictec.2012.10.003.
- [27] A. K. Pandey, S. K. Vishwakarma, A. K. Srivastava, V. K. Pandey, S. Agrawal, and M. P. Singh, "Production of ligninolytic enzymes by white rot fungi on lignocellulosic wastes using novel pretreatments," *Cell Mol Biol*, vol. 60, no. 5, pp. 41–45, 2014, doi: 10.14715/cmb/2014.60.5.8.
- [28] A. Umar and S. Ahmed, "Optimization, purification and characterization of laccase from *Ganoderma leucocon-textum* along with its phylogenetic relationship," *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-06111-z.
- [29] Bhosle S, Ranadive K, Bapat G, Garad S, Deshpande G, and Vaidya J, "Taxonomy and Diversity of *Ganoderma* from the Western parts of Maharashtra (India)," *Mycosphere*, 2010, doi: 10.1128/jcm.00430-10.
- [30] P. Singh, O. Sulaiman, R. Hashim, L. C. Peng, and R. P. Singh, "Evaluating biopulping as an alternative application on oil palm trunk using the white-rot fungus *Trametes versicolor*," *Int Biodeterior Biodegradation*, vol. 82, pp. 96–103, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.ibiod.2012.12.016.
- [31] Y. Naidu *et al.*, "Consolidated evaluation of polysaccharide degradation after oil palm wood pretreatment with indigenous white-rot hymenomycetes," *Wood Sci Technol*, vol. 56, no. 2, pp. 409–435, Mar. 2022, doi: 10.1007/s00226-022-01366-1.