

Aislamiento y purificación de la enzima lacasa: evaluación de su potencial biodegradador en residuos agrícolas

Sandra Valdés^{1*}; Cristian Garita², Carmenza Esquivel³, Luis Roberto Villegas⁴

^{1*} Laboratorio de Investigación en Biorrefinería, Escuela de Química, Universidad Nacional de Heredia, Costa Rica. Apartado Postal: 86-3000. sandra.valdes.diaz@una.cr.

² Laboratorio Biotech, Costa Rica, Apartado Postal: 2427-4050.

³ Sede Interuniversitaria de Alajuela, Costa Rica, Apartado Postal: 86-3000

⁴ Laboratorio de Investigación en Biorrefinería, Escuela de Química, Universidad Nacional, Costa Rica. Apartado Postal: 86-3000.

Resumen

A nivel mundial, el inadecuado manejo de los residuos está generando el deterioro acelerado del planeta y, Costa Rica no es la excepción. Con el objetivo de aislar y purificar la enzima lacasa para la evaluación de su potencial degradador de residuos agrícolas, se obtuvieron cultivos axénicos de *Ganoderma applanatum* y *Trichoderma harzianum*, en los cuales se determinó la actividad de la enzima lacasa mediante la oxidación del ABTS. El aislamiento de *G. applanatum* registró la mayor concentración de la enzima, por lo que fue parcialmente purificada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), luego el extracto enzimático fue purificado con filtro Vivaspin de 20 ml y peso molecular 50 kDa. Posteriormente, se llevaron a cabo los tratamientos enzimáticos de los residuos agroindustriales de caña, piña y banano durante 45 días. Los resultados mostraron que la enzima redujo la concentración de lignina en los residuos de banano y caña en lapsos que oscilaron entre 15 y 45 días.

Palabras clave: lacasa, *Ganoderma applanatum*, *Trichoderma harzianum*, residuos agroindustriales.

Abstract

Around the world, the inappropriate waste management is generating a quick deterioration of the planet, and Costa Rica is not the exception. To isolate and purify lacassa enzymes to evaluate its biogradient potential of agricultural wastes, axenic isolates of *Ganoderma applanatum* and *Trichoderma harzianum* were used to estimate its laccase enzymatic activity by ABTS oxidation. *G. applanatum* recorded the highest amount of the enzyme, so it was partially purified by SDS-PAGE electrophoresis gel, by the way the enzymatic extract was purified with a 20 ml Vivaspin filter of 50 kDa molecular weight. After that, banana, sugar cane and pineapple wastes were submitted to

enzymatic treatments for 45 days. The assessment showed a reduction in the amount of lignin on banana and sugar cane residues at 15 and 45 days.

Keywords: laccase, *G. applanatum*, *T. harzianum*, agroindustrial wastes.

Introducción

Los residuos agroindustriales se generan como parte de los procesos de la industria, y a pesar de que ya no son de utilidad para la misma, pueden ser reaprovechados (Saval, 2012; Farmanelli et al., 2017). Sin embargo, enfrentamos serios problemas como la falta de conciencia ambiental para su manejo, insuficiente capacidad tecnológica, legislaciones más específicas y recursos económicos limitados que no permiten un adecuado tratamiento de los mismos (Saval, 2012).

Costa Rica no está exenta de esta problemática. La biomasa húmeda total generada en el 2012 fue de 27 millones de toneladas (los sectores agrícola y aserraderos constituyen el 52,7%), mientras que en biomasa seca los sectores agrícolas y forestales representaron un 55,4%. (Coto, 2013).

No fue hasta el año 2016 que se les otorgó valor a los residuos en Costa Rica. El Plan Nacional para la Gestión Integral de Residuos 2016-2021, planteó el cambio del concepto de “basura” o “desecho” por el de “residuo” (Ministerio de Salud, 2010). A pesar de ser una iniciativa con gran potencial, las carencias de personal profesional y técnico, la falta de capacitación de la población, y la falta de recursos económicos, hacen que el cumplimiento de la misma sea insuficiente

(Castro, 2008).

La ligninocelulosa es la materia orgánica más abundante en la tierra y está formada por tres polímeros: celulosa (35-50%), hemicelulosa (25-30%) y lignina (25-30%) (Wang et al., 2011). Se encuentra presente en maderas, y residuos agroindustriales y puede ser utilizada como materia prima, para la producción de celulosa en la industria. Sin embargo, para la extracción de celulosa es necesario solubilizar la lignina y debido a que este compuesto es recalcitrante, debe someterse a diferentes tratamientos térmicos o químicos, que además de costosos ocasionan daños ambientales por los productos químicos utilizados (Chang & Holtzapple, 2000).

Los hongos basidiomicetes presentan enzimas ligninolíticas como la lacasa, la lignina peroxidasa y la peroxidasa dependiente de manganeso (Almaraz et al., 2016). Con el cambio climático la acumulación de residuos ha aumentado (Sánchez et al., 2008). Lo anterior ha provocado que el productor emplee herbicidas y quemas en algunos casos (Quesada, 2003), de manera que ha sido necesario buscar alternativas mediante el uso de enzimas como la lacasa, que permitan la biodegradación de la lignina (Scott et al., 1998).

La gran variedad de sustratos que pueden ser degradados por las lacasas las hace útiles para diferentes procesos biotecnológicos tales como la remoción de compuestos fenólicos, compuestos aromáticos y colorantes (Salazar, 2018). Además, son utilizadas para procesos de blanqueamientos de pulpas, y bioremediación (Camacho et al., 2017); así como también deslignificación de biomasa lignocelulósica (Rodríguez et al., 2003).

Si tomamos en cuenta la biomasa seca total, de los residuos en el país, por ejemplo: el pinzote de banano representa el 45 %, el bagazo de caña un 28 % y los rastrojos de piña el 100 %, la cantidad de desechos agrícolas que quedan dispersos en el campo, podrían superar las 134 toneladas (Padilla & Correa, 1986). Los tres cultivos, antes mencionados, se encuentran entre los que aportan la mayor cantidad de (ton/ha) de biomasa húmeda (Coto, 2013). En el presente estudio nos dimos a la tarea de investigar el potencial biodegradador de la enzima lacasa sobre los residuos agrícolas, que constituyen un problema actual en el país.

Materiales y métodos

Mantenimiento de las cepas de estudio

Las cepas de *G. applanatum* y *T. harzianum* fueron donadas por el laboratorio de Metabolitos de la Escuela de Química, Universidad Nacional de Costa Rica. Ambas cepas se mantuvieron en agar papa dextrosa (PDA) a 28°C y un pH de 5.0, por 10 días

antes de ser reactivados en caldo extracto de malta (AEM), durante 5 días a 28°C y agitadas a 100 rpm.

Desechos agroindustriales

Los residuos agroindustriales fueron obtenidos de subproductos agrícolas de banano, caña de azúcar y piña.

Preparación del pre inóculo

Seis fragmentos (5 mm) del hongo crecido en AEM se colocaron en erlenmeyers de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo líquido, a 28°C y 150 rpm durante 4 días. De la biomasa obtenida se tomaron 0.4 g en base húmeda y se agregaron a erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de medio Wunder modificado, a 28°C, 125 rpm durante 10 días.

Extractos enzimáticos

El fluido extracelular se obtuvo centrifugando a 6000 rpm durante 30 min, a temperatura ambiente. Se tomaron muestras por triplicado a: 0, 2, 5, 7, y 10 días de cultivo. A estas muestras se les realizaron las pruebas de proteínas totales, y actividad enzimática de la lacasa como lo describe Bourbonnais et al., 1990.

Determinación de proteínas solubles

La determinación fue llevada a cabo por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Actividad de la enzima lacasa (U/I)

Las muestras obtenidas a los tiempos (días) de cultivo (t_0 , t_2 , t_5 , t_7 , t_{10}),

fueron filtradas con papel de filtro Whatman No 1, usando una bomba de vacío. Posteriormente, los extractos enzimáticos se centrifugaron a 5000 rpm durante una hora, se añadió un inhibidor de proteasas y el sobrenadante se almacenó a 4°C para su posterior medición de actividad enzimática.

La determinación de la actividad de la enzima lacasa se llevó a cabo por la oxidación ABTS [Acido 2,2'- azinobis (3 - etilbenzotiazolin)-6-sulfónico] al catión ABTS+. Para ello, se añadieron 3000 µl del extracto enzimático, luego 1500 µl de buffer acetato de sodio 0.1M, pH 5 y, finalmente, 500 µl de ABTS 1mM. La absorbancia se midió por triplicado a 420 nm en un espectrofotómetro Jasco V-730 realizando mediciones al inicio de la reacción y cinco minutos después (Tinoco et al., 2001). La actividad específica se calculó a partir de las lecturas de absorbancia mediante la siguiente ecuación (Chaparro y Rosas, 2006):

$$AE = \frac{\Delta DO \times fd \times V_t}{\Delta t \times \epsilon \times L \times V_{enz}}$$

donde:

AE: actividad enzimática en unidades internacionales por L de disolución de enzima (UL-1 enz);

Δ DO: Diferencia de densidad óptica;

fd: Factor de conversión debido al coeficiente de extinción molecular;

Vt: Volumen total de la disolución (mL);

Δ t: Tiempo de reacción en el baño maría (min); ε: coeficiente de extinción molar (ε 420

nm = 36 M⁻¹, para ABTS);

L: longitud de celda (cm);

V_{enz}: Volumen de la solución de extracto crudo utilizado (mL).

Una unidad (U) de actividad de lacasa se definió como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 µmol de ABTS, por minuto, (U = µmol / min) bajo las condiciones del ensayo.

Purificación parcial de la enzima lacasa

Se tomaron 20 mL de las muestras obtenidas del filtrado del hongo con mayor actividad enzimática lacasa y fueron colocadas en filtros de 20 ml de corte de peso molecular 50 kDa. Se centrifugó a 5000 rpm por 25 minutos a una temperatura de 25°C. Previamente el filtro fue enjuagado con agua de-ionizada y esterilizado con etanol al 70 %.

Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

La pureza de la enzima se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) según el método descrito por Laemmli, 1970, empleando algunas modificaciones. De igual manera se asociaron las bandas encontradas, con los pesos moleculares para la lacasa. Para el análisis se emplearon estándares de pesos moleculares de 3, 6, 14, 17, 28, 38, 49, 62, 98, y 198 kDa (See Blue, Plus 2, Novex, Life Technologies). El tampón concentrador se preparó en Tris HCl 0.5 M pH 6.8 y el tampón separador en Tris HCl 1.5 M a pH 8.8. En ambos casos, se añadió SDS a una

concentración de 0.4%.

Para la preparación de la muestra se añadieron 10 μ L de buffer de muestra LDS (4X), 4 μ L de agente reductor 10X y 26 μ L de muestra parcialmente purificada, para un total de 40 μ L, se mezcló en vortex, se realizó una centrifugación y se colocó a 70°C por 10 minutos. Posteriormente, se colocaron los 40 μ L de las muestras en los pozos 3-8. En el pozo 2 se colocó el patrón de pesos moleculares. El tiempo de corrida fue de 60 minutos a 200 V. Una vez terminado el proceso, se dejó el gel en solución de tinción y en agitación durante toda la noche. La solución de tinción se preparó con metanol a 40 % (v/v): 10 % ácido acético (v/v): 0.25 azul de Coomassie R-250 (p/v). Para el desteñido el gel se enjuagó con agua de-ionizada, por unos segundos.

Determinación del contenido de lignina

Para la preparación de los residuos y determinación de la humedad de los residuos y del porcentaje de materia orgánica (MO_{lig}), las muestras fueron lavadas, luego esterilizadas en autoclave y secadas a 60°C durante tres días. Una vez secas, fueron guardadas en bolsas selladas e identificadas como RBC (residuos de bagazo de caña), RPB (residuos de pinzote de banano) y RCP (residuos de corona de piña). Los residuos

Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con base en la teoría de los modelos lineales y mixtos con el software

fueron tratados de acuerdo con el procedimiento descrito en TAPPI T264 cm-07. Para la determinación de humedad se usaron los procedimientos estándares descritos en TAPPI T257. La determinación de cenizas se basó en la norma UNE 57050. *Efectividad de la enzima lacasa sobre los desechos agroindustriales*

Se pesaron 0.5 g de cada uno de los desechos agrícolas y se procedió a incubarlos con 50 mL del extracto enzimático purificado parcialmente, a 30°C y con 100 rpm en agitador orbital, durante 45 días. Cada desecho se evaluó por duplicado, a los tiempos (días) 0, 15, 30 y 45. Se colocó un grupo control que contenía solo el residuo agrícola. Luego se pesó y se calculó el porcentaje de lignina (Schwanninger et al., 2002).

$$\% \text{ de lignina} = \frac{(P_3 - P_2) \times (\% \text{ MO}_{\text{lig}}) \times 100}{P_1 \times 100 - \% H}$$

donde:

P₁: peso inicial de la muestra;

P₂: peso de la muestra después de filtrado y secado a 100 °C;

P₃: peso de la muestra después de lavado y secado;

MO_{lig}: % materia orgánica;

H: % agua respecto a la muestra molida.

estadístico InfoStat (nivel de confianza del 95%). En los casos donde no se encontró igualdad de varianza se realizó el análisis de varianza no paramétrica: Kruskal Wallis. También se utilizaron las pruebas de

comparación de medias de Turkey al 95 % de confianza.

Resultados y discusión

Actividad de la enzima lacasa (U/l)

En los resultados obtenidos del cultivo durante 10 días en medio Wunder se observó que, aunque ambas especies mostraron un comportamiento similar, el hongo *G. applanatum* mostró más actividad lacasa en el tiempo de estudio ($43,8 \times 10^{-4}$ UI) que el hongo *T. harzianum* ($32,8 \times 10^{-4}$ UI) (Tabla 1). La mayor actividad de lacasa en el ensayo se obtuvo en el día 8 y disminuyó en el día 9, debido a que el micelio comienza a cubrir el sustrato. Lo anterior es indicativo del

proceso de fructificación de *G. applanatum* (Murrieta et al., 2002; Manjarres et al., 2010).

Aunque se ha reportado la existencia de actividad lacasa producida a nivel intracelular en hongos de pudrición blanca como *Trametes versicolor* (Chernykh et al., 2008; Karp et al., 2012), la técnica utilizada en este estudio cuantificó únicamente la actividad lacasa extracelular. La actividad intracelular podría revelar valores más altos de lacasa, por lo que sería necesario realizar investigaciones que evalúen este tipo de actividad en los hongos estudiados.

Tabla 1. Actividad enzimática en los hongos *Trichoderma sp* y *Ganoderma sp*, durante 10 días.

	AE (U) $\times 10^{-4}$ t_0	AE (U) $\times 10^{-4}$ t_2	AE (U) $\times 10^{-4}$ t_5	AE (U) $\times 10^{-4}$ t_8	AE (U) $\times 10^{-4}$ t_9	AE (U) $\times 10^{-4}$ t_{10}
Hongo	$x \pm DE$	$x \pm DE$	$x \pm DE$	$x \pm DE$	$x \pm DE$	$x \pm DE$
<i>T. harzianum</i>	$0,02 \pm 0,01^a$	$22,1 \pm 0,27^{abcd}$	$24,7 \pm 0,03^{bcd}$	$32,8 \pm 0,04^{cd}$	$9,2 \pm 0,13^{abc}$	$9,3 \pm 0,13^{abc}$
<i>G. applanatum</i>	$0,03 \pm 0,01^{ab}$	$14,5 \pm 0,19^{abc}$	$31,2 \pm 0,38^{cd}$	$43,8 \pm 0,03^d$	$11,8 \pm 0,17^{cd}$	$26,2 \pm 0,32^{cd}$

p = 0,0434. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Determinación de proteínas solubles por el método de Bradford

Los resultados de los análisis del contenido de proteínas y la liberación de azúcares reductores permiten tener una idea general de la dinámica de crecimiento y metabolismo de cada hongo. Con base en la naturaleza de los crecimientos fúngicos, se asume que una fracción considerable de la proteína extracelular presente en el medio de cultivo corresponde a las enzimas, en este caso lacasas, que llevan a cabo la degradación del sustrato.

La concentración de proteínas solubles aumenta a medida que aumenta la actividad lacasa durante el crecimiento del

hongo (Mansur et al., 2003). En la Tabla 2 se puede observar que la mayor concentración de proteínas se presentó a los 8 y 10 días, lo cual está en concordancia con la mayor actividad enzimática observada con el hongo *G. applanatum* (Tabla 1).

La incorporación de glucosa al inicio, para incrementar el crecimiento del micelio, permite que los hongos produzcan otros tipos de proteínas necesarias para su metabolismo y crecimiento, algunas de las cuales son secretadas al medio (Vílchez, 2002). Lo anterior podría explicar el comportamiento de *G. applanatum* al día 12 del cultivo ($0,96 \pm 0,03$).

Tabla 2. Determinación de proteínas solubles en el hongo *Ganoderma sp* a los 10 días de crecimiento.

Tiempo (días)	Proteínas solubles $x \pm DE$
0	$0,66 \pm 0,01^a$
5	$0,83 \pm 0,04^{a,b,c}$
8	$0,93 \pm 0,02^{b,c}$
10	$0,76 \pm 0,06^{a,b}$

$p=0,0096$. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

Purificación parcial de la enzima lacasa

La filtración permite separar la biomasa presente en el cultivo y con la membrana de 50 kDa se logra eliminar proteínas, de menor peso molecular al del

tamaño del poro y concentración de la lacasa. Lo anterior se constató con los resultados obtenidos mediante SDS-PAGE.

La electroforesis en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE (Fig 1)

evidenció una banda de proteínas con un peso molecular que oscilaba entre 28 y 38 kDa. Lo descrito corrobora lo reportado por la base de datos Protein Data Bank FAST, donde se reporta un peso molecular para la enzima lacasa de 30 kDa. No obstante, algunos reportes bibliográficos indican que el peso molecular de la lacasa oscila entre 40-60 kDa (Ramírez et al., 2003). Cabe destacar que la variabilidad podría estar relacionada

con la cepa o con las diferentes condiciones de cultivo. En entornos diferentes se pueden producir diferentes patrones de isoenzimas o inducir la aparición de isoenzimas aún no identificadas (Muñoz et al., 1997; Chernykh et al., 2008). Ramírez et al. (2003) han reportado la presencia de las isoenzimas de lacasa en fermentación sumergida empleando Cu como inductor.

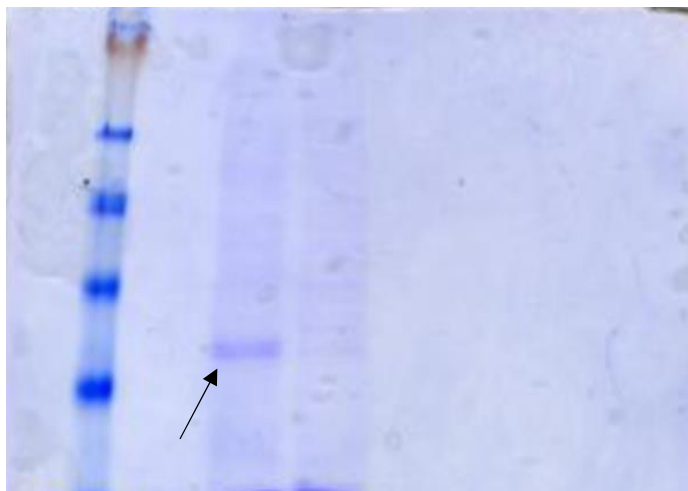


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE. La flecha muestra la enzima lacasa del hongo *G. applanatum* purificada parcialmente y concentrada al vacío. MW: patrón de peso molecular See Blue Plus 2.

Efectividad de la enzima lacasa sobre los desechos agroindustriales

La descomposición de la lignina es realizada por un número limitado de microorganismos, principalmente hongos debido a su capacidad para mineralizar la lignina (Tuomela et al., 2000). Los hongos de pudrición blanca en su hábitat natural degradan la lignina solo cuando necesitan

tener acceso a los carbohidratos presentes en la madera (Ortiz, 2009).

En los hongos, tras agotar la glucosa, conseguirán una segunda fuente de carbono mediante la degradación de lignina u otros compuestos fenólicos del medio, empleando la enzima lacasa (Xiao et al., 2006). Galhaup et al. (2002), han demostrado una relación directa entre la producción de

lacasa y el agotamiento de glucosa, que puede deberse a la transcripción del gen de lacasa en presencia de glucosa.

Al determinar los porcentajes de humedad y materia orgánica, se puede observar que los residuos de pinzote de banano (RPB) fueron inferiores a lo reportado (Tabla 3) por Ortega et al. (2005), mientras que para los residuos de corona de piña (RCP) el porcentaje de humedad fue inferior

a lo reportado (Córdoba, 2011). Con referencia a lo anterior, debemos tomar en cuenta que el valor de humedad es altamente dependiente del tipo de residuo que se va a secar, las condiciones del equipo, la temperatura y el tiempo de secado. Por otro lado, la materia orgánica se encuentra muy relacionada con las condiciones del suelo, así como la composición química del residuo (Ranganna, 1977).

Tabla 3. Porcentajes de humedad y materia orgánica obtenidos en el ensayo y reportados por la literatura.

Residuo	% H	% H reportado	% MO	% MO reportado
RBC	9,2	4-10*	11,8	9,6* ****
RCP	11,4	49,2**	12,6	12,0**
RPB	14,0	82,1***	6,5	16,1***

Ortega y col, 2005; ** Córdoba, 2012, ***Turrado y col, 2009, **** Manals-Cutiño y col, 2015. H: humedad; MO: materia orgánica; RBC: Residuos de bagazo de caña; RCP: residuos de corona de piña; RPB: residuos de pinzote de banano.

En la Tabla 4, podemos observar que los residuos que mostraron menor cantidad de lignina a los 45 días fueron banano y caña. Este último mostró la mayor disminución de lignina a los 15 días. El comportamiento del banano fue diferente mostrando el mayor porcentaje de disminución de lignina a los 45 días. A diferencia de los residuos mencionados con anterioridad, en la piña no se observaron

grandes diferencias, en ninguno de los tiempos estudiados, lo cual puede deberse a la presencia de metales pesados que se encuentran en los agroquímicos que se utilizan (Collins & Dobson, 1998).

Dado que la lacasa posee un centro multicobre, estos compuestos químicos presentes en los residuos pueden actuar como quelantes sobre el Cu (II) provocando un

cambio conformacional en la proteína, y finalmente alterar la actividad enzimática (Ortellado et al., 2016). Según reportes de Pinzon et al. 2011, en el fruto de piña (*Ananas comosus*) han sido hallados plaguicidas altamente tóxicos, como endosulfan, heptacloro, aldrin, metilparation y thionazin.

Como podemos observar en la Tabla 4, entre los días 15 y 30 no hubo variación del comportamiento para ninguno de los residuos, lo cual pudo deberse a una disminución de la temperatura en el laboratorio (10°C) donde se encontraban las muestras, lo cual pudo provocar la alteración de la actividad enzimática, tomando en cuenta que la actividad óptima de la enzima lacasa se encuentra reportada a temperaturas superiores a 25°C (Sunil et al., 2011).

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre los residuos de caña y banano respecto al residuo de piña, e incluso entre ellos. Para la caña las diferencias fueron marcadas al tiempo 15 y para banano a los 45 días (Tabla 4). Lo anterior mostró que la acción de la enzima lacasa sobre la lignina en caña, ocurre mucho antes que el resto de los residuos (día 15) y no muestra variación posterior, mientras que en el banano la enzima fue más eficiente al tiempo 45.

No podemos obviar que la degradación de la biomasa vegetal es un proceso complejo que involucra la acción conjunta de un gran número de enzimas extracelulares. Sin embargo, para una eficiente hidrólisis de lignocelulosa hasta azúcares simples, se requiere la combinación sinérgica de enzimas

(Quevedo, 2011; Castro, 2013).

En los ecosistemas naturales los residuos procedentes de los organismos se depositan sobre el suelo iniciándose el ciclo de descomposición-humificación- mineralización del humus característico de la evolución de la materia orgánica del suelo (Julca-Otiniano, 2006). En este ciclo intervienen numerosos factores, entre los cuales destacan factores abióticos (humedad, temperatura, oxígeno, y composición mineralógica de la tierra) y factores bióticos (microorganismos del suelo). A diferencia de los sistemas naturales, en los agrícolas el ciclo de la materia se ve fuertemente alterado por la biomasa de la cosecha. De esta forma, la materia orgánica queda disponible para que se lleven a cabo los procesos de mineralización primaria y formación de humus estable (Quemada et al., 1997; Sánchez et al., 1989).

Sobre la base de las consideraciones anteriores, una de las alternativas para la transformación de los residuos es la implementación de la biotecnología con la utilización de enzimas. Actualmente, países con mayor desarrollo científico y tecnológico aplican la biorremediación con enzimas debido a los altos niveles de eficiencia y efectividad. Costa Rica necesita implementar este tipo de procedimiento, y con ello, disponer de metodologías eficaces para solventar los serios problemas que genera la contaminación por la acumulación de residuos.

Para la obtención de enzimas que puedan biodegradar desechos, es preciso seleccionar

Artículos

primero a los microorganismos que posean la capacidad de producir enzimas para degradar ligninas y celulosas, que son los principales componentes de los desechos agrícolas. Por lo anterior, es necesario el conocimiento de los hongos de podredumbre blanca y de su capacidad enzimática en la degradación de la ligninocelulosa, ya que son capaces de metabolizar los componentes de la madera hasta agua y CO₂.

Dada la diversidad microbiana en el planeta y la capacidad adaptativa de ciertas cepas a condiciones adversas se ha incrementado la búsqueda de nuevos microorganismos que tengan dicho potencial. A nivel de

Latinoamérica se han realizado varios trabajos enfocados a la identificación de cepas para mejorar la eficiencia de estos procesos (Gaitan, 2007). La heterogeneidad en los resultados, la necesidad de obtener mejores rendimientos; además de mejorar las metodologías existentes, sugiere la posibilidad de buscar cepas más específicas. Tal y como se ha visto, con el uso de la biotecnología existe la posibilidad de investigar nuevas enzimas fúngicas de gran potencial para superar el reto de los sustratos recalcitrantes, como la lignina (Godliving, 2012).

Tabla 4. Porcentajes de lignina en los residuos estudiados y los valores reportados por la literatura.

Tiempo (días)	% Lignina RBC	% Lignina reportado	% Lignina RCP	% Lignina reportado	% Lignina RPB	% Lignina reportado
0	20,6	19-24*	14,1	10-30**y***	12,5	11,5** 18-20***
15	12,0		13,5		11,0	
30	11,9		12,7		10,2	
45	11,2		12,5		3,0	

*Hunter, 2001; ** Sun y Cheng, 2002; Sosa y col, 2011*** Gonzales y col, 2016. RBC: Residuos de bagazo de caña; RCP: residuos de corona de piña; RPB: residuos de pinzote de banano.

Conclusiones

La cepa de *G. applanatum* mostró un mayor potencial para producir enzimas lacasas que la cepa de *T. harzianum*.

Además, se logró determinar que la actividad de las enzimas lacasas disminuyó la concentración de lignina, en desechos agroindustriales de banano y caña, en un

lapso que osciló entre 15 y 45 días del tratamiento enzimático. Estos resultados hacen de la continuación del estudio, un tema interesante en la degradación de residuos agrícolas.

Agradecimientos

Le agradecemos al PhD. Javier Alvarado Mesén, del Laboratorio de Biotecnología y Proteínas, de la Escuela de Biología, Universidad Nacional, por brindarme de manera sincera su tiempo, materiales y conocimientos para llevar a cabo la electroforesis desnaturalizante.

Referencias

- Almaraz I, Robledo A, Hernández C, y Vázquez M (2016) Producción de enzimas ligninocelulosicas a partir del uso de residuos de *Agave salmiana* como soporte-sustrato. Tesis Ingeniero en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México. pp. 1-51.
- Bourbonnais R, Paice M (1990) Oxidation of nonphenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Letters. 267:99–102.
[http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80298-W](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(90)80298-W)
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem.* 72:255-260.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Camacho R, Gerardo J, Navarro K & Sánchez J (2017) Producción de enzimas ligninolíticas durante la degradación del herbicida paraquat por hongos de la pudrición blanca. *Revista Argentina de Microbiología.* 49(2):89-196.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.11.004>
- Castro, R (2008) Marco legal moderno para la gestión integral de residuos en Costa Rica. *Ambientico.* 178: 7-8.
<http://www.ambientico.una.ac.cr/178.pdf>.
- Castro Y (2013) Estudio de la bioquímica de enzimas lignocelulolíticas. Trabajo de grado de especialización en Microbiología Industrial. Universidad Católica de Manizales, Instituto de Investigación de Microbiología y Biotecnología. Colombia. pp. 1-53.
<http://hdl.handle.net/10839/954>
- Chang V, Holtzapple M (2000) Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl Biochem Biotechnol.* 86:5-37.
<https://doi.org/10.1385/ABAB:84-86:1-9:5>
- Chaparro F, Rosas D (2006) Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera en la Reserva Natural La Montaña del Ocaso, Quimbaya-

Artículos

- Quindío. Tesis de grado Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. Pp 1-109.
- Collins P, Dobson A, & Field J (1998) Reduction of the 2, 2 -Azino-bis (3-Ethylbenzthiazoline- 6 Sulfonate) Cation Radical by Physiological Organic Acids in the Absence and Presence of Manganese. *Appl Environ Microbiol* 64 (6):2026-2031. <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=2275226>
- Córdoba M (2011) Determinación del efecto de la concentración de la base NaOH de la celulasa y celobiasa en la hidrólisis para la producción de etanol a partir del rastrojo de piña. Tesis de licenciatura en Ingeniería química, Universidad de Costa Rica. Costa Rica. pp.1-63.
- Coto O (2013) Evaluación de la generación de residuos agrícolas orgánicos (RAO) en Costa Rica e identificación de sector prioritario. (Consultoría No. 1). San José, Costa Rica. http://www.mag.go.cr/proyectos/proy_residuos-agricolasorg/productos/Informe%20RAO%20CR%20Producto%201.pdf
- Chernykh A, Myasoedova N, Kolomytseva M, Ferraroni M, Briganti F, Scozzafava A, Golovleva L (2008) Laccase isoforms with unusual properties from the basidiomycete *Steccherinum ochraceum* strain 1833. *J Appl Microbiol.* 2008 Dec; 105(6):2065-75. <http://doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03924.x>.
- Fermanelli C, Saux C & Pierella L (2018) Revalorización de Residuos Agrícolas por Pirólisis Térmica y Catalítica. *Revista Tecnología y Ciencia.* 30:217-224. <http://rtyc.utn.edu.ar/index.php/rtyc/article/view/158>
- Gaitán D, Pérez L (2007) Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Trabajo de grado título de Microbiología Industrial. Universidad Javeriana. Colombia. pp 1-81.
- Galhaup C, Goller S, Peterbauer C, Strauss J & Haltrich D (2002) Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiol* 148 (7):2159-2169. <http://doi:10.1099/00221287-148-7-2159>.
- García N, Bermúdez R, Téllez I, Chávez M & Perraud I (2017) Enzimas lacasa en inóculos de *Pleurotus spp.* *Tecnología Química.* 37(1): 39-45. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445552837004>
- Godliving Y (2012) Lignocellulolytic enzymes from tropical fungi: Types, substrates

- and applications. *Scient Res Ass.* 7 (15):1544-1555. [http://doi: 10.5897/SRE11.1812](http://doi.org/10.5897/SRE11.1812)
- González K, Daza D, Caballero P & Martínez C (2016) Evaluación de las propiedades físicas y químicas de residuos sólidos orgánicos a emplearse en la elaboración de papel. *Revista Luna Azul.* 43:499-517. <http://dx.doi.org/10.17151/luaz.2016.43.21>.
- Pinzón M, Londoño A, Blach D, Gutiérrez J, Rojas A (2011) Determinación de residuos de plaguicidas organoclorados POR gc-uECD en frutos de piña (*Ananas comosus* L.) variedad Golden MD2 en el departamento del Quindío. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas,* 9(2), 4-8. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90322644009>
- Hunter W (2001) Bagasse pulp uses in papermaking. *Database.* (<https://www.researchgate.net/publication/262597055>).
- Julca A, Meneses L, Blas R & Bello S (2006) La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. *Idesia (Arica).* 24(1):49-61. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292006000100009>
- Karp SG, Faraco V, Amore A, Birolo L, Giangrande C, Soccol VT, Pandey A, Soccol CR (2012) Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Bioresour Technol.* Jun. 114:735-9. [http://doi: 10.1016/j.biortech.2012.03.058](http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.058).
- Kumar R, Wayman CE (2009) Cellulase adsorption and relationship to features of corn stover solids produced by leading pretreatments. *Biotechnol and Bioengin* 103(2):252-67. [http://doi: 10.1002/bit.22258](http://doi.org/10.1002/bit.22258)
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-685. [http://doi: 10.1038/227680a0](http://doi.org/10.1038/227680a0)
- Manals E, Penedo M & Salas D (2015) Caracterización del bagazo de caña como biomasa vegetal. *Tecnología Química.* 35(2):244-255. <http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S224-61852015000200010&script=sci>
- Manjarres K, Castro A & Rodríguez E (2010) Producción de lacasa utilizando *Pleurotus ostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña. *Revista Lasallista de Investigación.* 7(2):9-15. ISSN: 1794-4449. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69519014002>
- Mansur M, Suarez T & Gonzales A (2003) Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197).

- Appl Environ Microbiol. 64:771– 774.
<https://europepmc.org/article/med/16349507>
- Ministerio de Salud (2010) Política Nacional para la Gestión Integral de Residuos 2010-2021. 1ª. ed. San José, Costa Rica: El Ministerio, 2010. pp.1-52.
- Morales J, Herrera M, Millán A, Ruíz E, Sánchez T, Rodríguez M & Delgado, R (2018) Un estudio sobre el potencial del uso de residuos lignocelulósicos. Revista MICA. 1(1):6-23. <http://440-1805-2-PB.pdf>
- Muñoz C, Guillen R, Martínez A & Martínez M (1997) Laccase Isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and Mn 2 oxidation. Appl Environ Microbiol 63(6):2166-2174
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168508/>.
- Murrieta D, Iglesias G & Iglesias L (2002) Cambios en la producción de lacasa por el hongo *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. cultivado en pulpa de café en confrontación con *Trichoderma viride* Pers., un moho contaminante. Foresta Veracruzana. Foresta Veracruzana [en línea]. 2002, 4(1), 47-52 ISSN: 1405-7247.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49740109>
- Ortega G, Bueno G, Betancourt D, Alvarez I, & Gonzales AL (2005) Biotransformación de residuos lignocelulósicos con hongos *Pleurotus*. Revista CENIC. Ciencias Biológicas [en línea]. 2005, 36. ISSN: 0253-5688.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220525083>
- Ortellado L, Fonseca M, Barchuk M, Afanasiuk S, Silvana S, Villalba L & Zapata P (2016) Efecto de de iones metálicos y compuestos aromáticos sobre la actividad lacasa en *Trametes sp.* nativo de Misiones. Revista de Ciencia y Tecnología. 26: 4-10.
<https://www.researchgate.net/publication/317530247>
- Ortiz M (2009) Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina. Orinoquia. Redalyc. 13(2):37-144. <https://www.researchgate.net/publication/45534329>
- Padilla J & Correa J (1986) Utilización de residuos. En: La industria de los derivados de la caña de azúcar. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Ed Científico Técnica La Habana. pp. 143-158.
- Quemada M, Cabrera M & McCracken D (1997) Nitrogen release from surface-applied covercrop residues: Evaluating the CERES N submodel. Agron.J. 89:723-729. <http://doi:10.2134/agronj1997.00021962008900050003x>
- Quesada K, Alvarado P, Sibaja R & Vega J (2003) Utilización de las fibras del

- rastrajo de piña (*Ananás comosus*, variedad champaka) como material de refuerzo en resinas de poliéster comercial. Revista Iberoamericana de Polímeros. 6(2):1-23. <https://www.researchgate.net/publication/28087816>
- Quevedo B (2011) Evaluación de la degradación de residuos de floricultura para la obtención de azúcares con el uso de tres hongos lignocelulolíticos. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. pp 1-178.
- Ramírez N & col (2003) Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. Revista Colombiana de Biotecnología.5(2):64-72. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/580/1096>
- Ranganna S (1977) Manual of Analysis of Fruits and Vegetable Products. New. Delhi: Tata Mc Graw. Hill Pub Co. Ltd. 634.
- Rodríguez S, Fernández M, Bermúdez R & Morris H (2003) Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus sp.* Revista Iberoamericana de Micología. 20(4):164-168. <https://pdfs.semanticscholar.org/0722/94b4bd6f085f1d9d52892249a205f9bf4b34.pdf>
- Salazar F & Castellanos R (2018) Biodecoloración de tintes sintéticos industriales por bacterias termófilas con actividad enzima tipo lacasa. Revista Ciencia y Tecnología para el Desarrollo-UJCM. 4(7):9-21. <https://pdfs.semanticscholar.org/4754/304726830d61a1f5c02e0b8311873b55aa85.pdf>
- Sánchez S, Crespo G, Hernández M & García Y (2008) Factores bióticos y abióticos que influyen en la descomposición de la hojarasca en pastizales. Pastos y Forrajes.31(2):1. <https://pdfs.semanticscholar.org/4754/304726830d61a1f5c02e0b8311873b55aa85.pdf>
- Sánchez P, Cheryl A, Scott L, Cuevas E & Lal R (1989) Organic input management in tropical agro ecosystems. In: Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems (J. M. O. D.C. Coleman, G. Uehara, Ed.). Universities of Hawaii y of Georgia, Maui Hawaii. pp. 125-152
- Saval S (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, presente y Futuro. BioTecnología. 16(2):14-46. <https://smbb.mx/revista-biotecnologia-2012-vol-16-no2>
- Schwanninger M & Hinterstoisser B (2002) Klason lignin: Modifications to improve the precision of the standardized determination. Holzforschung. 56(2):161-166. <https://doi.org/10.1515/HF.2002.027>
- Scott G, Akhtar M, Lentz M, Kirk T, Swaney R, & Shipley D (1998) An overview of

- Biopulping Research: discovery engineering. J Korea TAPPI. 30(4):17-27.
<https://www.esf.edu/pbe/scott/research/papers/100.pdf>
- Sun Y & Cheng J (2002) Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production. A Review. Biores Tech 83:1-11.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Sunil SM, Renuka PS, Pruthvi K, Swetha M, Malini S, Veena SM (2011) Isolation, Purification and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus sp.* Enz Res 2011:7.
<https://doi.org/10.4061/2011/248735>
- TAPPI T (2002) 257 cm-02. Sampling and Preparing Wood for Analysis. Technical Association of the Pulp and Paper Industry.
<https://infostore.saiglobal.com/en-us/tappi-t-257-c>
- TAPPI T (2007) 264 cm-07. Preparation of wood for chemical analysis. Technical Association of the pulp and paper industry.
<https://infostore.saiglobal.com/en-us/standards/ta>
- Tinoco R, Pickard MA & Vazquez-Duhalt R (2001) Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. Lett Appl Microbiol 32, 331-335. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00913.x>
- Tuomela M, Vikman M, Hattaka A & Itävaara M (2000) Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. Biores Tech 72:169-183.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00104-2)
- Turrado J, Saucedo A, Sanjuán R & Sulbarán B (2009) Pinzote de *Musa balbisiana* y *Musa acuminata* como Fuente de Fibras para Papel. Información tecnológica. 20(4): 117-122.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642009000400013>
- Vilchez L (2002) Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Tesis Lic. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú pp. 6-12.
- Wang W, Yan L, Cui Z, Gao Y, Wang Y et al (2011) Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. Bioresour Technol. 102(19):9321-9324. <http://doi:10.1016/j.biortech.2011.07.065>
- Xiao Y, Chen Q, Hang J & Shi Y (2006) Selective induction, purification and characterization of a laccase isoenzyme from the basidiomycete *Trametes sp* AH28-2. Mycologia.96:2635. <http://doi:10.1080/15572536.2005.11832993>