



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COSTA RICA**  
**SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**  
**MAESTRÍA EN AGRICULTURA ALTERNATIVA con mención EN AGRICULTURA**  
**ECOLÓGICA**

**PROYECTO DE TESIS**

**AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE ENZIMAS MICROBIANAS DE TIPO  
LACASA, PARA LA DEGRADACIÓN DE DESECHOS DE PIÑA; BANANO Y CAÑA**

**POR:**  
**SANDRA VALDES DIAZ**

**PROFESOR GUÍA:**  
**LUIS VILLEGAS, PhD**

**HEREDIA, COSTA RICA, MARZO 2018**

**AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE ENZIMAS MICROBIANAS DE TIPO  
LACASA, PARA LA DEGRADACIÓN DE DESECHOS DE PIÑA; BANANO Y CAÑA**

**POR:  
SANDRA VALDES DIAZ**

## RESUMEN

En el ámbito mundial la producción de residuos agrícolas y su inadecuado manejo genera problemas ambientales y de salud. Con el cambio climático se alteran factores ambientales que a su vez afectan la función descomponedora de los microorganismos. En este estudio se aislaron microorganismos productores de enzimas lacasas en el valle Central, Costa Rica. El análisis del índice de potencia (IP) de enzimas lacasas se realizó en un medio con ABTS empleando diferentes cepas de hongos: *Ganoderma sp*, *Trametes sp*, *Cyathus sp*, *Fusarium sp*, *Aspergillus sp*, y *Tricoderma sp*, este último como control positivo. Los resultados expusieron que *Cyathus sp* y *Ganoderma sp* difieren del resto de las cepas, pero no mostraron diferencias significativas entre ellos ( $p < 0.05$ ). Por otro lado los valores de actividad enzimática evidenciaron que *Ganoderma sp* fue el que mostró mayor actividad a los 10 días ( $39,3 \times 10^{-4}$  UI) y difiere significativamente, para un valor de  $p < 0,05$  ( $p < 0,0001$ ), seguido de *Tricoderma sp* a los 10 días ( $32,7 \times 10^{-4}$  UI), *Cyathus sp* a los 7 días ( $16,48 \times 10^{-4}$  UI) y *Trametes sp* a los 7 días ( $10,5 \times 10^{-4}$  UI). Los resultados de la medición de azúcares reductores mostraron que *Trametes sp* se diferenció del resto de los hongos, ( $\alpha = 0,05$ ), lo cual corrobora los resultados obtenidos en la investigación. El análisis de la biomasa a los 7 días de incubación arrojó que el hongo *Ganoderma sp* difirió significativamente del resto ( $\alpha = 0,05$ ). La determinación de proteínas totales en el hongo *Ganoderma sp* demostró que el tiempo 12 fue el que mostró mayores diferencias, aunque no fue significativamente diferente de los tiempos 8 y 5 ( $\alpha = 0,05$ ). Finalmente el extracto enzimático fue parcialmente purificado con filtro Vivaspín de 20 mL y peso molecular 50 kDa (Sartorius) y posteriormente colocado con los residuos de caña, piña y banano durante 45 días. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los residuos, entre los tiempos del ensayo y en la interacción residuo\* tiempo ( $p < 0,0001$ ). El análisis de los residuos ( $\alpha = 0,05$ ) mostró que el residuo de piña es el que muestra mayores diferencias. Lo anterior indica 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 muestra la mayor actividad al tiempo 45.

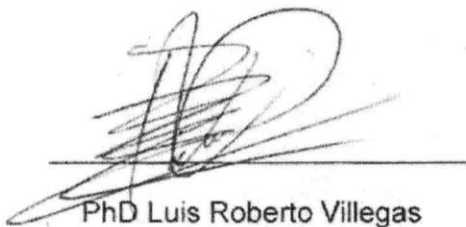
## ABSTRACT

Worldwide production of agricultural waste and inappropriate management creates environmental and health problems. Climate change will alter environmental factors which affect the decomposition of micro-organisms function. In this study were isolated microorganisms producing enzymes laccases in the Central Valley, Costa Rica. The index (IP) power of enzymes laccases analysis was performed on a medium ABTS using different strains of fungi: *Ganoderma* sp, *Trametes* SP., *Cyathus* sp, *Fusarium* SP., *Aspergillus* SP., and *Tricoderma* sp, the latter as positive control. The results presented as *Ganoderma* sp and *Cyathus* sp differ from the rest of the strains, but they showed no significant differences between them ( $p < 0.05$ ). On the other hand the values of enzyme activity showed that *Ganoderma* sp was the one that showed greater activity for 10 days ( $39.3 \times 10^{-4}$  IU) and differs significantly, for a value of  $p < 0.05$  ( $p < 0.0001$ ), followed by *Tricoderma* sp for 10 days ( $32.7 \times 10^{-4}$  IU), *Cyathus* sp 7 days ( $16.48 \times 10^{-4}$  IU) and *Trametes* SP. 7 days ( $10.5 \times 10^{-4}$  IU). The results of the measurement of sugars reducers showed that *Trametes* sp differed from the rest of the mushrooms, ( $\alpha = 0.05$ ), which corroborates the results of the research. The analysis of the biomass to the 7 days of incubation threw to the fungus *Ganoderma* sp differed significantly from the rest ( $\alpha = 0, 05$ ). The determination of total protein in the fungus *Ganoderma* sp showed 12 times was the one that showed greater differences, although it was not significantly different from the times 8 and 5 ( $\alpha = 0, 05$ ). Finally the enzymatic extract was partially purified filter Vivaspin of molecular weight and 20 mL 50 kDa (sartorial) and subsequently placed with cane, pineapple and banana waste for 45 days. The results showed significant differences between waste, between the times of trial and residue interaction \* time ( $p < 0.0001$ ). The analysis of residues ( $\alpha = 0, 05$ ) showed that pineapple residue is the shown major differences. This indicates that the action of the enzyme laccase on the lignin in cane, occurs much earlier than the rest of the waste (day 15) and shows no further variation, while banana enzyme shows increased activity at the time of 45.

**AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE ENZIMAS MICROBIANAS DE TIPO LACASA, PARA LA DEGRADACIÓN DE DESECHOS DE PIÑA; BANANO Y CAÑA**

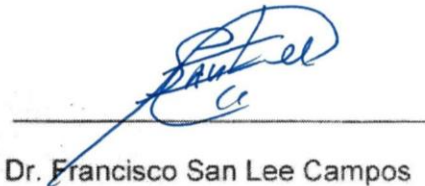
Proyecto de tesis presentado al Comité de Gestión Académica (CGA) de la Maestría en Agricultura Alternativa con mención en Agricultura Ecológica de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Costa Rica como requisito parcial para la obtención del título de *Magister Scientiae*.

Miembros del Tribunal



PhD Luis Roberto Villegas

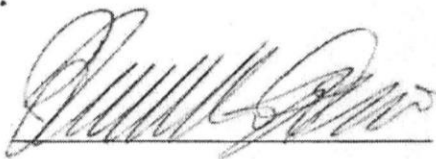
Tutor de tesis



Dr. Francisco San Lee Campos

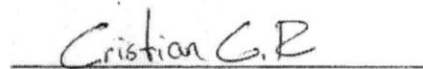
Representante

Consejo Central de Postgrados



PhD Ramón Molina

Asesor de tesis



MSc Cristian Garita

Asesor de tesis



MSc Isabel Camacho

Coordinadora de la Maestría

## **AGRADECIMIENTOS**

Es una larga lista que quisiera hacer como reconocimiento a todas aquellas personas que contribuyeron de manera significativa a la culminación de este trabajo de tesis.

A mi hijo Héctor Rojas por su apoyo en la colecta y preservación de muestras.

A mi tutor el Dr. Luis Roberto Villegas por su apoyo en la investigación. Por todos los conocimientos, consejos y enseñanzas que siempre supo transmitir.

Al Dr Javier Alvarado Mesen, 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.

Al MSc. Cristian Garita por su cariño, entrega y colaboración en todo momento, así como sus valiosos aportes para el análisis estadístico de los datos.

A Tatiana Saldaña, del laboratorio de Preparación de reactivos, de la Escuela de Química, Universidad Nacional, por su apoyo en cada etapa, no solo como profesional sino como amiga y a la que le agradezco todo el tiempo y asistencia que siempre me brindo.

A la Lic Carmenza Esquivel por sus aportes en la confección de los gráficos y por su amistad sincera de tantos años.

Al Dr Roy Soto Fallas, del Laboratorio LAPRONEB, de la Escuela de Química, Universidad Nacional por todo su apoyo en la fase de preparación de los residuos agrícolas.

Al Dr Gerardo Rodríguez Rodríguez, del Laboratorio LAFIT, de la Escuela de Química, Universidad Nacional, por su colaboración con la cristalería y equipos para el desempeño de la tesis.

A la Dra Ana Francis Carballo, Escuela de Química, Universidad Nacional, por su gran apoyo y colaboración durante todo el proceso de la investigación.

Al Lic. Abad Rodríguez Rodríguez, del laboratorio de Microbiología, de la Escuela de Biología, Universidad Nacional, por su cooperación con los equipos e instalaciones durante todo el proceso de la investigación.

Al Lic. Rolando Calderón Fallas, del Herbario Anastasio Alfaro de la Escuela de Biología, Universidad Nacional, por su acertada clasificación taxonómica de los ejemplares colectados.

A los hermanos Jordan Salgado Lobo y Johan Salgado Lobo por la recolecta de los hongos en Barva de Heredia.

A la Lic Carmenza Esquivel por sus aportes en la confección de los gráficos y su amistad sincera de tantos años.

A la estudiante Natalia Chacón, quien fue de gran ayuda en la primera fase de selección de los hongos.

Al estudiante Alejandro Arias, por su ayuda en la preparación de los residuos para la determinación de lignina.

Al PhD Ramón Molina, por sus aportes siempre acertados y sus consejos.

A mis compañeros de laboratorio y a Agustín Campos por su apoyo.

Al laboratorio de Control Biológico de la Escuela de Ciencias Agrarias por las cepas donadas.

A Gabriela Soto por su gran apoyo y amistad en mis inicios en la maestría, a mis compañeros y profesores por los aportes que me hicieron crecer profesionalmente.



## **DEDICATORIA**

A Dios

A mis hijos Leandro Fuentes y Héctor Rojas, por ser el regalo más bello que me ha  
dado la vida.

A mi madre que amo infinitamente.

A mi esposo por todo su amor y apoyo incondicionales.

## ÍNDICE

<u>LISTA DE CUADROS</u>	XII
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	XIII
LISTA DE ANEXOS	XV
<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	XVI
<b><u>CAPÍTULO I</u></b>	1
INTRODUCCION	2
<u>OBJETIVOS</u>	6
<u>OBJETIVO GENERAL</u>	6
<u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	6
<b><u>CAPÍTULO II</u></b>	7
<u>REVISIÓN DE LITERATURA</u>	8
1 Desechos agroindustriales	8
2 Enzima lacasa	12
3 Microorganismos	16
<b><u>CAPÍTULO III</u></b>	26
METODOLOGIA	27
1 Microorganismos	27
2 Desechos agroindustriales	28
3 Diseño	28
4 Procedimiento	29
4.1 Reactivación de los tres hongos degradadores de ligninocelulosa	29
4.2 Preparación del pre inculo	29
4.3 Extractos enzimáticos	30
4.4 Presencia de enzima lacasa en medio con ABTS	30
4.5 Actividad de la enzima lacasa (U)	30
4.6 Medición de azúcares reductores	32
4.7 Determinación de la biomasa micelial	32
4.8 Determinación de proteínas por el método de Bradford	33
4.9 Purificación parcial de la enzima lacasa	33
4.10 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes	33

4.11 Determinación del contenido de lignina	35
4.11.1 Preparación de la muestra	35
4.11.2 Determinación de la humedad de los residuos	35
4.11.3 Determinación del porcentaje de materia orgánica (MOlig)	35
4.11.4 Determinación de lignina por el método Klason	35
4.11.5 Efectividad de la enzima lacasa sobre los desechos agroindustriales	35
4.12 Análisis de datos	35
<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>36</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>60</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>62</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>63</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>88</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1	Composición del medio Wunder modificado para el crecimiento del microorganismo.	28
Cuadro 2	Composición de los geles empleados para la electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	33
Cuadro 3	Resultados del Índice de Potencia	38
Cuadro 4	Análisis del diámetro del halo de coloración en medio con ABTS a los 7 días.	39
Cuadro 5	Análisis de varianza no paramétrica de la actividad enzimática en los hongos <i>Cyathus sp</i> , <i>Ganoderma sp</i> , <i>Trametes sp</i> , y <i>Trichoderma sp</i> a través del tiempo (días).	42
Cuadro 6	Análisis de varianza de la actividad enzimática en los hongos <i>Ganoderma sp</i> y <i>Trichoderma sp</i> a través del tiempo (días).	45
Cuadro 7	Análisis de varianza de azúcares reductores en los hongos <i>Trametes sp</i> , <i>Ganoderma sp</i> , <i>Cyathus sp</i> y <i>Trichoderma sp</i> a través del tiempo (días).	46
Cuadro 8	Análisis de las diferencias de concentración de azúcares reductores en el tiempo.	47
Cuadro 9	Análisis de varianza de la biomasa en los hongos <i>Trametes sp</i> , <i>Ganoderma sp</i> , <i>Cyathus sp</i> y <i>Trichoderma sp</i> a los 7 días de incubación.	48
Cuadro 10	Análisis de varianza de proteínas solubles en el hongo <i>Ganoderma sp</i> a los 12 días	49
Cuadro 11	Porcentajes de humedad y materia orgánica obtenidos en el ensayo y reportados por la literatura.	53
Cuadro 12	Porcentajes de lignina obtenidos en el ensayo y reportados por la literatura.	53
Cuadro 13	Análisis de varianza de los residuos de caña, bagazo y banano en el transcurso del tiempo (días).	55
Cuadro 14	Análisis de varianza de los diferentes tiempo estudiados	56
Cuadro 15	Análisis de la interacción residuos y tiempo (días).	56

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Enzimas que participan en el proceso de degradación de lignina. Tomado de Dashtban et al, 2010 y modificado.	12
Figura 2	Estructura del ABTS	14
Figura 3	Esquema de acción de la enzima lacasa con el ABTS. Tomado de Solis-Oba y col, 2007 y modificado.	14
Figura 4	Hongo <i>Aspergillus niger</i> observado al microscopio óptico (100x).	19
Figura 5	Hongo <i>Trametes versicolor</i> recolectado en Alajuela.	20
Figura 6	Hongo <i>Ganoderma applanatum</i> recolectado en Alajuela.	21
Figura 7	Hongo <i>Fusarium oxysporum</i> observado al microscopio óptico (100x).	22
Figura 8	Hongo <i>Cyathus sp</i> recolectado en Barva de Heredia.	23
Figura 9	Hongo <i>Trichoderma viride</i> donado por el laboratorio de	24
Figura 10	Halos en placas con ABTS en el hongo <i>Ganoderma sp</i> .	37
Figura 11	Hongo <i>Ganoderma sp</i> y <i>Cyathus sp</i> en medios de cultivo de agar Wunder a los 5 días.	40
Figura 12	Hongos <i>Ganoderma sp</i> y <i>Trichoderma sp</i> en medios de cultivo de agar Wunder a los 7 días.	40
Figura 13	Hongos <i>Ganoderma sp</i> y <i>Trichoderma sp</i> en medios de cultivo de agar Wunder a los 14 días.	40
Figura 14	Actividad de la enzima lacasa en los hongos <i>Trichoderma sp</i> , <i>Ganoderma sp</i> , <i>Trametes sp</i> y <i>Cyathus sp</i> , durante 14 días de cultivo.	41
Figura 15	Actividad enzimática lacasa en los hongos <i>Ganoderma sp</i> y <i>Trichoderma sp</i> durante 10 días de cultivo.	43
Figura 16	Concentración de azúcares reductores en el medio de cultivo de los hongos <i>Trametes sp</i> , <i>Ganoderma sp</i> , <i>Cyathus sp</i> y <i>Trichoderma sp</i> durante 12 días.	46
Figura 17	Producción de biomasa en los hongos <i>Trichoderma sp</i> , <i>Cyathus sp</i> , <i>Ganoderma sp</i> y <i>Trametes sp</i> durante el tiempo de incubación.	48
Figura 18	Proteínas totales en los hongos <i>Trichoderma sp</i> , <i>Cyathus sp</i> , <i>Ganoderma sp</i> y <i>Trametes sp</i> durante el tiempo de incubación.	49

Figura 19	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE de enzima lacasa purificada parcialmente, del hongo <i>Ganoderma sp.</i>	50
Figura 20	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE de enzima lacasa purificada parcialmente y concentrada al vacío, del hongo <i>Ganoderma sp.</i>	51
Figura 21	Porcentaje de lignina en los sustratos de bagazo de caña (BC), pinzote de banano (PB) y piña (CP) empleando la enzima lacasa parcialmente purificada.	54
Figura 22	Residuos de bagazo de caña, piña y pinzote de banano con la enzima parcialmente purificada a los 7 días.	55
Figura 23	Residuos de bagazo de caña, piña y pinzote de banano con la enzima parcialmente purificada a los 30 días.	55
Figura 24	Residuos de bagazo de caña, piña y pinzote de banano con la enzima parcialmente purificada a los 45 días.	55

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Hongo Trametes sp a los 10 días de cultivo en medios de cultivo de agar PDA.	87
Anexo 2	Hongos colocados en AEM durante la primera parte del ensayo.	87
Anexo 3	Erlenmeyers con los hongos Ganoderma sp y Tricoderma sp en Agar Wunder durante el proceso de agitación.	87
Anexo 4	Muestras en tanque Mini gel durante la corrida.	88
Anexo 5	Gel en agitación con azul de Coomassie R-250.	88
Anexo 6	Muestra de residuo con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 4 % conectada a un refrigerante.	88
Anexo 7	Residuos de bagazo de caña, corona de piña y pinzote de banano durante el proceso de determinación de lignina Klason al tiempo 0.	88
Anexo 8	Residuos de bagazo de caña, corona de piña y pinzote de banano al t <sub>0</sub> , luego de 3h en ebullición.	88
Anexo 9	Comparación de indicadores de biomasa seca y húmeda por área de cultivo para Costa Rica (2012).	89
Anexo 10	Curva de absorbancia del ABTS.	89
Anexo 11	Curva patrón de ABTS.	90
Anexo 12	Curva patrón de proteínas totales.	90
Anexo 13	Curva patrón de azúcares reductores por DNS.	91
Anexo 14	Análisis de varianza de los datos.	92

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C: grados Celsius

kg: kilogramos

mm: milímetro

ABTS: ácido 2,2 azino bis (3-etilbenzo tiazolin-6 sulfónico)

Ha: hectárea

tn: toneladas

DQO: Demanda química de oxígeno

U/g:

AEM: agar extracto de malta

PDA: agar papa dextrosa

Rpm: revoluciones por minuto

min: minutos

mM: micro molar

nm: nanómetros

U: cantidad de enzima capaz de oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS por minuto

SBC: Sustrato de bagazo de caña

SPB: sustrato de pinzote de banano

SCP: sustrato de corona de piña

in: pulgadas



# **CAPITULO I**

## INTRODUCCIÓN

Los residuos agroindustriales son materiales en estado sólido o líquido que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, y que ya no son de provecho para el proceso que los generó, pero que son aptos para su aprovechamiento o transformación y de interés comercial y/o social (Saval, 2012).

Los residuos agroindustriales pueden ser de origen animal o vegetal, y se pueden dividir en siete grupos: (I) cereales, (II) raíces y tubérculos, (III) plantas oleaginosas, (IV) frutas y verduras, (V) productos cárnicos, (VI) pescados y mariscos y (VII) productos lácteos (Galanakis, 2012). Algunos de los residuos que se obtienen a partir de cultivos principales incluyen maíz, trigo, sorgo, frijol, arroz, soya, caña, cebada y cacahuate, mientras que dentro de los productos secundarios están el algodón, agave, y café entre otros (Valdez-Vázquez et al., 2010).

El inconveniente al que se enfrentan los residuos agroindustriales es la falta de una clara conciencia ambiental para su manejo, incapacidad tecnológica y recursos económicos para darles un destino final, así como una legislación específica que promueva la gestión de este tipo de residuos, desde su generación hasta su disposición final (Saval, 2012).

Las aplicaciones que se le ha dado a este tipo de residuos se pueden clasificar en cuatro grupos: en primer lugar el pre-tratamiento, extracción y recuperación de compuestos bioactivos e ingredientes alimenticios (fibras dietéticas, pigmentos, pectinas, oligosacáridos, flavonoides, carotenoides, compuestos fenólicos, tocoferoles y vitaminas); en segundo lugar, la producción de enzimas, antibióticos, hongos comestibles, ácidos orgánicos y biocombustibles; en tercer lugar, la producción de alimento para animales y en último lugar la producción de composta (Ayala-Zavala et al., 2011; Chandrasekaran et al., 2013; Galanakis, 2012). Dentro de estas aplicaciones, las enzimas representan una herramienta muy útil para el pre-tratamiento, extracción y recuperación de compuestos con alto valor agregado (Casas et al., 2014).

La lignocelulosa es la materia orgánica más abundante en la tierra y está compuesta de tres polímeros: celulosa (35-50%), hemicelulosa (25-30%) y lignina (25-30%) (Wang et al. 2011). Se encuentra presente en maderas, y residuos agroindustriales como la paja

de trigo, rastrojos de maíz, piña, banano y caña, a partir de los cuales puede ser utilizada como materia prima, para la producción de celulosa en la industria.

En Costa Rica el manejo inadecuado de los residuos constituye uno de los principales problemas ambientales que enfrenta la sociedad (Castro., 2008). Para el año 2006 se estimaban 3 784 toneladas de residuos ordinarios (o municipales) por día en el país (Programa Competitividad y medio ambiente, CYMA), lo que equivale a un aumento de 2,7 veces lo que se producía en 1991. El Plan Nacional para la Gestión Integral de Residuos 2016-2021 publicado en 2016, le otorga valor a aquellos residuos que aún pueden ser reincorporados a los procesos productivos, y busca cambiar el concepto de “basura” o “desecho” por el de “residuo.

A pesar de ser una iniciativa con gran potencial, las principales debilidades son la falta de control y monitoreo, tanto de los residuos, como de los generadores (estatales y privados). Las carencias de personal profesional y técnico suficiente, capacitación de la población, equipo y recursos económicos adecuados, hacen que el cumplimiento de la legislación sea insuficiente (Castro., 2008)

El total de biomasa húmeda generada en el 2012 en Costa Rica, fue de unos 27 millones de toneladas (Coto, 2013), de los cuales los sectores agrícola y de aserraderos representan el 52,7% mientras que en biomasa seca los sectores agrícolas y forestales representan un 55,4%. (Reto, 2006).

Los subproductos y residuos provenientes de diferentes agroindustrias, conteniendo cantidades importantes de celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina, son sustratos atractivos para la producción de enzimas de aplicación industrial, principalmente de aquellas que son inducibles, entre las que destacan: las celulasas, las hemicelulasas, las xilanasas y las pectinasas, las cuales marcaron una época en la historia de la biotecnología (Saval, 2012).

Los basidiomicetes presentan algunas enzimas ligninolíticas como la lacasa, la lignina peroxidasa y la peroxidasa dependiente de manganeso (Okamoto et al, 2000; Ohga, 2000). Algunos derivados de la lignina, influyen en la producción de enzimas como la lacasa, que son las que detoxifican los compuestos inhibitorios (Savoie et al, 1995).

Con el cambio climático la acumulación de residuos se ve en aumento, ya que los microorganismos no pueden ejercer su función descomponedora (Sánchez, y col, 2008). En caso de que el procedimiento lo pudieran realizar, al menos parcialmente, hongos que produzcan enzimas tales como la manganoso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13), lignina peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14), fenol-oxidasa (Pox, lacasa, EC 1.10.3.2) o la peroxidasa versátil (VP, EC 1.11.1.13), se reducirían costos y disminuiría la contaminación.

La lacasa, o fenol-oxidasa, es una enzima muy importante en la degradación de la lignocelulosa y también en la industria. Por esto tiene una gran importancia económica, y se están llevando a cabo diversos estudios para conocer su valor de actividad en cultivos de hongos lignocelulíticos, y posibles métodos de inducción.

Sin embargo, para la extracción de celulosa es necesario solubilizar la lignina y dado que este compuesto es recalcitrante, el material se somete a diferentes tratamientos térmicos o químicos conocidos como pulpeo; estos procesos son caros, contaminan gran cantidad de agua en los lavados de la pulpa, y ocasionan daños ambientales por los productos químicos utilizados.

Alrededor de 1,5 millones de toneladas métricas de rastrojo de piña anualmente se transforman en desechos y representan más de la mitad de la biomasa implicada, llegando a duplicar el valor del producto mismo (Alpízar, 2007).

El manejo para la eliminación de residuos, en ocasiones representa un problema debido a su gran volumen y a la lenta degradación. Esta situación hace que el productor recurra al uso de herbicidas y quemas en algunos casos (Quesada, 2003).

Por estos motivos, ha sido necesario buscar alternativas para contrarrestar estos efectos negativos mediante el uso de enzimas específicas que atacan a la lignina (Scott et al. 1998), como la lacasa.

Existen varias perspectivas en relación con nuevas enzimas fúngicas de gran potencial para superar el reto de los sustratos recalcitrantes, entre estas se destacan la regulación fisiológica de las enzimas, uso de nuevos inductores para mejorar la producción, uso de múltiples cepas microbianas o mezclas de enzimas, clonación de

genes para monitorear nuevas generaciones de enzimas y aplicaciones de nanobiotecnología en enzimología (Godliving, 2012).

Teniendo en cuenta lo antes expuesto se propuso el desarrollo del presente trabajo, con el fin de aislar microorganismos productores de lacasas y determinar las modificaciones en el patrón de la producción enzimática, durante el crecimiento de las cepas de *Trametes sp.*, *Ganoderma sp.*, *Tricoderma sp.*, *Fusarium sp.*, *Cyathus sp.*, *Aspergillus niger* y los hongos A y B, cultivados en medio Wunder para su posterior selección del hongo con mayor actividad enzimática, la extracción y purificación parcial de la enzima y su utilización como biodegradadora de tres sustratos: pinzote de banano, rastrojos de piña y bagazo de caña.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad enzimática de la lacasa producida por diferentes especies de hongos mediante fermentación en cultivo sumergido para su potencial uso a nivel industrial.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Producir la enzima lacasa mediante fermentación en frasco agitado en diferentes especies de hongos.
2. Evaluar el crecimiento de los hongos en el medio de cultivo y determinar la actividad lacasa para seleccionar el mejor hongo productor de la enzima y su posterior purificación.
3. Extraer y purificar parcialmente la enzima para su utilización en la degradación de residuos agroindustriales.
4. Medir la actividad enzimática, eficiencia y subproductos generados de las enzimas purificadas sobre desechos lignocelulósicos (pinzote de banano, bagazo de caña y rastrojo de piña).

## **CAPITULO II**

## REVISIÓN DE LITERATURA

### 1. Desechos agroindustriales

Con el desarrollo de la agricultura intensiva, la incorporación y utilización de los restos vegetales en el terreno de cultivo resulta un problema, convirtiendo a estos materiales en residuos a eliminar. Los desechos agrícolas, que se producen a partir de restos de origen vegetal, necesitan en su proceso un pretratamiento de la materia prima que permita su descomposición.

Este tratamiento emplea ácidos, temperaturas elevadas, y quemados lo que da lugar a productos secundarios contaminantes y a un gasto energético muy alto (Blázquez, 2007).

A nivel mundial la alta producción industrial de residuos y el inadecuado manejo de los mismos está generando el deterioro acelerado del planeta y ante ello, Costa Rica no es la excepción. Cada vez es más frecuente la acumulación de desechos, los cuales son fuente de toxicidad para aguas y suelos, así como generan un gran impacto sobre la salud humana. La casi inexistente disponibilidad de procedimientos para su remoción muestra la necesidad de alternativas costo-efectivas que garanticen la prevención de los daños al ambiente y la salud de la población (Ivester y Neefus, 2010).

Al Investigar nuevas oportunidades de aprovechamiento de los residuos, se hace necesaria su caracterización para conocer su composición, la calidad de sus componentes y la cantidad que se genera, con esto se pueden definir las tecnologías más apropiadas para su aprovechamiento y posterior tratamiento. Es de esperar que después de su aprovechamiento se genere un siguiente residuo que podría tener otra aplicación, o bien, convertirse en un desecho (Saval, 2012).

Una de las principales problemáticas ambientales es la alta producción de desechos agroindustriales, los cuales, en la mayoría de los casos, son quemados o arrojados a los basureros, quebradas y ríos sin ningún tratamiento previo y contribuyen de esta manera a la degradación de los ecosistemas (Velastegui, 2004; Rodríguez et al, 2003).



En muchos países, quemar residuos agrícolas —tallos, pastos, hojas y cáscaras, entre otros— continúa siendo la manera más económica y fácil de deshacerse o reducir el volumen de materiales combustibles producto de las actividades agrícolas, a pesar de que no se trata de un manejo ambientalmente aceptable. Se estima que la quema de biomasa, como madera, hojas, árboles y pastos —incluidos los residuos agrícolas—, produce el 40% del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y 32% del monóxido de carbono (CO) emitidos al ambiente, a escala mundial (Kambis y Levine 1996, Lemieux et al, 2004).

Además, desde el punto de vista de la salud pública, lo anterior resulta preocupante ya que durante los procesos de combustión incompletos se producen dioxinas, contaminantes altamente tóxicos y cancerígenos (CCA, 2014), así como afecciones pulmonares, dermatitis, úlceras, diarreas, e infecciones (COOPSA, 2006). Por ello la importancia de encontrar alternativas de remediación biológica que sean amigables con el ambiente y que ayuden a disminuir el problema de contaminación presente en la actualidad.

Si tomamos en cuenta la biomasa seca total de los residuos, 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, como es el caso de los cañaverales (ICIDCA, 1988). Los tres cultivos, antes mencionados, aportan la mayor cantidad de tn/Ha de biomasa húmeda (Coto, 2013). Los valores mencionados con anterioridad fueron determinantes para la selección de los residuos empleados en el presente estudio.

La cosecha no mecanizada, como el uso del fuego, empleada en el cultivo de la caña de azúcar (*Sacharun officinarum*) tiene consecuencias negativas en el medio ambiente, especialmente en el suelo, con la destrucción de microorganismos, disminución del material orgánico disponible en el mismo, pérdida de nitrógeno, entre otros y en la atmósfera: emisión de humo y gas hacia la atmósfera, incremento de los niveles de ozono y del monóxido de carbono (Larios, 2010).

Además, el bagazo de caña, con el transcurso del tiempo se enmohece y puede contener grandes cantidades de esporas de las que una parte se libera hacia el ambiente, pudiendo producir enfermedades (Méndez, 1981).

Por otro lado, los efectos de los desechos, procedentes del procesamiento de piña (*Ananas sativus*), sobre el suelo están relacionados principalmente a las prácticas de enterramiento de éstos sin tratamiento previo. La falta de controles técnicos y de consideraciones sobre la capacidad de carga del sitio, pueden generar problemas serios por acción de los líquidos generados por la lixiviación de los desechos, los cuales poseen un nivel alto de acidez. Otro de los efectos sobre el ambiente de la producción de piña es la proliferación de la mosca de los establos (*Stomoxys calcitrans*), debido al manejo inadecuado de los desechos y rastros del cultivo (Tomas y col, 2006).

El efecto sobre el aire se expresa específicamente por la proliferación de malos olores en las áreas cercanas a las zonas de disposición tanto de los desechos sólidos como líquidos (Quijandría, et al, 1997).

Tampoco debemos obviar que la actividad bananera genera impactos en suelo, aire, agua, flora, fauna y paisaje. La acumulación de desechos de banano (*Musa paradisiaca*) y pesticidas, la pérdida de biodiversidad y la contaminación en las zonas bananeras, son algunas de ellas (Elbehri, y col, 2015).

Los tres principales componentes de las paredes celulares de estos residuos agrícolas son la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. La hemicelulosa es un polisacárido insoluble en agua, pero soluble en ácidos o álcalis, y se encuentra estrechamente ligado a la lignina (biopolímero aromático, recalcitrante y difícil de biodegradar) (Kues y Liu, 2000, Van Soest, 1994). La hemicelulosa y la lignina forman una red hidrofóbica, en la cual las microfibrillas de celulosa están embebidas (Carpita y Gibeut, 1993). La red restringe el acceso de las bacterias y de enzimas celulolíticas hacia las microfibrillas.

Otros factores que limitan el acceso enzimático son los grupos acetilo de la hemicelulosa (Kumar y Wayman, 2009), el índice de cristalización de las micro-fibras de celulosa (Chang y Holstzaple, 2000) y la superficie disponible para el acceso enzimático (Allen y Mertens, 1998). Los tratamientos químicos tienen como objetivo romper la unión entre los carbohidratos estructurales y la lignina (Moisier et al, 2005; Sundstol y Coxworth, 1984). Dentro de las alternativas para el aprovechamiento de esta materia prima, está su uso como sustrato en el cultivo de los hongos basidiomicetos (García y Torres, 2003).

## **2. Enzimas de aplicación industrial**

Las enzimas son proteínas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y que han sido utilizadas a lo largo de la historia, principalmente en las industrias farmacéuticas y alimenticias. Su uso en la extracción de compuestos bioactivos es una alternativa ecológicamente amigable en comparación con los métodos de extracción tradicionales que utilizan solventes. Las enzimas tienen ventajas sobre los tratamientos químicos, ya que son catalizadores altamente específicos y trabajan en condiciones de reacción moderadas, lo cual se traduce en una menor generación de residuos y subproductos, así como en un menor consumo de energía. Por lo tanto, las enzimas pueden utilizarse en el pretratamiento de los residuos, la extracción de compuestos e incluso en la modificación y síntesis de nuevas moléculas a partir de los compuestos bioactivos (Puri et al., 2012), así como en la aplicación industrial (Martinez-Anaya, 2008).

Aunque se ha utilizado el término genérico “ligninasa”, es preferible referirse a “enzimas modificadoras de lignina” (LMEs) ya que no catalizan reacciones hidrolíticas sino oxidativas (Fig 1) (Winquist et al., 2008). Las LMEs comprenden las enzimas peroxidasas y fenol-oxidasas del tipo lacasas (Shah y Nerud, 2002).

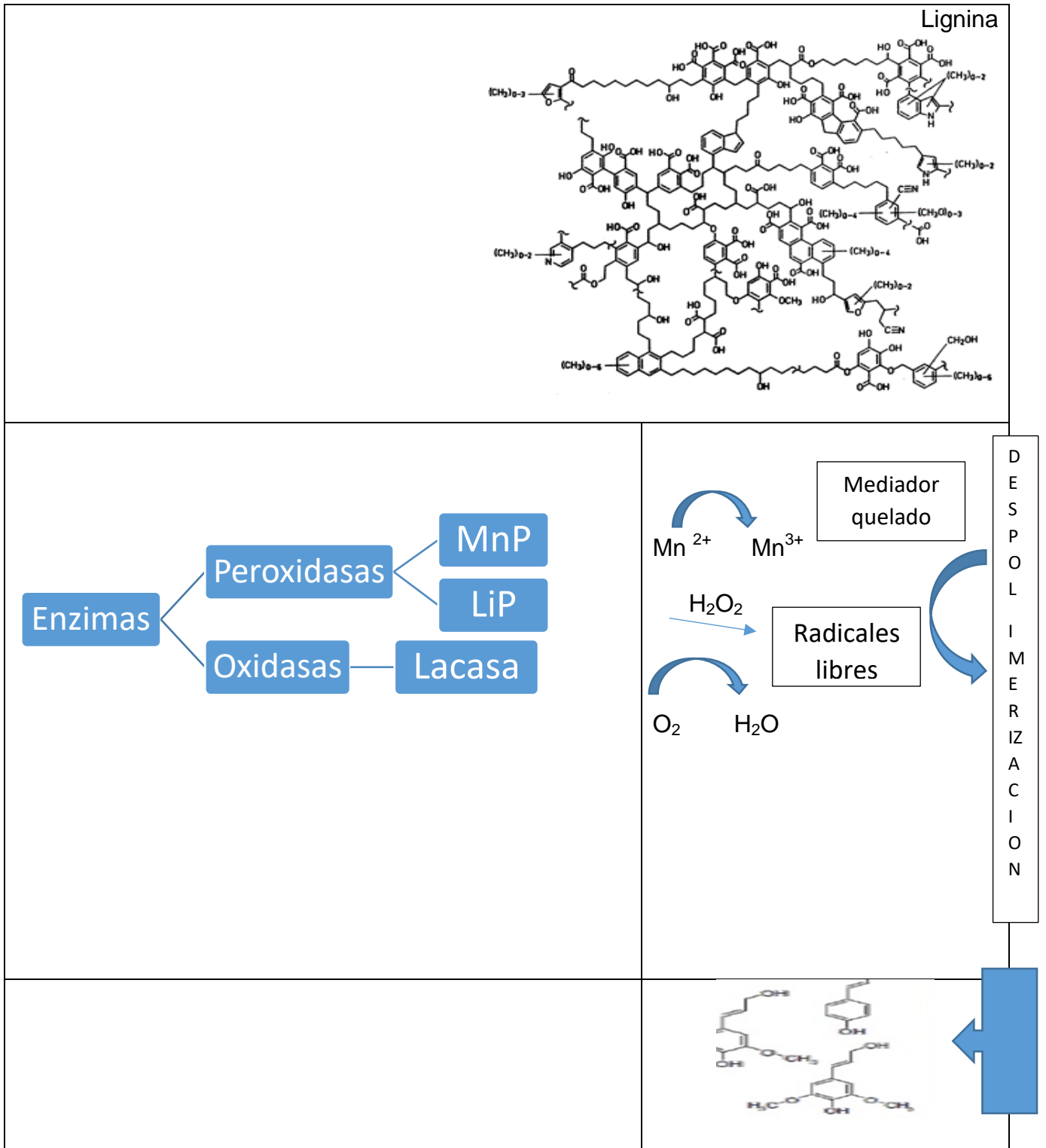


Figura 1. Enzimas que participan en el proceso de degradación de lignina. Tomado de Dashtban et al, 2010 y modificado.

La enzima lacasa es una de las pocas enzimas que han sido estudiadas desde finales del siglo XIX en *Rhus vernicifera*, el árbol de la laca japonesa (Yoshida, 1883). Unos años más tarde se encontró también en los hongos. Aunque son conocidas desde hace mucho tiempo, las lacasas, atrajeron una atención considerable sólo después del comienzo de los estudios de degradación enzimática de la madera por medio de los hongos de pudrición blanca (Baldrian, 2006, Pressler et al, 2009, Arboleda, 2010, Murrieta, 2002).

La lacasa (1,2-benzenediol: oxígeno óxidorreductasa (EC 1.10.3.2) es un enzima oxidasa multicobre que abunda en la naturaleza, en plantas, hongos y procariontes (Telke et al, 2009). Se caracteriza por poseer 3 centros catalíticos: Un centro T1, mononuclear, se encarga de la oxidación del sustrato, mientras que dos centros T2 y T3, forman un centro trinuclear, el cual se encarga de reducir el oxígeno molecular a agua (Alcalde y Bulter, 2003; Arias *et al.*, 2003). Se cree que participan también en la biosíntesis de la lignina, pero el mecanismo se desconoce (Loneragan *et al.*, 1997). Entre los sustratos naturales de las lacasas se incluyen fenoles, polifenoles, anilinas, aril-diaminas, fenoles metoxi-sustituídos, hidroxí-indoles, benzenotioles, compuestos metálicos orgánicos e inorgánicos, entre otros (Kunamneni *et al.*, 2008a).

La máxima actividad de la enzima lacasa varía en un rango de pH que oscila entre 2.4 y 8.5. Para la oxidación de fenoles con lacasas de hongos, el pH óptimo varía entre 3 y 7, estas condiciones dependen de la naturaleza de la enzima y no del sustrato (Thurston, 1994).

Según Johannes y Majcherczyk (2000) todos los radicales que se obtienen de la oxidación con la lacasa podrían actuar como mediadores. Su desventaja es su alto precio (Johannes y Majcherczyk, 2000a). La lacasa en presencia de ciertos mediadores se ha empleado para oxidar hidrocarburos policíclicos aromáticos, fenólicos clorados, dioxinas, pesticidas, explosivos, lignina y colorantes (Rodríguez *et al.*, 1999).

El ácido 2,2 azino bis (3-etilbenzo tiazolin-6 sulfónico) (ABTS) (Fig 2) es el mediador más estudiado debido a su alta estabilidad y a que su química redox es conocida. Sin embargo, el mecanismo por el cual interactúa con la lacasa se desconoce (Collins *et al.*,

1998). A pesar de la importancia que tiene el uso de los mediadores, se sabe poco acerca de su mecanismo de reacción.

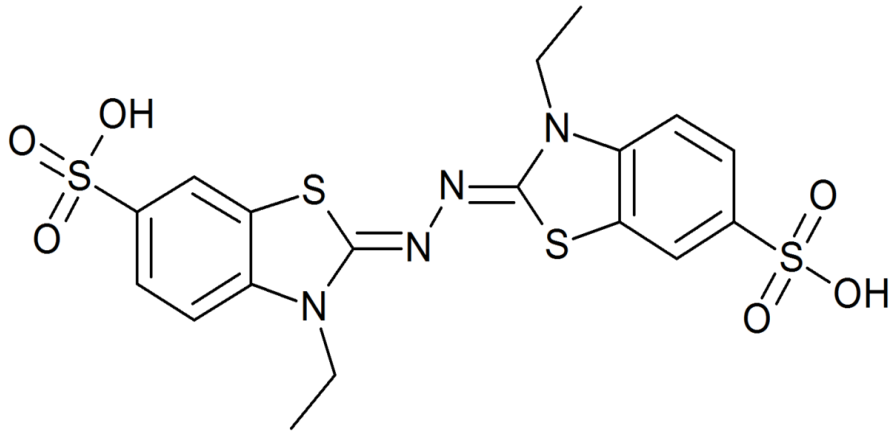


Figura 2. Estructura del ABTS

Algunas teorías han sido planteadas, pero falta ampliar los conocimientos de la forma de acción del ABTS para aumentar y mejorar su aplicación en campos todavía no desarrollados. Potthast *et al.* (1996) manifiestan que el ABTS transfiere un electrón a la enzima para activarla, de tal forma que actúa como un co-oxidante más que como un mediador electrónico del sustrato, por lo que debe haber un mecanismo para su reciclamiento regresando a su forma reducida y quedando así disponible para un subsecuente ciclo catalítico (Fig 3).

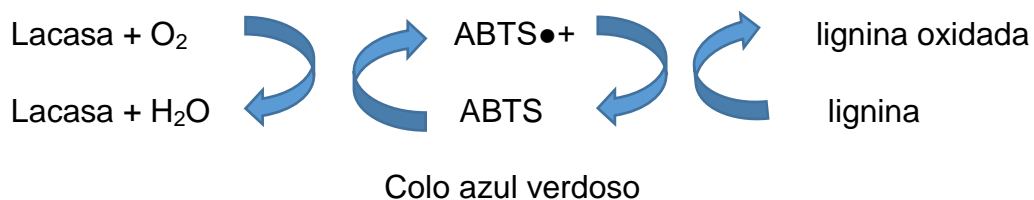


Figura 3. Esquema de acción de la enzima lacasa con el ABTS. Tomado de Solis-Oba y col, 2007 y modificado.

Las enzimas lacasas se pueden ver afectadas por algunos disolventes, disponibilidad de oxígeno, agitación, fuentes de carbono, cambios bruscos de pH y de temperatura que las pueden desnaturalizar, perdiendo así su actividad (Thurston, 1994).

Se ha demostrado que las fuentes de nitrógeno juegan un papel importante en la síntesis de lacasa por hongos de pudrición blanca (Osma, Rodríguez Couto, & Toca Herrera, 2007). Según Eggert la actividad de lacasa en *P. chrysosporium* fue sólo detectable bajo un alto contenido de nitrógeno de 24 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Eggert, Temp, & Eriksson, 1996). Amezcua, y colaboradores reportaron resultados similares en *Pleurotus ostreatus* para la producción de lacasa utilizando peptona, extracto de levadura y triptona como fuente de nitrógeno (Amezcua et al, 2009).

Estudios realizados muestran que la producción de lacasas puede ser considerablemente estimulada por la presencia de inductores, principalmente se pueden encontrar compuestos fenólicos aromáticos o relacionados con la lignina o los derivados de ésta; otra opción es el cobre que aunque es un compuesto no lignolítico hace parte de la estructura de la enzima (Loera, et al, 2006; Sandoval y Ospina, 2008).

El efecto de los inductores en la producción de lacasa es variado, depende del microorganismo y del medio de cultivo utilizado. En general el alcohol veratrílico, guayacol, bagazo de caña de azúcar y paja de trigo resultaron ser excelentes inductores de lacasa. Daljit & Paramjit, 2001 reportaron que el alcohol veratrílico aumentaba la producción de lacasa hasta doscientas veces en *P. radiata*.

Moldes y colaboradores reportaron una actividad de 22.55 kU/L en la producción de lacasa con *Trametes hirsuta*, utilizando la tiamina y el sulfato cúprico como suplemento de cobre para inducir la producción de la lacasa (Moldes et al, 2002). Otros reportes indican una actividad máxima de 90 U/g, utilizando etanol como inductor en *Pycnoporus cinnabarus* (Meza y col, 2005).

Por el contrario, aniones como haluros, azidas, cianidas e hidróxidos pueden unirse al sitio activo trinuclear y actuar como inhibidores, al provocar una ruptura en la movilidad de electrones. Otros inhibidores incluyen iones metálicos  $\text{Hg}^{2+}$ , ácidos grasos, compuestos sulfhidrilos, hidroxiglicinas. Estos compuestos actúan como quelantes

sobre el Cu (II), modifican los residuos de amino ácidos o causan un cambio conformacional en la glicoproteína (Collins y Dobson, 1998; Saperrat, 2002).

La amplia variedad de sustratos que pueden ser degradados por las lacasas las hace útiles para diferentes procesos biotecnológicos tales como la remoción de compuestos fenólicos, xenobióticos, entre otros compuestos aromáticos (Abadulla et al., 2000; Kunamneni et al., 2008b, Alcalde et al., 2002, Niladevi, Sukumaran, & Prema, 2007, Osma, 2007). Además son utilizadas para procesos de bioblanqueamientos de las pulpas, decolorar y desintoxicar efluentes generados por la industria de pulpa y papel. (Bourbonnais et al., 1997, Couto S.R y Toca Herrera, 2007, 2006 y 2006a, Bergbauer et al., 1991; Berrio et al., 2007), así como también deslignificación de biomasa lignocelulósica (Rodríguez et al., 2003). El tratamiento con lacasas es menos contaminante debido a que se evita la producción de  $Cl_2$  y  $Cl_2O$  (Camarero, et al, 2004).

Las lacasas también tienen un prometedor campo de acción en la industria de alimentos, allí son utilizadas para modificar la apariencia de comidas y bebidas (Whitaker 2002, Couto, RS y Toca Herrera, 2006, Manjarres et al, 2010), en el proceso de horneado, en la estabilización del vino y en los procesos de clarificación (Minussi, Pastore, & Durán, 2002). Además, se ha reportado su uso para la mejora de parámetros sensoriales al reducir sabores desagradables de los alimentos (Minussi, Pastore, & Durán, 2002) y en el aprovechamiento de desechos procedentes de la industria alimenticia (Rosales et al, 2002).

Las lacasas del mismo modo son útiles para mejorar la producción de etanol combustible, y para el análisis de medicamentos (Mayer & Staplesb, 2002), así como también en el diseño de celdas de biosensores y biocombustibles (Kunamneni, y col, 2007).

### **3. Microorganismos**

Los hongos conforman una importante fracción de la biomasa total microbiana del suelo (Plaster, Edward J. 2000; Porta et al, 2003; Castillo, 2013). Son importantes degradadores aerobios de material vegetal en descomposición en suelos ácidos y durante la producción de abonos orgánicos. Producen enzimas y metabolitos que contribuyen al ablandamiento y a la transformación de sustancias orgánicas. Su



crecimiento ramificado rápido y la intensa actividad degradadora les permiten mantener un equilibrio en los ecosistemas del suelo (Castillo, 2013).

Los hongos degradadores de madera pueden ser separados por su metabolismo en dos grupos principales, los hongos de pudrición café y los de pudrición blanca de la madera. Los hongos de pudrición café destruyen y metabolizan sólo la hemicelulosa y celulosa. Pueden modificar la estructura de la lignina, pero realmente no la pueden metabolizar como fuente de carbono (Ruiz, 2004). Los hongos de pudrición blanca (HPB) poseen la capacidad de degradar lignina completamente en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Catalán, 2004), produciendo al final una madera con una apariencia blanquecina (Vera, 2006). Entre estos últimos se encuentran *Phanerochaete* sp, *Pleurotus* sp, *Ganoderma* sp, *Polyporus* sp, *Xylaria* sp, y *Trametes* sp (Carrillo, 2003). Los hongos de pudrición pertenecen al grupo de hongos superiores denominados Basidiomicetos (Ruiz, 2004).

La degradación de la lignina mediante estos hongos ocurre principalmente durante el metabolismo secundario por medio de enzimas extracelulares oxidativas ligninolíticas, metabolitos de bajo peso molecular y especies reactivas de oxígeno, con el objetivo de mineralizar la lignina para tener acceso a la molécula de celulosa que utilizan como fuente de carbono (Savoie, 1998; Samuels, 1996; Arboleda y Mejía, 2010). Bajo condiciones ligninolíticas, los HPB producen enzimas extracelulares como las peroxidasas y las oxidasas y un metabolito secundario (alcohol veratrílico) (Vera, 2006).

La utilización de sustratos lignocelulósicos insolubles por los hongos, depende de la producción y secreción de enzimas (celulasas, hemicelulasas, ligninasas). Los basidiomicetes presentan algunas enzimas lignolíticas como: la lacasa, la lignina peroxidasa y la peroxidasa dependiente de manganeso (Niladevi, Sukumaran & Prema, 2007; Rodríguez Couto y Sanromán, 2005). La producción de estas enzimas es parte importante en el proceso de colonización y determinante en la producción de cuerpos fructíferos (Giardina et al., 1999; Okamoto et al., 2000; Ohga et al., 2000, Ding, 2010).

La habilidad de los hongos para producir lacasa varía entre especies (Savoie et al., 1995; Savoie, 1998; Mata y Savoie, 1998a). Algunos hongos de pudrición blanca producen las tres enzimas (lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa), algunos sólo dos, o una (Cullen, 1997). Algunos investigadores mencionaron

que no se detecta lacasa en la actividad enzimática de *Phanerochaete chrysosporium* (Cullen y Kersten, 1996; Hammel, 1996), mientras otros autores reportaron que *Ceriporiopsis subvermispora* no utiliza LiP para degradar lignina (Ruiz, 2004).

No podemos obviar que la degradación de la biomasa vegetal es un proceso complejo que involucra la acción sinérgica de un gran número de enzimas extracelulares. Los hongos filamentosos más estudiados con respecto a sus enzimas degradadoras de biomasa vegetal son *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* y el basidiomiceto ligninolítico *Phanerochaete chrysosporium* (Ortiz, 2009).

### **3.1 Características de los microorganismos empleados**

#### **3.1.1 Aspergillus niger v. Tieghem**

**Taxonomía** (Mediavilla et al, 1996)

Reino: Fungi,

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

*Aspergillus niger* se caracteriza por las conidias negras sobre un micelio de color amarillo pálido. Las cabezas conídicas son globosas. Los conidióforos son lisos e hialinos, en ocasiones con un ligero tono marrón. Las conidias son globosas y a menudo muy rugosas en su superficie; miden 4-5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Causa la pudrición del órgano de reserva y se manifiesta en la superficie por una masa de esporas negras.

En estudios realizados, *Aspergillus niger* fue un adecuado sistema biológico en la hidrólisis enzimática ya que degradó la celulosa y se adaptó favorablemente a las condiciones del medio. Se determinó un máximo de producción de azúcares reductores en el día 12, con una cantidad de glucosa de 42787 ppm por 0.25 g de muestra (Mediavilla et al, 1996; García et al, 2012).

La mayoría de las especies de *Aspergillus* se encuentran en lugares donde existe poco oxígeno, por ejemplo compost, suelo, y ambientes polvorientos. También se pueden encontrar viviendo a expensas de otros organismos como plantas, animales y bacterias.

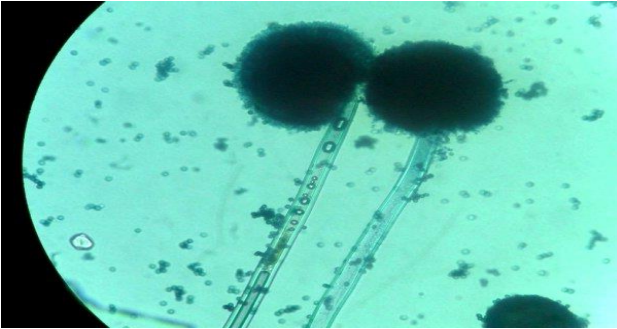


Figura 4. Hongo *Aspergillus niger* observado al microscopio óptico (100x).

### 3.1.2 *Trametes* sp (L.) Lloyd (1920).

#### **Taxonomía**

Reino: Fungi

División: Basidiomycota

Clase: Agaricomycetes

Subclase: Agaricomycetidae

Orden: Polyporales

Familia: Polyporaceae

Género: *Trametes*

El hongo *Trametes* sp posee un carpóforo anual sésil no estipitado o pseudoestipitado, pero por lo general saliente, con un tamaño que puede llegar a los 10 cm de ancho, con un radio de unos 5 cm aproximadamente, y cuyo grosor es apenas de unos milímetros. Tiene forma semicircular o de abanico, abriéndose a partir del sustrato, y salen siempre en grupos más o menos numerosos e imbricados. Tiene múltiples colores dispuestos por la superficie de forma concéntrica, desde tonos claros casi blancos hasta prácticamente negros, pasando por tonos marrones o grises de distintos matices. Su superficie es vellosa en los especímenes jóvenes, quedando glabra posteriormente, y el

borde se presenta ondulado de manera irregular. Himenio formado por poros de pequeño tamaño, hasta 5 por mm, generalmente redondeados, a veces un poco angulosos, de color blanco, cremas con el tiempo. El pie es muy corto y enterrado en el sustrato o inexistente, por lo que consideramos a esta especie como sésil. La carne muy dura de color blanco, coriácea y fibrosa (Chandler, 2001).

Esta especie fructifica sobre madera de árboles planifolios, coníferas, e incluso sobre algunos frutales, provocando en el árbol una podredumbre blanca. Es un hongo muy frecuente y extendido que puede hacer acto de aparición en cualquier época del año si las condiciones ambientales son adecuadas.



Figura 5. Hongo Trametes sp recolectado en la zona de Alajuela.

### **3.1.3 Ganoderma applanatum.**

#### **Taxonomía (Curtis) P.Karsten (1881)**

Filo: Basidiomycota

Clase: Agaricomycetes

Orden: Polyporales

Familia: Ganodermataceae

Género: Ganoderma

Especie: *G. applanatum*

*Ganoderma applanatum* es un hongo coriáceo, con un sombrero generalmente arriñonado, de color variable, de marrón oscuro a marrón rojizo, con aspecto de haber

sido recubierto de una capa de laca; con un pie esbelto aunque algo tortuoso en posición lateral. La corteza dura cerosa tiene una superficie nudosa y la carne es de color marrón rojizo oscuro con una textura fibrosa. Las esporas son liberadas de los poros situados en la parte inferior del hongo. Libera grandes cantidades de esporas de color marrón que se acumulan en otros cuerpos fructíferos y en el tronco del árbol huésped. Es la única fuente conocida de un grupo de triterpenos, conocido como ácidos ganodéricos, que tienen una estructura molecular similar a las hormonas esteroideas.

Además, son fuente de ergosterol, cumarina, manitol, lactonas, y alcaloides. A diferencia de muchos otros hongos, que tienen hasta un 90% de contenido de humedad, los Ganoderma solo contienen alrededor de 75% de agua. Es un género de hongos poliesporosos que crecen en madera.



Figura 6. Hongo Ganoderma sp recolectado en la zona de Alajuela.

#### **3.1.4. Fusarium sp**

##### **Taxonomía (Groenewad (2004); Díaz de Castro et al, 2007)**

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: Deuteromycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae.

Género: Fusarium

Dentro de los hongos filamentosos el género *Fusarium* es, sin duda, uno de los más importantes. Posee microconidias en forma oval con una o dos células, en falsas cabezas. Los conidioforos pueden ser cortos, simples o ramificados. Las macroconidias se forman en esporodoquios, generalmente de tres a cinco septos. Las clamidiosporas son terminales o intercalares, generalmente redondeadas (Agrios, 1996, 2005; Subramanian, 1983).

Los representantes de éste género, están distribuidos universalmente. Es un importante degradador de madera de árboles muertos, cumpliendo un relevante rol como reciclador de materia orgánica. Sin embargo, es común encontrarlo en sistemas agrícolas como saprofito sobre rastrojos de cultivos en descomposición (Armentrout, 1988; Subramanian, 1983).



Figura 7. Hongo *Fusarium* sp observado al microscopio (100X).

### **3.1.5 *Cyathus striatus* (Huds.) Willd. (1787)**

#### **Taxonomía**

División: Basidiomycota

Clase: Agaricomycetes

Orden: Agaricales

Familia: Nidulariaceae

Género: *Cyathus*

Especie: *striatus*

El hongo *Cyathus striatus* se le conoce como hongos nido (Velasco, et al 2011) ya que posee estructuras parecidas a huevos, lo suficientemente grandes como para confundirlas con semillas, que son estructuras reproductivas que contienen esporas. El ciclo de vida permite reproducirse sexual o asexualmente.

Varias especies producen compuestos bioactivos, algunos con propiedades medicinales (Allbutt, 1971; Krzyczkowski, 2008; Kang, 2008) y enzimas que degradan la lignina, las cuales pueden ser útiles en la biorremediación (por ejemplo la especie *C. bulleri* contiene lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa) Muchas especies de *Cyathus* tienen actividad antifúngica contra patógenos humanos, como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* (Liu y Zhang, 2004). Los miembros del género crecen sobre la madera en descomposición o detritos leñosos, en estiércol de vaca o caballo, o directamente en suelo rico en humus.



Figura 8. Hongo *Cyathus* sp recolectado en la zona de Barva, Heredia

### 3.1.6. *Trichoderma* sp

#### **Taxonomía**

División: Basidiomycota

Filium: Ascomicetes

Orden: Eurotiales

Familia: Hipocreacea

Género: *Trichoderma*

Las colonias de *Tricoderma* sp son algodonosas al inicio y luego se compactan y esporulan tomando color verde de textura granular formando parches concéntricos.

Presenta hifas hialinas septadas, conidioforos, fiálides y conidios. Los conidioforos son hialinos, ramificados y pueden ocasionalmente disponerse en forma piramidal. Las fiálides son en forma de botella unidas a los conidioforos en ángulo recto. Las fiálides pueden encontrarse solitarias o en dispuestas en grupo. Las conidias miden 3  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximadamente de forma redonda u ovalada. Produce las enzimas: endoquitinasas, proteasas, exoglucan- $\beta$ -1,3 glucosidasas, y endoglucan- $\beta$ -1,6 glucosidasas. Este hongo filamento se distribuye en el suelo, plantas, vegetación muerta y madera. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales, son colonizadas rápidamente por estos microorganismos.

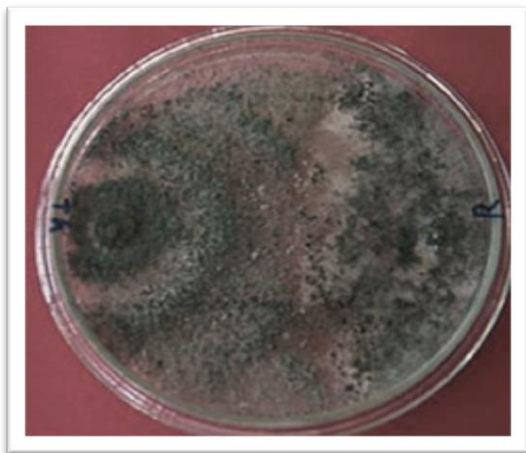


Figura 9. Hongo *Tricoderma* sp en agar PDA.

Como hemos mencionado con anterioridad las lacasas de origen fúngico han sido ampliamente estudiadas y en la actualidad tienen variados usos biotecnológicos. Sin embargo, un serio problema se ha presentado con la explotación industrial de estas enzimas fúngicas y han sido los bajos niveles de producción por las especies nativas.

La producción de lacasas por microorganismos se realiza a través de fermentación en estado sólido (FES) y fermentación sumergida. Aunque la fermentación sumergida es la más utilizada industrialmente, la FES ofrece muchas ventajas sobre la fermentación



sumergida, tales como: mejor productividad debido a una mayor producción de biomasa, mayores rendimientos de producto en más cortos periodos de tiempo, menores vertimientos de agua, menores requerimientos de energía y medios de fermentación más simples, mejor circulación de oxígeno, simula el hábitat natural de los hongos y menos esfuerzos en los procesos aguas abajo del sistema. Además, la FES ofrece la posibilidad de usar subproductos y desechos de la industria de alimentos y agrícola como materias primas, haciendo el proceso más eficiente (Niladevi, Sukumaran, & Prema, 2007; Meza y col, 2005; Rodríguez Couto & Sanroman, 2005). Estudios realizados sobre el análisis en los costos de producción de lacasa muestran que las enzimas producidas por fermentación en estado sólido tienen un precio final más bajo que las obtenidas cuando se cultivan bajo condiciones de fermentación sumergida.(Osma, Toca-Herrera, y Couto, R 2011).

Existen reportes de investigaciones sobre la obtención de lacasa, lignina peroxidasa, y xilanasas en residuos de banano utilizando *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajorcaju* y *Trametes pubescens* (Reddy et al., 2003; Osma et al, 2007) Otros estudios se han enfocado en la evaluación de lacasa, manganeso peroxidasa y ligninoperoxidasa utilizando *Pleurotus djamor* y *Lentinus crinitus* en residuos de plátano y aserrín (Granda et al. 2005; Motato et al. 2006).

Mussatto et al, 2009 obtuvieron fructooligosacáridos y  $\beta$  fructofuranosidasa en *Aspergillus japonicus*, para su utilización en la industria farmacéutica y de alimentos. Se reporta la producción de dextrano y fructosa a partir de cáscara de naranja, piña y cachaza de caña, utilizando una cepa de *Leuconostoc mesenteroides* (Rodríguez & Hansen, 2007).

También se reporta la producción de xilanasas en hongos aislados de residuos de paja de trigo, paja de arroz y bagazo de caña de azúcar (Abdel & El, 2001). Fanchini et al. (2010), utilizaron bagazo de caña, como sustrato empleando la cepa *Penicillium janczewskii*, en cultivo sumergido a nivel de laboratorio.

## **CAPITULO III**

# METODOLOGÍA

## 1. Microorganismos

Los hongos *Trametes versicolor* y *Ganoderma applanatum* fueron recolectados en troncos que se ubicaban en un lote de la región de Alajuela, mientras que la especie *Cyathus striatus* fue recolectada sobre troncos de un lote situado en Barva de Heredia. Una vez colectados los materiales se depositaron en cajas Petri, esterilizadas previamente, y se llevaron al laboratorio. Por otro lado, los hongos *Tricoderma sp* y *Fusarium sp* fueron donados por el Laboratorio de Control Biológico de la Escuela de Ciencias Agrarias de la UNA. Además, la cepa de *Aspergillus niger* fue donada por el laboratorio de Microbiología de la Escuela de Biología de la UNA. Las cepas de hongos se mantuvieron en cajas de Petri con agar papa dextrosa (PDA, DIFCO) a 28°C y un pH de 5, durante 10 días antes de ser reactivados. Una vez que los hongos crecieron, se refrigeraron a 4 °C para su mantenimiento (Usnayo, 2007). Tanto el medio como las cajas Petri fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 min. Las cajas fueron observadas para descartar cualquier tipo de contaminación.

## 2. Desechos agroindustriales

Los desechos agroindustriales fueron obtenidos de subproductos agrícolas de banano, caña de azúcar y piña. El pinzote de banano fue colectado en Alajuela y los otros dos residuos son procedentes del mercado de Heredia.

## 3. Diseño

El estudio se dividió en dos partes. Una primera parte abarcaba el screening de varios hongos para la selección de la cepa con mejor actividad enzimática. La segunda parte incluía la extracción, purificación parcial de la enzima y su posterior ensayo con los sustratos. En la investigación se aplicaron para las pruebas cualitativas y cuantitativas un diseño completamente al azar (DCA) unifactorial (Gutiérrez y de la Vara, 2008) con tres repeticiones. La variable independiente está constituida por los hongos degradadores de lignina, mientras que las variables dependientes fueron la biomasa, la

glucosa, la cantidad de proteínas solubles, la actividad enzimática, el cambio de color del medio y la degradación de lignina.

#### 4. Procedimiento

La actividad en el laboratorio incluyó: la activación de los hongos lignocelulíticos a estudiarse, la evaluación cualitativa y cuantitativa de la enzima lacasa, la selección del hongo mejor productor de enzima lacasa, la extracción y purificación parcial de la enzima lacasa, y la medición de lignina en los tres sustratos que contenían la enzima parcialmente purificada.

##### 4.1 Reactivación de los hongos degradadores de lignocelulosa

Las cepas de hongos fueron sembrados en caldo extracto de malta (AEM, SIGMA), durante 5 días a 28°C y agitados a 100 rpm. En los hongos cultivados en AEM, la observación se concentró en las características estructurales tales como: forma de crecimiento, color de la cepa fúngica y textura (Usnayo, 2007).

##### 4.2 Preparación del pre inóculo

Seis fragmentos (5 mm  $\varphi$ ) 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. Del hongo que creció 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.

Cuadro 1. Composición del medio Wunder modificado para crecer el inóculo.

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración g/l</b>
Glucosa	10.0
Extracto de malta	1.0
NaNO <sub>3</sub>	1.33
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.66
FeSO <sub>4</sub>	0.013
CuSO <sub>4</sub>	0.010
MnSO <sub>4</sub>	0.667
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.1334
NaCl	0.1334
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1667
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.159

El pH fue ajustado a 5 (Herrera y Rosas, 2003).

### 4.3 Extractos enzimáticos

El fluido extracelular se obtuvo centrifugando a 6000 rpm durante 30 min, a temperatura ambiente (Centrifuga Eppendorf 5804-R). Se tomaron muestras por triplicado al tiempo 0, 2, 5, 7, y 10 días de cultivo. A estas muestras se les realizaron pruebas cualitativas (ensayo de placas) y cuantitativas, como glucosa, contenido de proteínas totales, producción de biomasa, y la actividad enzimática de la lacasa (UL) como lo describe Bourbonnais et al, 1990.

### 4.4 Presencia de enzima lacasa en un medio con ABTS

Se tomaron 6 mm de micelio del hongo previamente sembrado en agar PDA y se sembraron en placa Petri, que contenía 15 mL de medio de agarosa (0.5%), y 0.5 mM de ABTS por mL en buffer acetato de sodio (pH 4.5, 0.1 M). Se observó y se midió el halo desarrollado durante 8 días. El desarrollo de un color verde azulado intenso, alrededor, fue considerado como positivo para actividad lacasa. (Córdoba, 2009).

El Índice de Potencia (IP) es una herramienta (Lalita y Pasher 2014) que permite de manera rápida determinar la capacidad de los hongos de secretar enzimas. (De la Rosa-Hernández *et al.*, 2014).

$$IP = \frac{\text{area del halo de actividad}}{\text{area de crecimiento de la colonia}}$$

El hongo *Trichoderma sp.* fue empleado como control positivo para actividad enzimática lacasa.

### 4.5 Actividad de la enzima lacasa (UI)

Las muestras obtenidas a los tiempos de cultivo ( $t_0$ ,  $t_2$ ,  $t_5$ ,  $t_7$ ,  $t_{10}$ ,  $t_{12}$ ,  $t_{14}$ ), fueron filtradas con papel de filtro Whatman No 1 usando una bomba de vacío (marca Boeco) y posteriormente a través de filtros de fibra de vidrio con un poro de 1.2 mm de diámetro. Luego, los extractos enzimáticos se centrifugaron a 5000 rpm durante una hora y el sobrenadante se almacenó a 4°C para su posterior medición de actividad enzimática. Previamente se añadió un inhibidor de proteasas.

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+. Se añadieron 3000 µl del extracto enzimático, luego 1500 µ 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 medidas 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 a 420 nm mediante la siguiente ecuación (Chaparro y Rosas, 2006):

$$AE = \frac{\Delta DO \times fd \times Vt}{\Delta t \times \xi \times L \times V_{enz}}$$

Donde:

AE: actividad enzimática en unidades internacionales por L de disolución de enzima (UL<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>, para ABTS)

L: longitud de celda (cm)

V<sub>enz</sub>: Volumen de la solución de extracto crudo utilizado (mL)

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

En una primera parte del estudio de actividad enzimática se seleccionó el hongo que mostró mayor actividad enzimática lacasa para continuar a una segunda etapa donde se midió nuevamente la actividad enzimática y se purificó parcialmente, para posteriormente medir la efectividad de la enzima lacasa sobre los residuos agrícolas.

#### **4.6 Medición de azúcares reductores**

Los azúcares reductores ( $\mu\text{g/mL}$ ) se determinaron mediante el método de DNS (Miller, 1959). Las muestras obtenidas, se analizaron por triplicado. En cada tubo de ensayo se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de la muestra, luego 4 mL de reactivo DNS y se mezclaron en el Vortex. Posteriormente se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de solución madre de glucosa 2 mg/mL, y se volvió a mezclar en el Vortex. Los tubos se colocaron en baño maría por 5 minutos y luego en un baño de agua con hielo por 3 minutos. Transcurrido ese tiempo se dejaron a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 550 nm, contra blanco reactivo en Spectronic 20 D+.

$$ART\ m\ (\mu\text{g}\ \text{glucosa}/\text{mL}) = (i + mA) \times FDm$$

ARTm: azúcares reductores totales en la muestra

i: intersección de la curva de absorbancia vs concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )

m: pendiente de la curva de absorbancia vs concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )

A: absorbancia de la muestra a analizar

FDm: factor de dilución de la muestra, si se diluye antes de agregar los 0.50 mL

#### **4.7 Cuantificación de la biomasa micelial**

Para la determinación de la biomasa en las cepas de hongos se realizó la siembra a partir de discos de micelio colocados en frascos que contenían 6 mL de medio de cultivo líquido. Después de 7 días de incubación a 28 °C, se determinó el peso del micelio retenido en papel de filtro, secado a peso constante en balanza analítica. El contenido micelial se expresó en mg de micelio por mL de medio cultivo utilizado (Salmones y Mata, 2005).

#### **4.8 Determinación de proteínas solubles por el método de Bradford**

La determinación de proteínas fue llevada a cabo por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se prepararon tres diluciones de los extractos de hongos hasta obtener un volumen final de 5 mL. Una vez efectuadas las diluciones se adicionaron 400  $\mu$ L de Reactivo de Bradford, se agitaron los tubos y se dejaron reposar por 10 minutos. Luego se realizó la lectura de la absorbancia a 595 nm, en espectrofotómetro Spectronic 20 D+. El blanco empleado fue un buffer fosfato.

#### **4.9 Purificación parcial de la enzima lacasa del hongo *Ganoderma sp.***

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 desionizada y esterilizado con etanol al 70 %.

Posteriormente se recuperó la muestra, la cual fue analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) con la finalidad de observar la purificación parcial de las muestras antes de su evaluación con los desechos agrícolas.

Para la eliminación de sales se colocó 1 mL del filtrado en membranas de diálisis y posteriormente las membranas se colocaron durante 1 hora en agua destilada. Transcurrido este tiempo se trasvasó el filtrado a un tubo eppendorf. Posteriormente los tubos se colocaron en centrifuga al vacío (Speed vac concentrator marca Thermocientific Savant DNA 120) durante 2 h para concentrar la muestra.

#### **4.10 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes**

La enzima lacasa de *Ganoderma sp* fue parcialmente purificada, usando una serie de pasos que incluían la centrifugación, filtración, ultrafiltración y posteriormente sometida a diálisis y a centrifugación al vacío

La pureza de la enzima lacasa de los cultivos de hongos se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) según el método descrito por Laemmli, 1970. 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). Se utilizó un equipo marca BioRad modelo Mini-PROTEAN<sup>R</sup> y Mini Gel (MES).

Se empleó un gel Bolt Bis-Tris Plus (Invitrogen Thermo Fisher Scientific) de 8 pocillos.

Cuadro 2. Composición de los geles empleados para la electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

Componentes	Gel concentrador 4 %	Gel separador 4 %
Acrilamida 40 %	0.8 mL	0.30 mL
Tampón concentrador	2.0 mL	-
Tampón separador	-	0.75 mL
Agua destilada	5.1 mL	1.92 mL
APS 10 %	80 µL	30 µL
TEMED	8 µL	3 µL

Los tampones correspondientes a cada tipo de gel se prepararon en tris HCl a diferentes pH y concentraciones para garantizar la movilidad de las proteínas en el gel concentrador y la posterior separación según el peso molecular de la proteína en el gel separador. Así 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 µL de buffer de muestra Bolt LDS (4X), 4 µL de agente reductor Bolt NuPAGE (10X) y 26 µL de muestra parcialmente purificada, para un total de 40 µL. Se mezcló en Vortex. Se realizó una centrifugación y se colocó a 70 °C por 10 minutos.

Posteriormente se colocaron los 40 µL de las muestras en los pozos 3-8. En el pozo 2 se colocó el patrón de pesos moleculares. Se mezclaron 20 mL de buffer MES SDS 20 X con 380 mL de agua desionizada y se añadió al tanque Mini gel. 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 agua desionizada, por unos segundos.

## **4.11 Determinación del contenido de lignina**

### **4.11.1 Preparación de la muestra**

Los residuos de bagazo de caña, pinzote de banano, y rastrojos de piña fueron tratados de acuerdo al procedimiento estándar descrito en TAPPI T264 cm-07. Las muestras fueron lavadas para retirar el polvo existente, luego esterilizadas en autoclave y secadas en horno a 60° C (Thermo Scientific) durante tres días. Una vez secos fueron guardados en bolsas selladas e identificadas como RBC, RPB y RCP, respectivamente. Posteriormente fueron molidos y pasados por un tamiz No.20 (0.0331 in) Cole Parmer en molino marca Retsch SM100, con el fin de reducir el tamaño de las partículas y tener mayor área de contacto.

### **4.11.2 Determinación de humedad de los residuos**

Para la determinación de humedad se usaron los procedimientos estándares descritos en TAPPI T257. Se pesó 1 g de cada muestra de residuo agrícola en balanza analítica marca Sartorius y se colocó en horno a 105 °C hasta peso constante. Se dejaron enfriar y por diferencia de peso se calculó el % de humedad.

### **4.11.3 Determinación del porcentaje de materia orgánica (MOLig)**

La determinación de cenizas se basó en la norma UNE 57050. Se pesaron 100 mg del material luego que fuera previamente lavado y secado en el horno a 105 °C. Los crisoles secados a peso constante se llevaron a mufla, a 430 °C por 24 h. Luego se dejaron enfriar en desecador y se pesaron (Nelson y Sommers, 1982).

### **4.11.4 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 lo tiempos  $t_0$ ,  $t_{15}$ ,  $t_{30}$  y  $t_{45}$  y se calculó el porcentaje de lignina por el método Kason. Se colocó un grupo control que contenía solo el residuo agrícola.

La determinación del contenido de lignina de las muestras se realizó según norma TAPPI 222. Se pesó 1 g de cada muestra en balanza analítica (marca Sartorius), se mezcló bien con 15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72% y se dejó reposar 24 horas. Posteriormente

los 15 mL se trasvasaron a otro beaker y se añadieron 560 mL de agua desionizada para pasar de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72% a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 3%. El recipiente se conectó a reflujo y se mantuvo a ebullición durante 3 horas, al cabo de las cuales se dejó sedimentar el material insoluble (lignina), se filtró y se secó a 100 °C durante 1 h. Luego se lavó repetidas veces con agua destilada hasta obtener un pH alrededor de 7 y se secó en horno a 105 °C durante 12 h.

Luego se pesó y se calculó el porcentaje de lignina (Schwanninger et al., 2002).

$$\text{Porcentaje de lignina (\%)} = \frac{(P3 - P2) \times (\%MO \text{ lig}) \times 100}{P1 \times 100 - \%H}$$

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

MOlig: % materia orgánica

H: % agua respecto a a la muestra molida

#### **4.12 Análisis estadístico**

El análisis de varianza (ANOVA), será realizado en el software estadístico Infostat con un nivel de confianza del 95% para los datos que mostraron varianzas homogéneas. 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 Tukey al 95 % de confianza (Martínez de Lejarza, 2004).

## **CAPITULO IV**

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Presencia de enzima lacasa en un medio con ABTS

El criterio de selección de las cepas productoras de enzimas consistió en la utilización del Índice de Potencia (De la Rosa-Hernandez y col., 2014), eligiendo aquellas que presentan los valores mayores del índice para su posible aplicación en estudios posteriores.

Para el análisis del índice de potencia de enzimas lacasas, se sembraron los hongos recolectados en medio de agarosa con ABTS. Los hongos con actividad enzimática positiva presentaron un halo de decoloración verde alrededor del micelio, debido a que la enzima oxida ABTS a su radical catiónico (ABTS<sup>+</sup>) (Fig. 10), lo cual concuerda con lo planteado por Córdoba, 2009.



Figura 10. Halo de oxidación del ABTS en un medio de cultivo inoculado con el hongo *Ganoderma sp.*

Se obtuvieron diferentes resultados en los aislamientos estudiados y según el orden de mayor actividad positiva de lacasa *Ganoderma sp.*, mostró el mejor desempeño (Figura 11) seguido por: *Cyathus sp* > *Trametes sp* > *Tricoderma sp* > hongo B > hongo A > *Aspergillus sp* > *Fusarium sp.*

Cabe resaltar que se obtuvieron resultados interesantes con el hongo *Cyathus striatus* ya que reportes de Saparrat y col., 2002 plantearon que no encontraron actividad

ligninolítica en esta especie. Otros reportes encontrados se han referido a la actividad de diferentes cepas de *Cyathus para* la remoción de colorantes procedentes de la industria textil (Esposito y col., 1991; Salony y col., 2006; Chabra y col., 2008), por lo que resultaría importante continuar con los estudios de esta cepa obtenida en la región de Barva de Heredia, así como también con las aislamientos A y B que mostraron actividad lacasa y no fueron identificadas.

Existe variabilidad en relación al comportamiento de los hongos (Cuadro 3), lo cual podría estar asociado a los desiguales requerimientos de las especies, que pertenecen a diferentes grupos taxonómicos. La edad del micelio es un factor que se debe de considerar para la producción de las enzimas en hongos, ya que influye sobre la detección de las lacasas cuando se toman discos de agar con micelio. Este resultado concuerda con el obtenido por López (2001), el cual observó que la máxima actividad enzimática (actividad lacasa) en dos cepas de *Pleurotus*, se mostró en el micelio que se encontraba en la etapa de madurez; por lo tanto, al hacer el análisis en placa, el micelio debe ser aproximadamente de la misma edad para que no exista interferencia alguna en los resultados (Collins y Dobson., 1997; Palmieri y col., 2000; Rodríguez y col., 2002).

Realizando el análisis correspondiente de los halos de oxidación en las placas, los hongos *Ganoderma sp*, *Cyathus sp*, *Trametes sp* y *Trichoderma sp* fueron los que mostraron el mayor IP, lo cual fue un parámetro importante en la selección de las cuatro cepas que continuaron en estudio.

Cuadro 3. Resultados del índice de potencia en los hongos estudiados.

Cepas de hongos	Índice de Potencia
<i>Trametes sp</i>	3,6 ± 0,70
<i>Ganoderma sp</i>	4,2 ± 0,70
<i>Trichoderma sp</i>	3,5 ± 0,80
<i>Cyathus sp</i>	4,0± 0,80
Hongo A	2,0 ± 0,20
Hongo B	2,1 ± 0,40
<i>Aspergillus sp</i>	2,6 ± 0,03
<i>Fusarium sp</i>	ND

Presentados con: media ± desviación estándar (SD) p<0,05; N.D.= no detectable

En el cuadro 4 se puede observar, que *Cyathus sp* y *Ganoderma sp* difieren del resto de las cepas, pero no mostraron diferencias significativas entre ellos ( $p=0,0328$ ,  $p>0,05$ ). Similar comportamiento se observó entre los hongos A y *Aspergillus sp*.

Cuadro 4. Análisis del diámetro del halo de coloración en medio con ABTS a los 7 días.

Hongo	$x \pm DE$
<i>Aspergillus sp</i>	$1,87 \pm 0,12^a$
Hongo A	$1,93 \pm 0,23^a$
Hongo B	$2,17 \pm 0,29^{ab}$
<i>Trametes sp</i>	$2,27 \pm 0,40^{ab}$
<i>Trichoderma sp</i>	$2,33 \pm 0,29^{ab}$
<i>Cyathus sp</i>	$2,83 \pm 0,35^b$
<i>Ganoderma sp</i>	$3,23 \pm 0,87^b$

$p=0,0328$ . Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0,05$ ).

## 2. Actividad de la enzima lacasa (UI)

El ABTS es un compuesto aromático sintético con sustituciones nitrogenadas (Bourbonnais y Paice., 1990). La enzima lacasa previamente oxidada por el el oxígeno, oxida al ABTS a un catión estable ABTS\* y la concentración del catión que posee una coloración azul verdosa, se correlaciona con la actividad enzimática (Kunamneni et al., 2007).

En la primera etapa de selección se escogieron las cuatro especies de hongos que mostraron los mejores resultados en el medio sólido con ABTS. En la figura 11 se muestra el crecimiento de los hongos *Ganoderma sp*, y *Cyathus sp* en el medio agar extracto de malta (AEM) a los 5 días de siembra. Se observó que el AEM es un medio que benefició la producción de micelio y favoreció el traspaso de los fragmentos de hongos (5 mm) al medio Wunder modificado para su posterior análisis enzimático (Fig 11,12, 13).

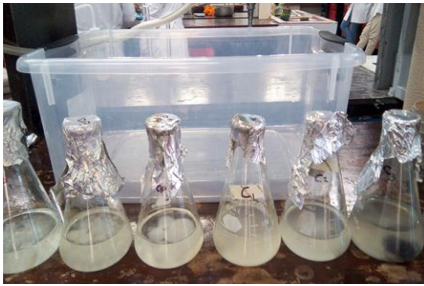


Figura 11. Hongo *Ganoderma* sp y *Cyathus* sp en medios de cultivo de agar Wunder a los 5 días



Figura 12. Hongo *Ganoderma* sp y *Cyathus* sp en medios de cultivo de agar Wunder a los 7 días



Figura 13. Hongo *Ganoderma* sp y *Cyathus* sp en medios de cultivo de agar Wunder a los 14 días

El medio Wunder modificado posee los macronutrientes, micronutrientes y glucosa necesarios para el crecimiento del hongo, descartando que en él exista algún compuesto exógeno, salvo la acción del  $\text{Cu}^{2+}$  como inductor, que pudiera estar aumentando la actividad de la lacasa (Ramírez y col., 2003). Durante el proceso de incubación, las muestras se agitaron a 150 rpm, a una temperatura de 25 °C y un pH cuyos valores oscilaron entre 4,5-5,5. Estos valores se encuentran en los rangos óptimos según lo reportado por Guillen *et al.*, 1998.

Se observó el crecimiento del micelio a los 5, 7 y 14 días de forma exponencial, lo cual estuvo en correspondencia con los resultados de biomasa (Fig. 17) y actividad enzimática (Fig. 14). Los valores de actividad enzimática evidenciaron que *Ganoderma* sp y *Tricoderma* sp fueron los que mostraron mayor actividad a los 10 días ( $39,3 \times 10^{-4}$  UI y  $32,7 \times 10^{-4}$  UI respectivamente), mientras que *Cyathus* sp ( $16,4 \times 10^{-4}$  UI) y *Trametes* sp ( $10,5 \times 10^{-4}$  UI) evidenciaron mayor actividad a los 7 días.

Como se puede observar en la figura 14, la mayor actividad de la enzima lacasa en el estudio, se obtuvo en el día 10 y descendió en el día 11, debido a que el sustrato se encontraba cubierto de micelio (masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo del hongo), lo que indica el inicio de la fructificación (Murrieta *et al.*, 2002, Manjarres *et al.*,



2010). Durante esta etapa la producción de la enzima lacasa disminuye y comienza la producción de celulasas relacionadas con el desarrollo de cuerpos fructíferos del hongo (Manjarres et al, 2010; Ohga et al., 2000). Similar conducta se observó para *Trametes sp* y *Cyathus sp* pero con un aumento de actividad a los 7 días, seguido de una disminución más lenta hasta el día 14.

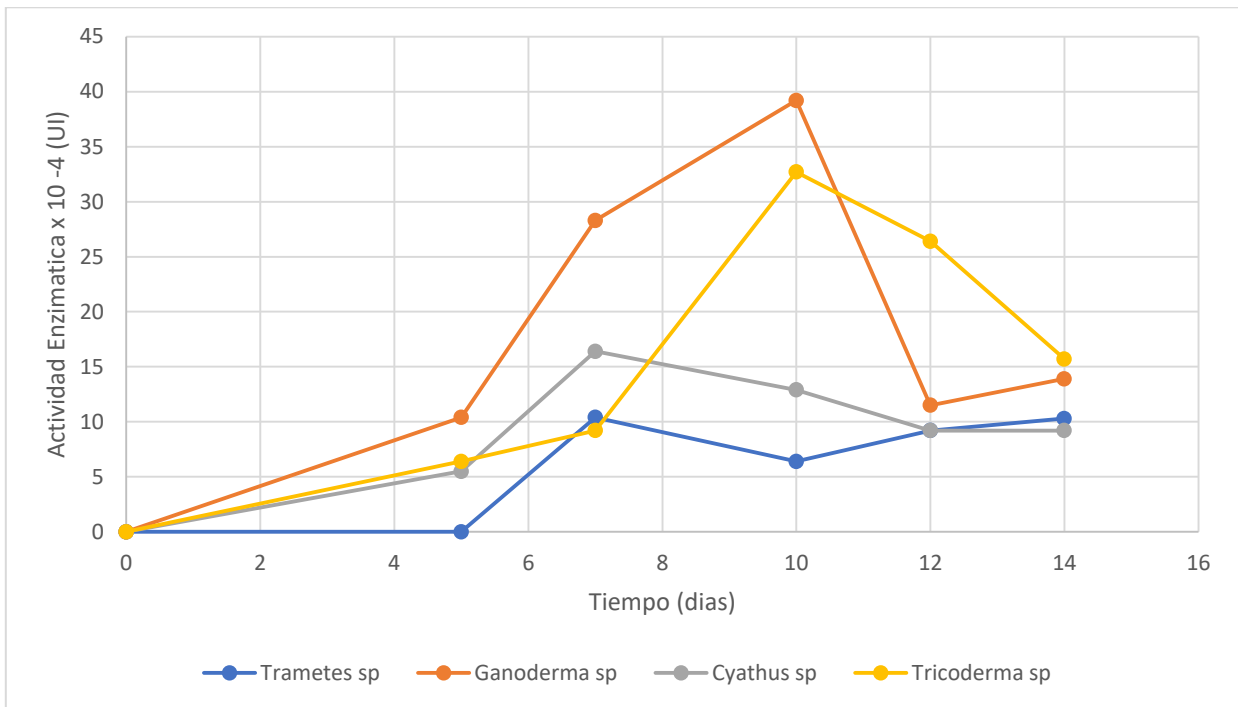


Figura 14. Actividad enzimática lacasa para los hongos *Trametes sp*, *Ganoderma sp*, *Cyathus sp* y *Trichoderma sp* durante 14 días de fermentación.

Al analizar los resultados de la actividad enzimática (cuadro 5), se puede observar que el hongo *Trametes sp* fue el que menos diferencias mostró en el tiempo, y en su crecimiento. Estos resultados difieren de lo reportado en la literatura para la producción de lacasas en el hongo *Trametes sp*, empleando ácido ferúlico, y no  $\text{Cu}^{2+}$  como inductor (Márquez, 2004).

El hongo *Ganoderma sp* al tiempo 12 solo difiere de los tiempos 0 y 10, mientras que al día 14 se difiere de los tiempos 0, 10 y 12 (Cuadro 5). Cabe agregar que el  $t_7$  difiere de todos los tiempos excepto de  $t_5$ , lo cual podría ser empleado en estudios posteriores para acortar el tiempo de muestreo. Al tiempo 0, *Trichoderma sp* se diferencia del resto de los tiempos ensayados para este hongo, a pesar de que las mayores diferencias

entre hongos se observaron a los tiempos 5 y 7. Estos resultados fueron de gran importancia al igual que el análisis en medio con ABTS, para iniciar la segunda etapa del estudio.

Cuadro 5. Análisis de varianza no paramétrica de la actividad enzimática en los hongos *Cyathus sp*, *Ganoderma sp*, *Trametes sp*, y *Trichoderma sp* a través del tiempo (días).

	AE (U) $\times 10^{-4}$ $t_0$	AE (U) $\times 10^{-4}$ $t_5$	AE (U) $\times 10^{-4}$ $t_7$	AE (U) $\times 10^{-4}$ $t_{10}$	AE (U) $\times 10^{-4}$ $t_{12}$	AE (U) $\times 10^{-4}$ $t_{14}$
Hongo	$x \pm DE$	$x \pm DE$	$x \pm DE$	$x \pm DE$	$x \pm DE$	$x \pm DE$
<i>Cyathus sp</i>	0,08±0,05 <sup>abcde</sup>	5,5±0,01 <sup>lgh</sup>	16,4±0,02 <sup>lgh</sup>	12,9±0,03 <sup>abc</sup>	9,2±0,02 <sup>abcdegh</sup>	9,2±0,01 <sup>abcde</sup>
<i>Ganoderma sp</i>	0,08±0,01 <sup>abcd</sup>	10,4±0,03 <sup>gh</sup>	28,3±0,01 <sup>h</sup>	39,2±0,01 <sup>abcdegh</sup>	11,5±0,01 <sup>bcdegh</sup>	13,9±0,01 <sup>defgh</sup>
<i>Trametes sp</i>	0,07±0,030 <sup>abc</sup>	0,07±0,01 <sup>ab</sup>	10,4±0,01 <sup>abc</sup>	6,4±0,01 <sup>abc</sup>	9,2±0,01 <sup>abc</sup>	10,3±0,01 <sup>abcdegh</sup>
<i>Trichoderma sp</i>	0,06±0,03 <sup>a</sup>	6,4±0,01 <sup>efgh</sup>	9,2±0,01 <sup>lgh</sup>	32,7±0,03 <sup>abcdegh</sup>	26,4±0,03 <sup>efgh</sup>	15,7±0,01 <sup>cdegh</sup>

$p < 0,0001$ . Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

En la segunda etapa, se seleccionaron los hongos *Ganoderma sp* y *Trichoderma sp* que mostraron los valores más altos de actividad enzimática lacasa ( $39,2 \times 10^{-4}$  UI para *Ganoderma sp*, y  $32,7 \times 10^{-4}$  UI, para *Trichoderma sp*) a los 10 días de cultivo. (Fig 15). Se observó que aunque ambas especies mostraron un comportamiento similar, el hongo *Ganoderma sp* evidenció más actividad lacasa en el tiempo de estudio ( $43,8 \times 10^{-4}$  UI) mientras que *Trichoderma sp* mostró  $32,8 \times 10^{-4}$  UI. La mayor actividad de lacasa en el ensayo se obtuvo en el día 8 y descendió en el día 9, debido a que el sustrato al igual que en la primera etapa, se encontraba cubierto de micelio y, por ende, en proceso de fructificación (Murrieta y col., 2000; Manjarres y col., 2010).

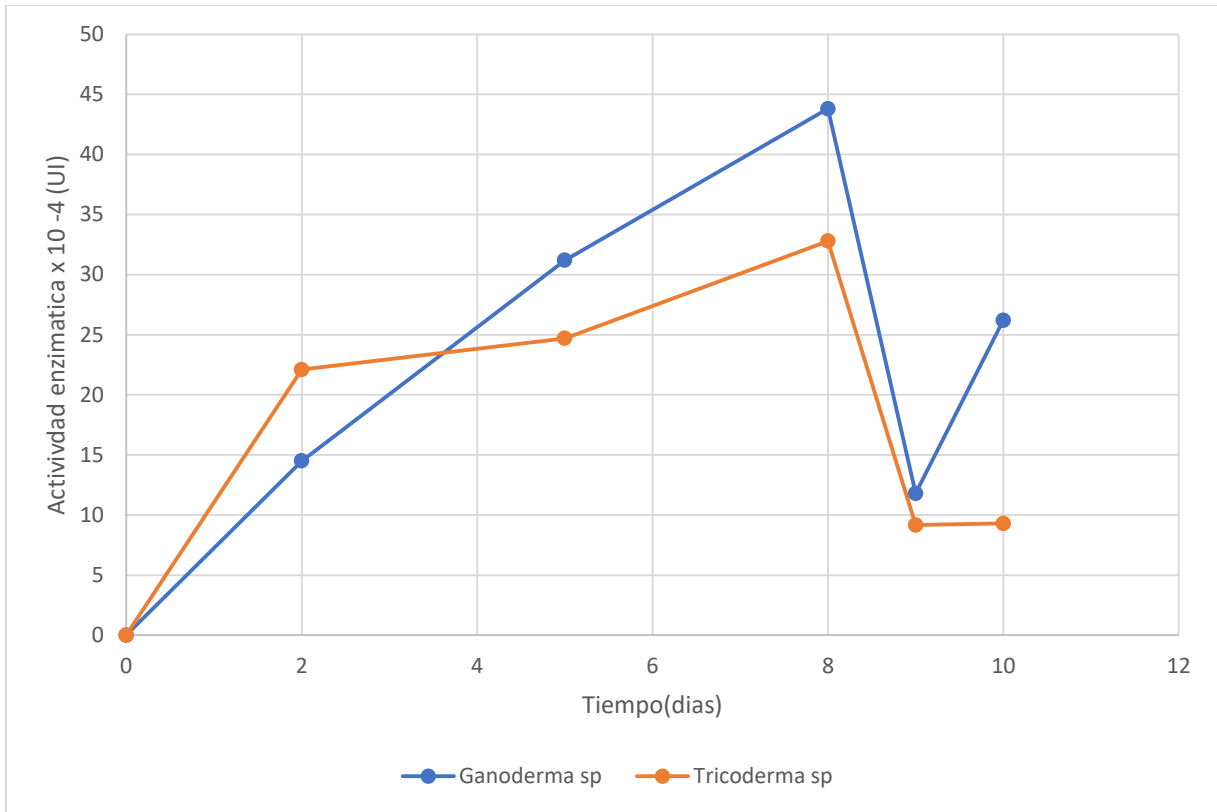


Figura 15. Actividad enzimática lacasa en los hongos *Ganoderma sp* y *Trichoderma sp* durante 10 días de fermentación.

Las lacasas fúngicas pueden ser constitutivas o inducibles y también, intracelulares o extracelulares (Sariaslani, 1989). Estas enzimas han sido detectadas y purificadas de distintas especies de hongos, y se ha observado que se producen múltiples isoenzimas (Palmieri y col., 2000). Varias lacasas encontradas son extracelulares y se asocian al crecimiento, por lo cual, se han controlado las condiciones de crecimiento de las especies de hongos utilizados y después, se ha buscado promover la producción de las enzimas mediante la utilización de inductores. Éstos son usualmente compuestos que tienen estructuras muy similares o análogas a los sustratos de la enzima y sirven como una señal a la célula para que produzcan alguna enzima específica (López, 2001).

Es importante resaltar que la técnica utilizada en este estudio cuantifica únicamente la actividad lacasa extracelular, aunque se ha reportado la existencia de actividad lacasa producida a nivel intracelular en hongos de pudrición blanca como *Trametes versicolor*

(Dittmer *et al.*, 1997), empleando glucosa como fuente de carbono (Xiao y col., 2003), a pesar de que en nuestra investigación fue la cepa con menor actividad.

Esta actividad intracelular podría revelar valores más altos de lacasa total, por lo que sería necesario realizar investigaciones que evalúen la actividad intracelular de la lacasa en los hongos estudiados.

Al comparar los resultados de las pruebas, en medio con ABTS, con las pruebas de actividad enzimática, destaca el hecho que algunos hongos que son los que mayor halo de coloración producen en placa con ABTS no son los de mejor actividad enzimática en medio líquido. El sistema ligninolítico en algunas especies de hongos no es inducido por la lignina pero aparece dentro del metabolismo secundario, es decir, cuando el crecimiento primario cesa por el consumo de algunos nutrientes (Kirk y col., 1978). El metabolismo secundario es activado por el nitrógeno, carbono y limitaciones de sulfato (Jeffries y col., 1981). Galhaup y col, 2001 reportó inhibición de la producción de lacasa en medios con glucosa como fuente de carbono para *T. pubescens*.

El caso del hongo *Trametes sp* ilustra claramente lo anterior: presenta excelente crecimiento y aclaración del medio sólido con ABTS, sin embargo apenas mostró crecimiento en los frascos con medio líquido, con cobre (II) como inductor. Otro hongo que presentó una tendencia similar fue *Cyathus sp* el cual presentó un halo de coloración apreciable en medio sólido con ABTS (2,8 cm), pero su actividad enzimática fue menor. Ambos comportamientos podrían estar asociados a la composición del medio de cultivo, la cual puede influir considerablemente en el aumento o inhibición de la enzima de lacasa, de algunos hongos de podredumbre blanca (Márquez, 2004).

El análisis del test de Turkey ( $\alpha=0.05$ ) demostró que las diferencias entre la actividad enzimática de *Trichoderma sp* y *Ganoderma sp* fue significativa ( $p = 0,00434$ ) (Cuadro 6). En relación a la actividad enzimática en el tiempo, los resultados mostraron que las mayores diferencias fueron al tiempo 0 y 8 días. Ambas cepas de hongos no mostraron diferencias significativas entre los tiempos 0, 2, 5 y 9. Finalmente al analizar la interacción hongo y tiempo no se encontraron diferencias significativas ( $p=0,1784$ ).

Cuadro 6. Análisis de varianza de la actividad enzimática en los hongos *Trichoderma sp* y *Ganoderma sp*, a través del tiempo (días).

Hongo	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) $\times 10^{-4}$ $t_{10}$
	$x \pm DE$	$x \pm DE$	$x \pm DE$	$x \pm DE$	$x \pm DE$	$x \pm DE$
<i>Trichoderma sp</i>	0,02 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	22,1 $\pm$ 0,27 <sup>abcd</sup>	24,7 $\pm$ 0,03 <sup>bcd</sup>	32,8 $\pm$ 0,04 <sup>cd</sup>	9,2 $\pm$ 0,13 <sup>abc</sup>	9,3 $\pm$ 0,13 <sup>abc</sup>
<i>Ganoderma sp</i>	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>	14,5 $\pm$ 0,19 <sup>abc</sup>	31,2 $\pm$ 0,38 <sup>cd</sup>	43,8 $\pm$ 0,03 <sup>d</sup>	11, 8 $\pm$ 0,17 <sup>cd</sup>	26,2 $\pm$ 0,32 <sup>cd</sup>

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

### 3. Medición de azúcares reductores

El comportamiento de la glucosa es uno de los factores más relacionados con el crecimiento fúngico pero no solo está involucrado el proceso de degradación de glucosa, sino también el proceso de degradación de celulosa y celobiosa, siendo la celulosa la principal fuente de carbono disponible en el medio utilizado y en el hábitat natural (Dumoncaaux y col., 2001). Xiao y col, 2006 reportaron incrementos de la actividad lacasa en cultivos de hongos donde la glucosa comienza a ser limitante debido al agotamiento de esta fuente de carbono rápida.

La concentración de azúcares reductores del medio de cultivo disminuyó hasta los 7 días, en los hongos *Ganoderma sp* y *Trichoderma sp* (Fig 16), lo cual estuvo en concordancia con el aumento de biomasa que se produjo a un tiempo similar (Fig 17), ya que estas dos variables se correlacionan negativamente (Chaparro y Rosas., 2006). Por otro lado el hongo *Cyathus sp* mostró una disminución desde el día 5 hasta el día 7, para observar luego una estabilización de su concentración de azúcares reductores, lo cual se relaciona con una mayor actividad enzimática.

El comportamiento del hongo *Trametes sp* fue diferente y no se observó una disminución en la glucosa. Aunque todos los hongos de la pudrición blanca pueden asimilar los monómeros de glucosa y celobiosa, algunos pueden utilizar los oligómeros de celulosa como fuente de carbono (Pentilla y Saloheimo., 1999) explicando así la mayor actividad enzimática en presencia de bajas concentraciones de glucosa.

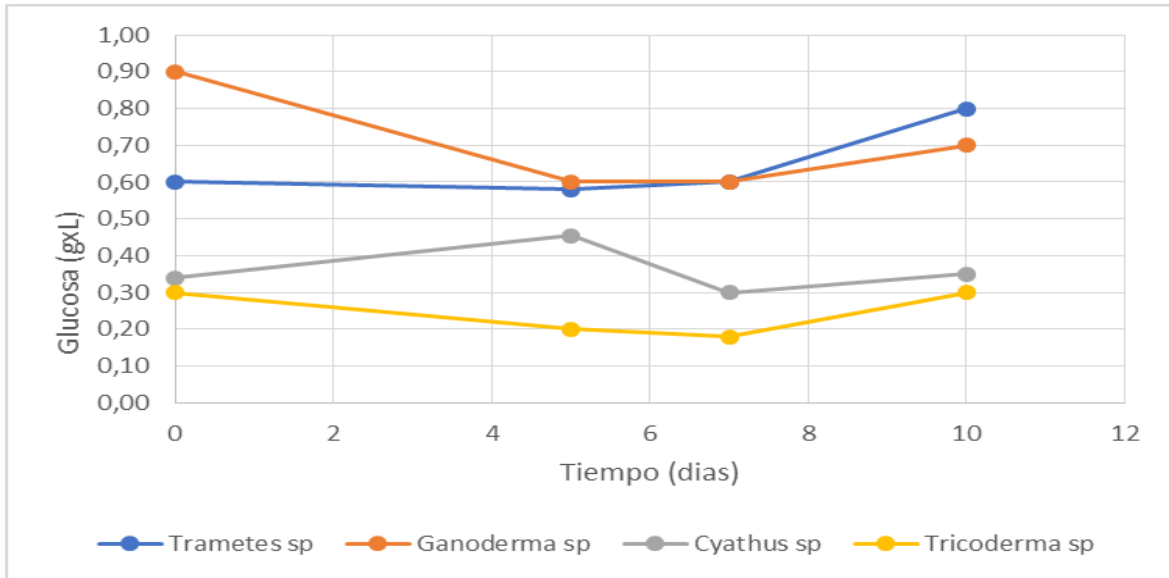


Figura 16. Concentración de azúcares reductores en el medio de cultivo de los hongos *Trametes sp*, *Ganoderma sp*, *Cyathus sp* y *Trichoderma sp* durante 12 días.

Como podemos observar en el cuadro 7, el hongo *Trametes sp* difiere significativamente ( $p < 0,0001$ ) del resto de las cepas (Turkey,  $\alpha = 0,05$ ). El análisis de las diferencias en el tiempo mostró que el día 7 se diferenció significativamente respecto a  $t_5$  y  $t_{10}$ , y no así del  $t_0$  ( $p = 0,005$ ).

Cuadro 7. Análisis de varianza de azúcares reductores en los hongos *Trichoderma sp*, *Cyathus sp*, *Ganoderma sp* y *Trametes sp* en el tiempo (días).

Azúcares reductores	
Hongo	$\bar{x} \pm DE$
<i>Trichoderma sp</i>	$0,31 \pm 0,07^a$
<i>Cyathus sp</i>	$0,44 \pm 0,07^{ab}$
<i>Ganoderma sp</i>	$0,67 \pm 0,07^b$
<i>Trametes sp</i>	$1,01 \pm 0,07^c$

$p < 0,0001$ . Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Por otro lado, el análisis de la interacción tiempo y hongo (Cuadro 8) no mostró diferencias significativas ( $p = 0,6718$ ).

Cuadro 8. Análisis de las diferencias de concentración de azúcares reductores en el tiempo.

Tiempo	Azúcares reductores $x \pm DE$
0	$0,52 \pm 0,07^{ab}$
5	$0,73 \pm 0,07^b$
7	$0,45 \pm 0,07^a$
10	$0,74 \pm 0,07^b$

$p = 0,005$ . Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

#### 4. Cuantificación de la biomasa micelial

Las cepas estudiadas mostraron incrementos en los valores de biomasa micelial, lo cual reveló que el uso del medio de cultivo AEM favoreció la capacidad del hongo para formar un número mayor de células vegetativas. La biomasa de los hongos creció en forma de agregados celulares, siendo más grandes en la cepa de *Ganoderma* sp 84,09 mg/mL y menor en *Trametes* sp (50,02 mg/mL) (Fig.17), siendo la cepa de *Ganoderma* sp la que difiere significativamente del resto (Cuadro 9). Lo anterior está correlacionado con la actividad enzimática lacasa, que mostraron estos hongos durante los 14 días de cultivo en agar Wunder (Fig.15), ya que la actividad se incrementó proporcionalmente con la producción de biomasa. Estos resultados corroboran lo reportado en la literatura (Mansur et al., 2003).

Sin embargo, otros autores (Pentilla y Saloheimo., 1999; Ha y col., 2001) afirmaron que las enzimas ligninolíticas de los hongos de pudrición blanca, se producen en el metabolismo secundario (en la idiofase) y que la producción de la enzima lacasa se desencadena por el consumo de nutrientes, lo cual va a estar relacionado con diferentes condiciones como: pH, humedad, tipo de sustrato, temperatura (Márquez, 2004).

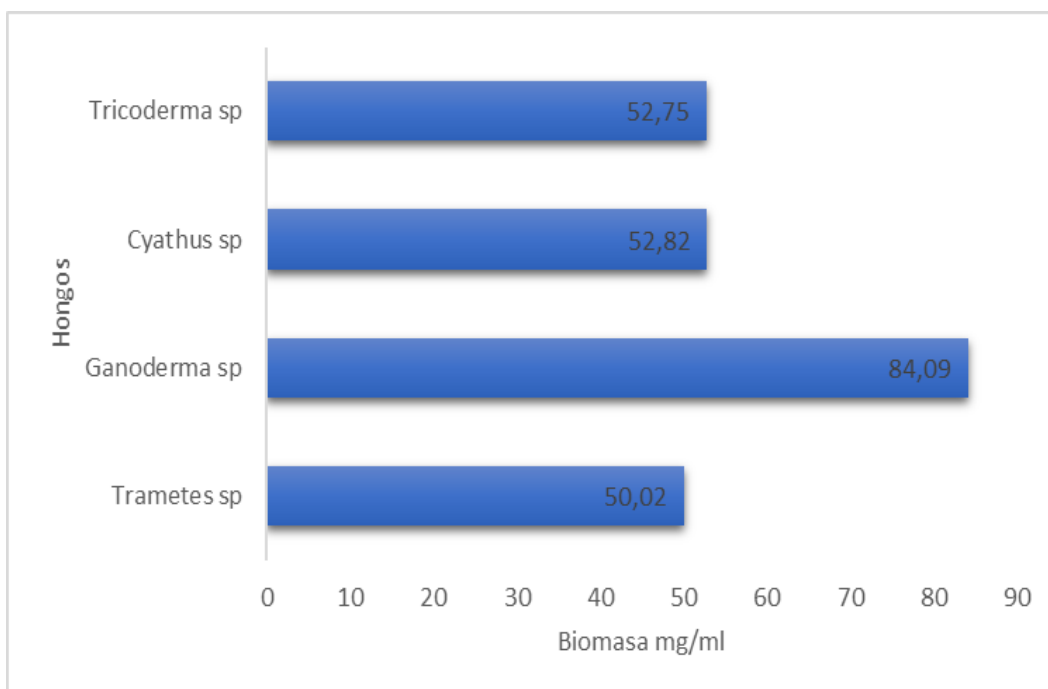


Figura 17. Producción de biomasa en los hongos *Trichoderma* sp, *Cyathus* sp, *Ganoderma* sp y *Trametes* sp a los 7 días de incubación.

Cuadro 9. Análisis de varianza de la biomasa en los hongos *Trametes* sp, *Trichoderma*, *Cyathus* sp y *Ganoderma* sp a los 7 días de incubación.

Hongo	Biomasa $\bar{x} \pm DE$
<i>Trametes</i> sp	50,02 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>
<i>Trichoderma</i> sp	52,75 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>
<i>Cyathus</i> sp	52,82 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>
<i>Ganoderma</i> sp	84,09 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>

$p < 0,0001$ . Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

## 5. Determinación de proteínas solubles por el método de Bradford

La concentración de proteínas solubles aumenta a medida que aumenta la actividad lacasa durante el crecimiento del hongo (Mansur *et al.*, 2003). En la figura 18 se puede observar que la mayor concentración de proteínas se presentó a los 8 y 12 días, lo cual está en concordancia con la mayor actividad enzimática observada para el hongo *Ganoderma* sp (Fig. 15) y con los reportes planteados en la literatura (Marquez, 2004).



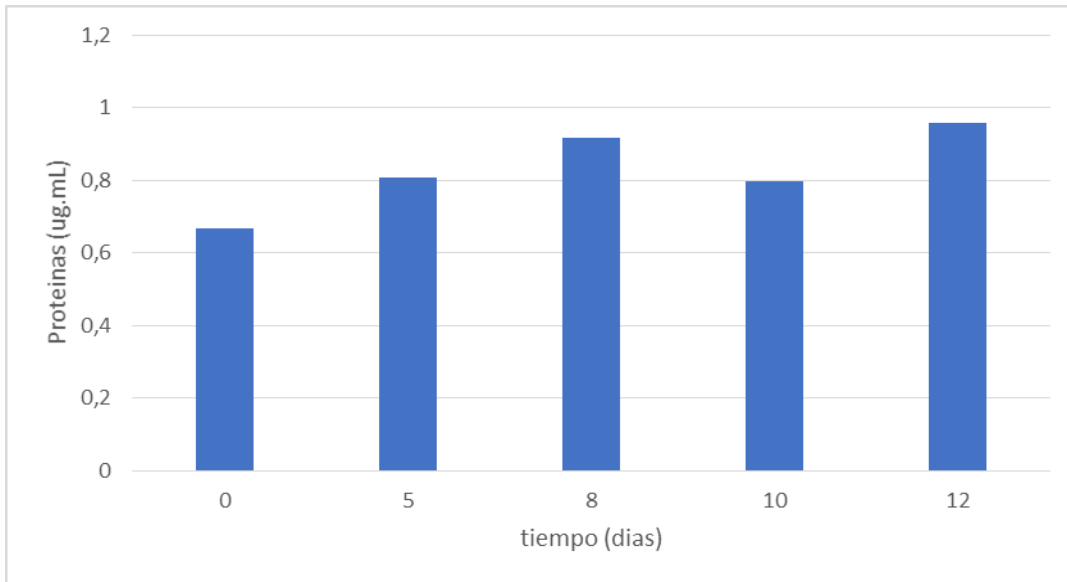


Figura 18. Proteínas solubles en el hongo *Ganoderma sp* durante 12 días de incubación.

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, que llevan a cabo la degradación del sustrato, en este caso lacasas.

Al haber incorporado glucosa al medio, solamente al inicio, para incrementar el crecimiento del micelio, los hongos se encuentran en capacidad de producir 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 aumento en la concentración de proteínas que se observó en *Ganoderma sp* al día 12 del cultivo (Fig. 18), tiempo que difiere significativamente del resto ( $p= 0,0096$ ), excepto de los tiempos 8 y 5.

Cuadro 10. Análisis de varianza de proteínas solubles en el hongo *Ganoderma sp* a los 12 días

Tiempo (días)	Proteínas solubles
	$x \pm DE$
0	$0,66 \pm 0,01^a$
5	$0,83 \pm 0,04^{abc}$
8	$0,93 \pm 0,02^{bc}$
10	$0,76 \pm 0,06^{ab}$
12	$0,96 \pm 0,03^c$

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

## 6. Purificación parcial de la enzima lacasa

### 6.1. Electroforesis en condiciones desnaturizantes

Con la primera filtración se separó la biomasa presente en el cultivo y con la membrana de 50 kDa se lograron 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.

En la figura 19 se muestra el gel obtenido mediante SDS-PAGE. Se observan varias bandas de proteínas en SDS-PAGE sin concentrar. Las líneas 2, 3 y 6 mostraron un peso molecular cercano a 28 KDa, al comparar con patrones de peso molecular See Blue Plus 2.

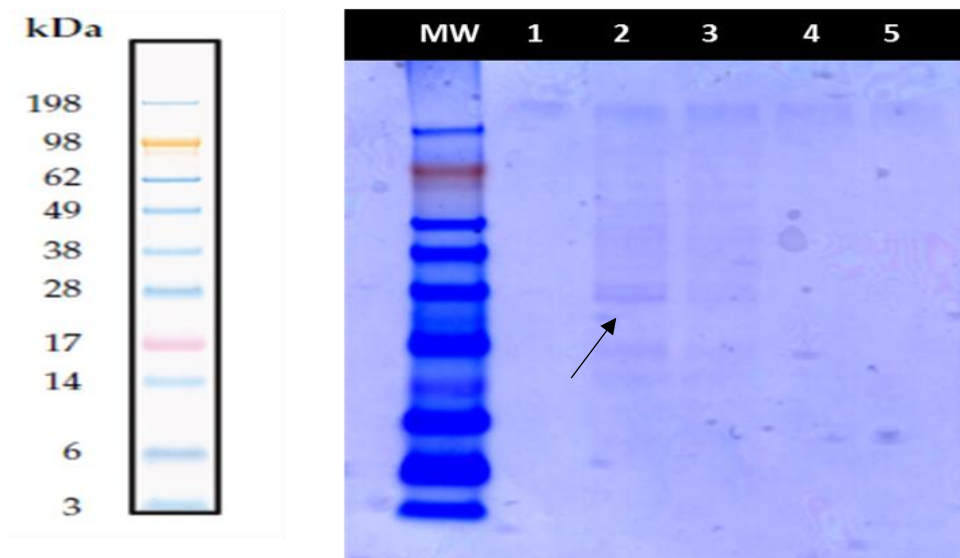


Figura 19. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE de enzima lacasa purificada parcialmente, del hongo *Ganoderma* sp. MW: patrón de peso molecular See Blue Plus 2. Línea 2 y 3: Muestra 1 de enzima lacasa después de la ultrafiltración. Línea 4 y 5: Muestra 2 de enzima lacasa después de la ultrafiltración. Línea 6: Muestra 3 de enzima lacasa después de la ultrafiltración

Luego de llevar a cabo la diálisis y la concentración del filtrado de las muestras 2 y 6, se realizó nuevamente la electroforesis en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE (Fig 20) observándose una banda de proteínas con un peso molecular que osciló entre 28 y

38 kDa. Lo descrito coincide con 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 40-100 kDa (Ramírez *et al.*, 2003). Cabe destacar que los reportes encontrados en la literatura se refieren a estudios en *Trametes* sp, *Pleurotus* sp, *C. rigida*, *Coriolus hirsutus*, *Pycnoporus cinnabarium* y *P. cryosporium* (Rojas., 2010; Diaz, 2010.; Ramirez y col., 2003; More *et al.*, 2011.; Dittmer y col., 1997) y no en *Ganoderma* sp, por lo que se exhorta a seguir con las investigaciones, ya que la variabilidad podría estar relacionada con la cepa y el sustrato empleado.

Por ejemplo, el hongo *Coriolus hirsutus*, se indujo para la síntesis de lacasas extracelulares con un sustrato de la lacasa como es la siringaldazina, obteniéndose así, dos isoformas de la enzima; con pesos moleculares de 67 y 69 kDa (Gorbatova y col., 2000). Para el hongo de podredumbre blanca *Pycnoporus cinnabarium*, ocurrió un efecto de inducción al adicionarle 2,5 xilidina, para una isoenzima que tuvo una masa molecular de aproximadamente de 81 kDa (Eggert y col., 1996).

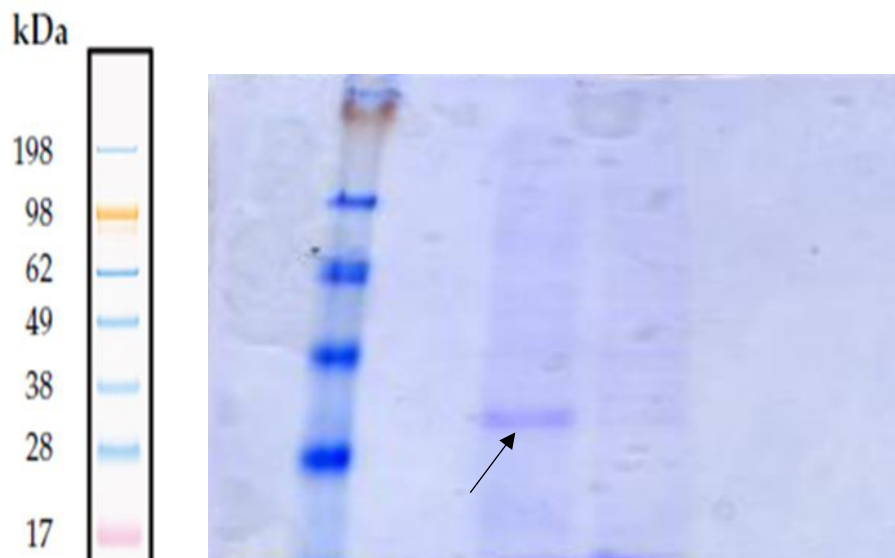


Figura 20. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE de enzima lacasa purificada parcialmente y concentrada al vacío, del hongo *Ganoderma* sp. MW: patrón de peso molecular See Blue Plus 2. Línea 2: Muestra 2 de enzima lacasa después de la ultrafiltración. Línea 3: Muestra 6 de enzima lacasa después de la ultrafiltración.

Debemos tomar en cuenta que en diferentes condiciones de cultivo se pueden producir diferentes patrones de isoenzimas o inducir la aparición de isoenzimas aún no identificadas (Muñoz *et al.*, 1997). Se observó que al adicionar un exceso de cobre al medio de cultivo provocó un efecto de inducción para la producción de lacasas (Hubert y Lerch., 1987). Ramírez *et al.*, 2003 reportaron la presencia de las isoenzimas de lacasa en fermentación sumergida empleando cobre como inductor.

### **7. Determinación de lignina por el método Klason: Efectividad de la enzima lacasa sobre los desechos agroindustriales**

A pesar de la amplia distribución de la lignina, su descomposición es realizada por un número limitado de microorganismos, principalmente hongos debido a su capacidad para mineralizar la lignina (Tuomela *et al.*, 2000).

La degradación de la lignina sólo ocurre bajo condiciones aeróbicas. Es importante mencionar que 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; Pentilla y Saloheimo., 1999).

En los hongos, tras agotar la glucosa, conseguirán una segunda fuente de carbono mediante la degradación de lignina u otros compuestos fenólicos del medio, utilizando la actividad de la enzima lacasa (Xiao *et al.*, 2006). Se puede establecer una relación directa entre la producción de lacasa y el agotamiento de glucosa, que puede deberse a la transcripción del gen de la lacasa en presencia de glucosa (Galhaup *et al.*, 2002).

Al determinar los porcentajes de humedad y materia orgánica en el ensayo, se observó que los RPB fueron inferiores a lo reportado por Ortega y col., 2005 (Cuadro 11), mientras que para los residuos de piña el porcentaje de humedad fue inferior a lo planteado por Cordoba, 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. Además a ciertas temperaturas pueden volatilizarse otras sustancias además de agua (AOAC, 1980). Por otro lado, la materia orgánica se encuentra muy relacionada con las condiciones del suelo, así como la composición química del residuo (Ranganna, 1977).

Cuadro 11. 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; \*\* Cordoba, 2012, \*\*\*Turrado y col, 2009, \*\*\*\* Manals-Cutiño y col, 2015,

H: humedad; MO: materia orgánica; RBC: Residuos de bagazo de caña; RCP: residuos de piña; RPB: residuos de pinzote de banano.

El cuadro 12 muestra, 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 y luego varió muy poco. 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 empleados (Collins y Dobson., 1998; Saperrat., 2002).

Dado que los metales pesados actúan como quelantes sobre el Cu (II), pueden modificar los residuos de amino ácidos o causar un cambio conformacional en la glicoproteína, por lo que la actividad enzimática puede verse alterada. Según reportes de Gutiérrez, 2010 se ha encontrado en el fruto de piña (*Ananas comosus*), endosulfan, heptacloro, aldrin, metilparation y thionazin, que son plaguicidas altamente tóxicos.

Cuadro 12. Porcentajes de lignina obtenidos en el ensayo y 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	11,58** y 18-20***
15	12		13,5		11	
30	11,9		12,7		10,2	
45	11,2		12,5		3,02	

\*Hurter, 2001; \*\* Sun y Cheng, 2002; Sosa y col, 2011\*\*\* Gonzales y col, 2016

RBC: Residuos de bagazo de caña; RCP: residuos de piña; RPB: residuos de pinzote de banano.

La figura 21 muestra que entre los días 15 y 30 no hubo variación del comportamiento para ninguno de los residuos, lo cual podría deberse a una disminución de la temperatura en el laboratorio (10°C) donde se encontraron las muestras y que provocó una disminución de la actividad enzimática.

Un aspecto importante en la degradación de la lignina es la temperatura, ya que se ha observado que por ser un polímero, la lignina es muy difícil de degradar, y se ha encontrado que grupos de microorganismos mesófilos y termófilos muestran la capacidad de degradar ampliamente a la lignina (Rosenberg, 1978; Wiegant, 1992). Tomando en cuenta que la actividad óptima de la enzima lacasa se encuentra reportada a temperaturas superiores a 25 °C (Sunil *et al*, 2011), la disminución de la temperatura podría haber provocado que la enzima disminuyera su actividad.

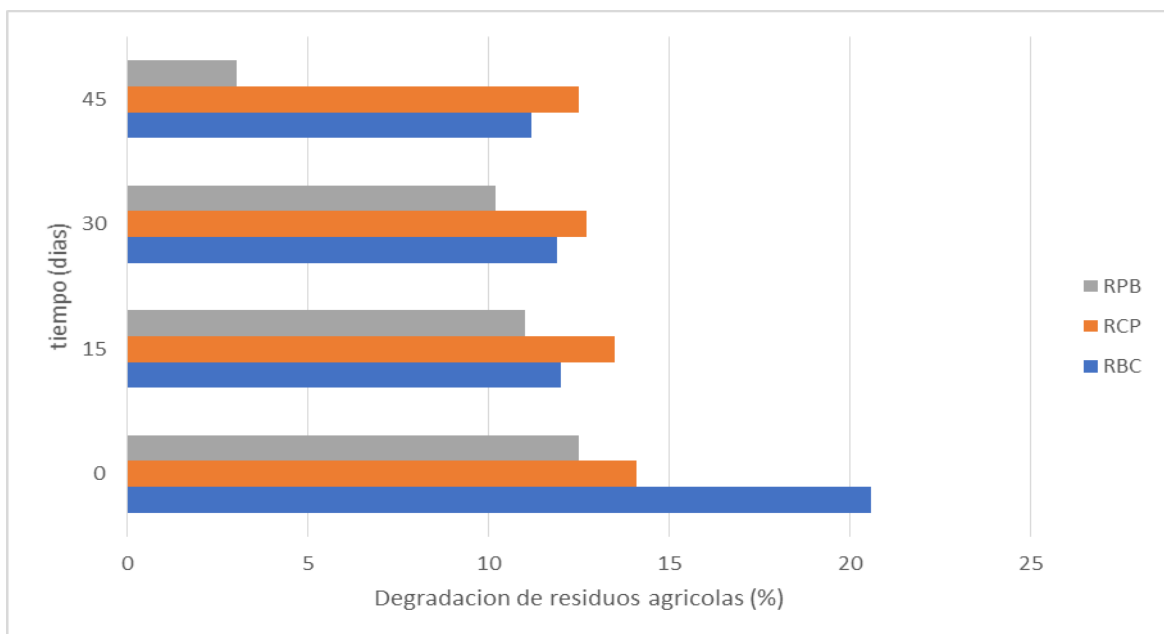


Figura 21. Lignina (%) en los residuos de bagazo de caña (RBC), pinzote de banano (RPB) y residuos de piña (RCP) empleando la enzima lacasa parcialmente purificada.

En el transcurso de los 45 días del ensayo se observó el cambio de color del medio en los tres residuos, siendo más marcado el aclaramiento en el medio con el residuo bagazo de caña (Fig. 22, 23, 24).

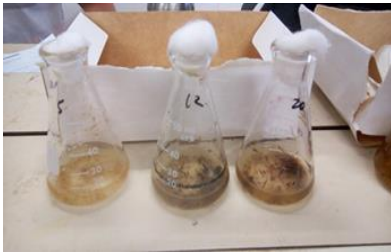


Figura 23. Residuos de bagazo de caña, rastrojo de piña y pinzote de banano con la enzima parcialmente purificada a los 7 días.



Figura 23. Residuos de bagazo de caña, rastrojo de piña y pinzote de banano con la enzima parcialmente purificada a los 30 días.

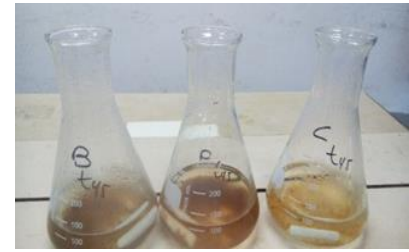


Figura 23. Residuos de bagazo de caña, rastrojo de piña y pinzote de banano con la enzima parcialmente purificada a los 45 días

Se observaron diferencias significativas entre los residuos, entre los tiempos del ensayo y en la interacción residuo y tiempo ( $p < 0,0001$ ). El análisis de los residuos por el test de Turkey (alfa=0,05) mostró que el residuo de piña difiere ( $p < 0,0001$ ) significativamente de los residuos de caña y banano (Cuadro 13).

Cuadro 13. Análisis de la lignina (%) en residuos de caña, bagazo y banano en el transcurso del tiempo (días).

Residuos	% Lignina $x \pm DE$
RCP	$0,36 \pm 0,12^a$
RPB	$2,32 \pm 0,10^b$
RBC	$2,40 \pm 0,09^b$

RBC: Residuos de bagazo de caña; RCP: residuos de piña; RPB: residuos de pinzote de banano.  $p < 0,0001$ . Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) en los tiempos de estudio. El análisis de la interacción residuo\* tiempo por el test de Turkey (alfa=0,05) mostró diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) entre los residuos de caña y banano respecto al residuo piña, e incluso entre ellos. Para la caña las diferencias fueron marcadas al tiempo 15 y para banano a los 45 días (Cuadro 14). 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 (Cuadro 14 y 15).

Cuadro 14. Análisis de varianza de los diferentes tiempos estudiados.

Tiempo (días)	% Lignina x ± DE
0	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
15	0,60 ± 0,11 <sup>d</sup>
30	2,55 ± 0,15 <sup>b</sup>
45	3,61 ± 0,08 <sup>c</sup>

p<0,0001. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05).

Cuadro 15. Análisis de la interacción residuo y tiempo.

Residuo	Tiempo (días)	x ± DE
RCP	45	0,13 ± 0,26 <sup>a</sup>
RCP	0	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
RBC	0	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
RPB	0	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
RBC	45	0,27 ± 0,26 <sup>a</sup>
RBC	30	0,30 ± 0,26 <sup>a</sup>
RCP	30	0,70 ± 0,26 <sup>a</sup>
RPB	30	0,80 ± 0,26 <sup>a</sup>
RCP	15	0,87 ± 0,26 <sup>a</sup>
RPB	15	0,93 ± 0,26 <sup>a</sup>
RPB	45	7,53 ± 0,26 <sup>b</sup>
RBC	15	9,03 ± 0,26 <sup>c</sup>

RBC: Residuos de bagazo de caña; RCP: residuos de piña; RPB: residuos de pinzote de banano.  
p<0,0001. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05).

En los ecosistemas naturales los residuos procedentes de la vegetación, así como los generados por la fauna, 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). Este ciclo de la materia se establece en función de numerosos factores, entre los cuales destacan factores abióticos como: la humedad, la temperatura, el contenido en oxígeno, la composición mineralógica de la tierra y factores bióticos como los microorganismos del suelo (Stevenson, 1986).

Por otra parte, en los sistemas agrícolas el ciclo de la materia se ve fuertemente alterado por la biomasa de la cosecha. De esta forma la materia orgánica se pone a disposición de la microfauna del suelo que llevará a cabo los procesos de mineralización primaria y formación de humus estable (Quemada *et al.*, 1997; Sánchez



y col., 1989). El tipo de biomasa y sus propiedades intrínsecas determinan tanto la selección del proceso de conversión como la complejidad del mismo, lo cual tendrá un impacto considerable en el costo beneficio (McKendry, 2002) y la búsqueda de nuevas alternativas para la industria.

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 una buena combinación sinérgica de enzimas capaces de degradar lignina y de hidrolizar celulosa y hemicelulosa (Quevedo, 2011; Castro, 2013).

La celulosa es uno de los materiales más utilizados desde tiempos remotos, y en la actualidad es la fuente de combustibles orgánicos, compuestos químicos, fibras y materiales tales como el papel, la pulpa, y las maderas (Eriksson, 1989; Lynd *et al.*, 1999; Wackett, 2008). Se estima que alrededor de 180 billones de toneladas de celulosa son producidas por las plantas anualmente, por lo que constituye una de las fuentes de carbono renovables más importantes que hay sobre la tierra (Kadla y Gilbert., 2000). El contenido de celulosa en las plantas depende del grupo taxonómico al que pertenezcan y oscila entre 35 y 50% en peso seco, mientras que la hemicelulosa y la lignina comprenden del 20 al 35%, y del 5 al 30% en peso seco, respectivamente (Peters, 2006).

El material celulósico es particularmente atractivo como fuente de carbono y energía debido a su bajo costo y su gran abundancia. Sin embargo, debido a su carácter recalcitrante solamente ciertos organismos (como bacterias y hongos) producen las enzimas necesarias para utilizarlo (Béguin y Aubert., 1994; Himmel *et al.*, 2007).

Los pretratamientos biológicos, por otro lado, implican el uso de los hongos directamente sobre la biomasa (Lee *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Estos métodos son más limpios, baratos y no requieren de infraestructura especializada, pero tienen la desventaja de ser muy lentos comparados con los métodos fisicoquímicos (Taniguchi *et al.*, 2005).

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 (Saval, 2012). Actualmente países con mayor desarrollo científico y tecnológico aplican la biorremediación debido a los altos niveles de eficiencia y efectividad (Sánchez, 2013). Costa Rica necesita implementar este tipo de procedimiento y con ello disponer de metodologías eficaces a los serios problemas que genera la contaminación por la acumulación de residuos, así como también aprovechar mejor los residuos agroindustriales como fuente de celulosa.

Para la obtención de enzimas que puedan biodegradar desechos, es preciso seleccionar 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 (Ruiz, 2004). 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  $H_2O$  y  $CO_2$  (Catalan, 2004; Vera, 2006).

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 y la necesidad de obtener mejores rendimientos además de mejorar las metodologías sugiere la posibilidad de buscar cepas más específicas.

De acuerdo con este estudio, los sistemas de degradación de lignocelulosa son complejos y aún falta mucho por hacer y descubrir en el campo de las enzimas, en especial las de origen fúngico. Los materiales lignocelulósicos para la producción son una mejor alternativa, aunque se tienen que mejorar y desarrollar tecnologías eficientes que permitan su aprovechamiento (Martínez-Anaya y col., 2008).

Por la gran importancia que tiene la aplicación de las lacasas en la industria y en la biorremediación de efluentes, y suelos contaminados; se busca la manera de que estas enzimas se produzcan en mayor cantidad y por lo tanto, tengan una mayor aplicabilidad en muchos de los procesos biotecnológicos (Kristjansson, 1989).

Además, con el uso de la biotecnología existe la posibilidad de investigar acerca de las enzimas fúngicas de gran potencial para superar el reto de los sustratos recalcitrantes, como la lignina. Entre estas se destacan la regulación fisiológica de las enzimas, el uso de nuevos inductores para mejorar la producción, uso de múltiples cepas microbianas o mezclas de enzimas, así como también, el uso de las técnicas de ADN recombinante que permitan la búsqueda de nuevas enzimas y sus aplicaciones (Godliving, 2012).

Dado que los cultivos de caña de azúcar, banano y piña se encuentran entre los cinco principales cultivos permanentes en el país (CENAGRO, 2014), y la relación existente entre la producción agropecuaria y el medio ambiente (Cruz, 2003), los resultados de nuestra investigación permitirán la implementación de una agricultura climáticamente inteligente en la descomposición de residuos (FAO, 2010) en un futuro no lejano.

Sin embargo todavía existen grandes brechas de conocimiento relacionadas no solo con futuros escenarios climáticos cambiantes, sino también con el acceso de estas tecnologías por parte de los agricultores, especialmente en países en desarrollo (FAO, 2010). Para lograrlo se necesitarán políticas, infraestructuras e inversión, que generen crecimiento económico y les permita a los productores adoptar prácticas climáticamente inteligentes (FAO, 2010).

En base a los resultados obtenidos en nuestro estudio, se pone de manifiesto, que la enzima lacasa de *Ganoderma* sp actúa en la degradación de residuos ligninolíticos. Esto hace posible llevar a cabo un proceso eficaz de bioremediación enzimática, que podrá ser optimizado incrementando la producción de la enzima. Por tanto, se pone de manifiesto que la producción de la enzima lacasa de origen fúngico, no solo brinda la posibilidad de ser utilizada como una herramienta alternativa en agricultura ecológica, sino también en el área ambiental.

## CONCLUSIONES

1. El aislamiento de hongos ligninolíticos mediante el crecimiento en sustratos con ABTS es un método rápido y adecuado para estudiar cepas con gran potencial para la industria.
2. Los hongos estudiados presentaron actividad enzimática lacasa en medio con ABTS, ya que gracias a la oxidación del mismo se observó un cambio de coloración en el medio; el hongo *Ganoderma sp* presentó mayor actividad ligninolítica mientras que el hongo *Fusarium sp* mostró la más baja.
3. Los valores de actividad enzimática mostraron que *Ganoderma sp* y *Trichoderma sp* revelaron mayor actividad enzimática a los 10 días ( $39,3 \times 10^{-4}$  UI y  $32,7 \times 10^{-4}$  UI correspondientemente), mientras que para los hongos *Cyathus sp* y *Trametes sp* la mayor actividad fue los 7 días ( $16,48 \times 10^{-4}$  UI y  $10,5 \times 10^{-4}$  UI respectivamente).
4. En la determinación de biomasa el hongo que mostró mayor crecimiento del micelio fue *Ganoderma sp* (84,09 mg/mL), lo cual está en correspondencia con su actividad enzimática.
5. La concentración de azúcares reductores del medio de cultivo disminuyó hasta los 7 días, en los hongos *Ganoderma sp* y *Trichoderma sp*, lo cual está en concordancia con el aumento de biomasa que se produjo a los 7 días, ya que estas dos variables se correlacionan negativamente.
6. La mayor concentración de proteínas solubles del hongo *Ganoderma sp* se observó a los 8 y 12 días, mostrando una correlación con la actividad enzimática.
7. Se encontró mayor efectividad de la enzima lacasa en la degradación de lignina de los residuos banano y caña. En el residuo de piña no se observó una

disminución significativa de la lignina, lo cual podría deberse al uso indiscriminado de agroquímicos.

8. El uso de la biotecnología como una herramienta, permitirá un mejor aprovechamiento de los residuos agrícolas como fuente potencial de celulosa, así como también la disminución del gran volumen de desechos generados, de manera más eficiente y amigable con el ambiente.

## RECOMENDACIONES

- Realizar estudios que evalúen la producción de la actividad enzimática lacasa en los hongos no identificados.
- Identificar taxonómicamente los hongos evaluados en este estudio y que no fueron identificados, para disponer de mayor información de cepas nativas con potencial enzimático.
- Evaluar la producción enzimática de los hongos de podredumbre blanca mediante cultivos mixtos, ya que la presencia de consorcios podría incrementar la actividad enzimática para la degradación de residuos.
- Evaluar la actividad enzimática intracelular de la lacasa en los hongos estudiados.
- Ampliar los ensayos del efecto de actividad lacasa sobre otros residuos agrícolas, lo cual permitirá determinar la utilidad de las enzimas lacasas en la disminución de la contaminación actual.
- Desarrollar procesos de escalado de la enzima lacasa, lo cual permitirá su aplicación sobre los residuos agrícolas descartados.
- Desarrollar estudios que involucren la biotecnología como herramienta, lo cual permitirá reutilizar los residuos agrícolas como fuente potencial de celulosa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra K. H., Cavaco-Paulo, A., y Gübitz, G. (2000). Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8):3357-3362.
- Abdel-Sater M A y El-Said A H M. (2001). Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 47(1): 15-21 pp.
- Agrios, G. (1996). *Fitopatología*. Editorial LIMUSA, S.A. Primera reimpression de la segunda edición. México. 838 p
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. 5th Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam
- Allbutt, AD., Ayer, WA., Brodie, HJ., Johri, BN., y Taube H. (1971). Cyathin, a new antibiotic complex produced by *Cyathus helenae*. *Canadian Journal of Microbiology* (Ottawa: NRC Research Press/National Research Council Canada) 17 (11): 1401-1407 pp.
- Alcalde, M., Bulter, T. (2002). Colorimetric assays for screening laccases. En: *Methods in Molecular Biology*, vol. 230. *Directed Enzyme Evolution: Screening and Selection Methods*. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 193-201 pp.
- Alcalde, M., Bulter, T. (2003). Preparing libraries in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Molecular Biology* 231:17-22 pp.
- Allen MS., y Mertens DR. (1988). Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. *Journal of Nutrition* 118:261-270 pp.
- Alpízar, J. (2007). Utilización de la biomasa residual del cultivo de piña (*Ananas comosus*) para la desproteinización enzimática de los desechos de la actividad camaronera. Tesis, Universidad Nacional. Costa Rica. Págs.15-20.
- Amezcuca Castillo, F., Granados Baeza, M. J., y Tinoco Valencia, J. R. (2009). Estudio de las condiciones hidrodinámicas del cultivo de *Pleurotus ostreatus* CP50 en

fermentador de 10L. XVIII Seminario sobre Residencias Profesionales en el Área de Ingeniería Química Bioquímica.

Anke, T., y Oberwinkler, F. (1977). The striatins—new antibiotics from the basidiomycete *Cyathus striatus* (Huds. ex Pers.) Willd. *Journal of Antibiotics* (Tokio: Japan Antibiotics Research Association) 30 (3): 221-225 pp.

AOAC. (1980). *Official Methods of Analysis*, 13th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C. 376-384 pp.

Arboleda Echavarría, C., y Mejía Gallón, A. (2010). Inducción de la actividad de lacasa en *Ganoderma sp.* y actividad antioxidante de su biomasa. *Revista Cubana de Farmacia* 44(4), 519-532 pp.

Arias, M. E., Arenas, M., Rodríguez, J., Soliveri, J., Ball, A. S., y Hernández, M. (2003). Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4):1953-1958.

Armentrout, C. (1988). Population assessment of *Fusarium spp.* in soil. In: A.B.A.M. Baudin (ed.). *Laboratory Exercises in Plant Pathology: an Instructional Kit*. APS. Minesota, USA 131-134 pp.

Ayala-Zavala, J.F., et al. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International* Vol. 44, no. 7, 1866–1874 pp.

Baldrian, P. (2006). Fungal laccases- occurrence and properties. *FEMS Microbiology Review*, 30, 215-242 pp.

Béguin, P., y Aubert, J.-P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev.* 13, 25-58.

Benítez S., y Gonzales L. (2003). Aceleración del proceso de compostaje utilizando *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces* y *Trichoderma harianum*. Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Microbiología Clínica y Aplicada. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. 23 p.



Bergbauer, M., Eggert, C., y Kraepelin, G. (1991). Degradation of chlorinated lignin compounds in a bleach plant effluent by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35(1):105-109 pp.

Berrio, J., Plou, F. J., Ballesteros, A., Martínez, A. T., y Martínez, M. J. (2007). Immobilization of *Pycnoporus coccineus* laccase on Eupergit C: Stabilization and treatment of olive oil mill wastewaters. *Biocatalysis and Biotransformation* 25(2):130-134 pp.

Blazquez, MA. (2007). Residuos agrícolas y de origen animal. Capítulo XV. Consejería de medio ambiente. Junta de Andalucía. 306-326 pp. Disponible en: [www.juntadeandalucia.es/medioambiente/educacion./rua15.pdf](http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/educacion./rua15.pdf)

Bourbonnais R., Paice M., Freiermuth B., Bodie E., y Borneman S. (1997). Reactivities of various mediators and laccases with Kraft pulp and lignin model compounds, *Applied and Environmental Microbiology*, 4627-4632 pp.

Bourbonnais R., y Paice M. (1990). Oxidation of nonphenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267, 99–102 pp.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:255-260 pp.

Camarero S., García O., Vidal T., Colom J., del Río JC., Gutiérrez A., Gras JM., Monje R., Martínez MJ., y Martínez AT. (2004). Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme Microbial Technology Journal*. 35:113-120 pp.

Carrillo, Leonor. (2003). Actividad microbiana. *Microbiología Agrícola*. 1-28 pp. Consultado: 25 de setiembre de 2017. Disponible en: <http://www.librospdf.net/Microbiologia-agricola-Leonor-Carrillo-2003/1/>.

Carpita, NC., y Gibeut, DM. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 1993; 3:1-30.

Casas Godoy L., Coral G., y Sandoval F. (2014). Enzimas en la valorización de residuos agroindustriales. Revista Digital Universitaria [en línea]. 1 de noviembre de 2014. Vol. 15, No.12.

Castillo, M. (2013). Efecto del tiempo de fermentación de residuos animales y vegetales en la elaboración de bokashi en la zona de Quevedo. Previo a la obtención del título de: Ingeniero Agropecuario. Quevedo. Los Ríos, Ecuador. 70 p.

Castro, R. (2008). Marco Legal moderno para la gestión integral de residuos sólidos en Costa Rica. Ambientico: Por una inmediata Gestión Integral de los Residuos Sólidos. 178 (7). 7 – 8 pp.

Castro Saya, Y. (2013). Estudio de la bioquímica de enzimas lignocelulolíticas. Trabajo de grado de especialización (Especialista en Microbiología Industrial). Universidad Católica de Manizales, Instituto de Investigación de Microbiología y Biotecnología. 53 p.

Catalán, D. (2004). Evaluación técnico-económica de la aplicación de hongos de pudrición blanca (HPB) en pulpaje Kraft. Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Forestal. Santiago – Chile. 59 p.

CCA. (2014). La quema de residuos agrícolas: fuente de dioxinas, Comisión para la Cooperación Ambiental, Montreal, Canadá, 6 pp.

Chabra M., Mishra S., y Sreekrishnan TR. (2008). Mediator-assisted decolorization and detoxification of textile dyes/dye mixture by *Cyathus bulleri* laccase. Applied Biochemistry and Biotechnology (Totowa: Humana Press) 151 (2-3): 587-598 pp. ISSN 0273-2289. OCLC 438645528. PMID 18506632. doi:10.1007/s12010-008-8234-z.

Chandler, Peter J. (2001). The Flat-footed flies (Opetiidae and Platypezidae) of Europe, Fauna Entomologica Scandinavica 36, Leiden: Brill, 1-278 pp, ISBN 90-04-12023-8.

Chandrasekaran, M., y Bahkali, A.H. (2013). Valorization of date palm (*Phoenix dactylifera*) fruit processing by-products and wastes using bioprocess technology- Review. Saudi Journal of Biological Sciences [en línea]. Vol. 20, no. 2, 105–20 pp.

Chang VS., y Holstzapple MT. (2000). Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. Applied Biochemistry and Biotechnology 84- 86: 5-37 pp.

Chaparro, D., y Rosas, D. (2006). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de la madera en la reserva natural La Montaña del ocaso, Quimbaya. Quindo. Proyecto previo a la obtención del título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeciana. Bogotá Colombia. 24-27 pp.

Chefetz B., Chen, Y., y Hadar, Y. (1998). Purification and characterization of lacase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3175-3179 pp.

CINPE. (2013). Informe Final: Escenarios costo-efectividad de medidas de mitigación: Café. Octubre 2012 CINPE/PNUD. Info Agro disponible en [www.infoagro.go.cr](http://www.infoagro.go.cr) en su Boletín No 23.

Collins, P., Dobson, A. D. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63. pp. 3444-3450.

Collins P., Dobson A., y Field J. (1998). Reduction of the 2, 2'-Azino-bis (3-Ethylbenzthiazoline-6Sulfonate) Cation Radical by Physiological Organic Acids in the Absence and Presence of Manganese. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (6), 2026-2031 pp.

COOPSA. (2006). Coordinación, control de obras y proyectos: México. D.F. Disponible en: <http://www.corbypsa.com.mx/>

CENAGRO. (2014). Cantidad de fincas por extensión sembrada y cosechada en hectáreas y cantidad de plantas dispersas según cultivos anuales y permanentes. VI Censo Nacional Agropecuario 2014, Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC). Disponible en: [www.inec.go.cr/censos/censo-agropecuario-2014](http://www.inec.go.cr/censos/censo-agropecuario-2014)

Córdoba, K. (2009). Resistencia natural de *Guadua angustifolia Kunth* al ataque de hongos ligninolíticos como alternativa hacia nuevas posibilidades de uso. Proyecto previo a la obtención del título de Maestría en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Javeciana. Bogotá Colombia. 41-43 pp.

Córdoba, M. (2011). Determinación del efecto de la concentración de la base NaOH de la celulosa 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: Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. 63 p.

Coto, O. (2013). Uso de los Residuos Agrícolas Orgánicos como Fuente de Energía: Aprovechamiento de Recursos y Reducción de Gases de Efecto invernadero en Costa Rica. Informe de Consultoría. Producto 1: Evaluación de la Generación de Residuos Agrícolas Orgánicos (RAO) en Costa Rica e Identificación de Sector Prioritario. FITTACORI, San José, Costa Rica, Noviembre.

Couto, S.R., y Herrera, J. (2007). Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances* 25: 558-569 pp.

Couto, S.R., y Herrera, J (2006). Application of laccases in the textile industry. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 1: 117-122 pp.

Couto, S.R., y Herrera, J (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances* 24: 500-513 pp.

Couturier M., Navarro D., Olivé C., Chevret D., Haon M., Favel A., Lesage L., Henrissat B., Coutinho P., y Berrin J. (2012). Post-genomic analyses of fungal lignocellulosic biomass degradation reveal the unexpected potential of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *BMC Genomics* 13: 57 p.

Cruz, A. (2003). Apuntes de coyuntura. *Agricultura mundial: perspectivas para 2030. Comercio Exterior*, Vol 53, Num 8, agosto. 780-787 pp.

Cullen, D. (1997). Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *Journal of Biotechnology*. 53, 273-289 pp.

Cullen D., y Kersten PJ. (1996). Enzymology and molecular biology of lignin degradation. In: Bramble, R Marzluf G (Eds). *The Mycota III*. Springer-Verlag. Berlin, 297-314 pp.

Daljit, S. A., y Paramjit, K. G. (2001). Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. *Bioresource Technology*, 8991 p.

De la Rosa-Hernández M C., Mercado-Flores Y., Evangelista-Martínez Z., y Arana-Cuenca A (2015). Estudio de la actividad enzimática extracelular en cepas de actinomicetos aisladas del parque Nacional El Chico. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería [http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/trabajos/I/cartel e s/CI-19.pdf](http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/trabajos/I/cartel%20e%20s/CI-19.pdf)

Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P., y Bally, R. (2000). Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biology and Biochemistry* 32(7):919-927 pp.

Díaz de Castro, F.J., Restrepo, M.A., y Rojas, W. (2007). Microbiología de las infecciones humanas. Primera Edición. Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín. Colombia. 50 p.

Díaz R. (2010). Caracterización y papel biorremediador de la lacasa producida por el hongo ligninolítico *Coriolopsis rígida* en alpeorujó. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 222 p.

Ding, X. L. (2010). Effect of Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and aromatic compounds on the production of laccase isoforms by *Coprinus comatus*. *Mycoscience*, 51, 6874 p.

Dittmer, J., Patel, N., y Dhawale, S. (1997). Production of multiple laccase isoforms by *Panerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. *FEEMS Microbiol Letter* 149: 65-70 pp.

Dumonceaux, T., Bartholomew, K., Valeanu, L., Charles, T., y Archibald, F. (2001). Cellobiose dehydrogenase is essential for wood invasion and nonessential for kraft pulp delignification by *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 29(8), 478-489 pp.

Eggert, C., Temp, U., y Eriksson, K. (1996). The Ligninolytic System of the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterization of the Laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 1151–1158 pp.

Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D., y Eriksson, K.E.L. (1996). A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structure and synthetic lignin by laccase. FEBS Lett. 391. pp. 144-148.

Elbehri, A., G. Calberto., C. Staver., A. Hospido., L. Roibas., D. Skully., P. Siles., J. Arguello., I. Sotomayor., y A. Bustamante. (2015). Cambio climático y sostenibilidad del banano en el Ecuador: Evaluación de impacto y directrices de política. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Roma, Italia.

Eriksson, K.-E. L. (1989). Biotechnology in the pulp and paper industry. Wodd Sci Technol. 24, 79-101.

Esposito, E., Vanderlei P., y Durdan, N. (1991). Screening of lignin-degrading fungi for removal of color from kraft mill wastewater with no additional extra carbón-source. Biotechnology Letters Vol 13 No 8 571-576 pp.

Fanchini C R., Temer B., Teixeira M C., y Cano E. (2010). Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. Bioresource Technology 101(11): 4139-4143 pp.

FAO. (2010). Agricultura climáticamente inteligente. Políticas, practicas y financiación para la seguridad alimentaria, adaptación y mitigación. Disponible en: [www.climatesmartagriculture.org/72611/en](http://www.climatesmartagriculture.org/72611/en).

Field, J. (1987). Aguas residuales de café. In: Arranque y operación de sistemas de flujo ascendente con manto de lodos -UASB-. Manual del curso. Santiago de Cali, noviembre.

Gaitán D., y Perez 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. Presentado como requisito para optar al título de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 81 p

Galanakis, C.M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. Trends in Food Science & Technology Vol. 26, no. 2, 68–87 pp.

Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C. K., Strauss, J., y Haltrich, D. (2002). Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* 148:2159-2169 pp.

Galhaup, C., y Haltrich, D. (2001). Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology Biotechnology* 56:225-232 pp.

García, A., y Torres, R. (2003). Producción de enzimas lignolíticas por Basidomycetes mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido. *Revista Colombiana de Biotecnología* 4 (1): 56-64 pp.

García Alzate, L.S., Sánchez Tarquino, L.T., Padilla Sanabria, L., y Giraldo, G., A. (2012). Degradación de celulosa en desechos orgánicos domésticos en los estratos sociales 1 y 2 utilizando *Aspergillus niger*. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente*, núm. 11, enero-diciembre, 2012, pp. 27-32 Universidad del Valle Cali, Colombia. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231125817003>

Gorbatova, O.N., Stepanova, E.U., y Koroleva, O.V. (2000). Certain Biochemical and physicochemical properties of the inducible form of extracellular laccase from basidomycetes *Coriolus hirsutus*. *Paia Biokhimiia i Mikrobiologiya*. 36. pp. 272-277.

Giardina P., Palmieri G., Scalani A., Fontanello B., Faraco V., Cennamo G., y Sannia G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem Journal* 34, 655-663 pp.

Godliving Y. (2012). Lignocellulolytic enzymes from tropical fungi: Types, substrates and applications. *Scientific Research and Assays*. Vol 7 (15) .1544 -1555 pp.

Granda, D M., Mejia, A., y Jimenez, G. (2005). Utilización de residuos de plátano para la producción de metabolitos secundarios por fermentación en estado sólido con el hongo *Lentinus crinitus*. En: *Vitae*, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Vol. 12, no. 2, 13-20 p.

Grijalva N. (2013). Degradación de residuos vegetales mediante inoculación con cepas microbianas. *Enfoque UTE*, V.4-N.1, Jun:1-13 pp.

Groenewald, S. (2006). Biology, pathogenicity and diversity of *Fusarium oxysporum* .f.sp cubense. Trabajo de grado de Maestría. Universidad of Pretoria. Pretoria. Sudáfrica.158 p.

Guillén-Navarro, G.K., Márquez- Rocha, F.J., y Sánchez-Vázquez, J.E. (1998). Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. Revista Iberoamericana de Micología. 15:302-306 pp.

Gutiérrez, H., y de la Vera, R. (2008). Análisis y diseño de experimentos. Segunda edición Mc Graw Hill. Mexico. 59-98 y 128-164 pp.

Gutierrez, J., Pinzón., M; Londoño, A Blach, D; y Rojas A. (2010). Residuos de plaguicidas organoclorados, organofosforados y análisis fisicoquímico en piña (*Ananas comosus* L.). Agro Sur Vol. 38 (3) 199-211 pp.

Hamel KE., Jensen KA., Mozuch MD., Landucci L., Tien M., y Pease EA. (1993). Lygninolysis by a purified lignin peroxidase. Journal of Biological Chemistry 268: 12274-12281 pp.

Herrera, J., y Rosas, J. (2003). Estudio preliminar de la producción de enzimas ligninolíticas por los hongos *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* para el tratamiento de efluentes en la industria papelera. Bogota-Colombia (Version electronica).

Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W. y Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. Science. 315, 804-7.

Honda Y., Ha H.C., Honda Y., Watanabe T., y Kuwahara M. (2001). Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus pstreatus*. Applied Microbiology Biotechnology 55: 704-711 pp.

Huber, M. y Lerch K. (1987). The influence of coper on the induction of tyrosinase and laccase in *Neurospora crassa*. FEBS Letters. 219 (2). pp. 335-338.



Hurter, W.R. (2001). Nonwood plant fiber uses in papermaking. Hurter Consult Incorporated. Extracted from "Agricultural Residues", Tappi. 1997. Non wood fibers short course notes, updated and expanded.

ICIDCA. (1988). Manual de los derivados de caña de azúcar. Minaz. México. 458 p.

ICIDCA. (2006). Curso sobre tecnologías limpias en la industria azucarera. Instituto de Derivados de la Caña de Azúcar. La Habana (Cuba). Ciencia y Tecnología de Alimentos 5(4) 293-305 pp.

Ivester, A., y Neefes, J. (2010). Industria de productos textiles. Enciclopedia de la Salud y Seguridad en el Trabajo. Disponible en: [http://www. Insht.es/Insht Web/Contenidos/Documentacion/Textos Online/Enciclopedia OIT/Tomo 3/89.pdf](http://www.Insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/Textos Online/Enciclopedia OIT/Tomo 3/89.pdf).

Jeffries, T.W., Choi, S., y Kirk, T.K. (1981). Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 42. pp. 290-296.

Johannes Ch., y Majcherczyk, A. (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator system. Applied and Environmental Microbiology 66, 524-528 pp.

Johannes Ch., y Majcherczyk, A. (2000a). Laccase activity tests and laccase inhibitors. Journal of Biotechnology 78, 193-199 pp.

Julca-Otiniano, A., Meneses-Florián., L, Blas-Sevillano., R y Bello-Amez, S. (2006). La materia organica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. *Idesia (Arica)*, 24(1), 49-61 pp.

Kadla, J. F., y Gilbert, R. D. (2000). Cellulose structure: A review. Cellul Chem Technol. 34, 197-216.

Kambis, AD, y Levine, J S. Biomass Burning and the Production of Carbon Dioxide: a Numerical Study., capítulo 17 en: Biomass Burning and Global Change (1996), Joel S. Levine (comp.), Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, EU, vol. 1, pp. 170-177 pp.

Kang, HS., Kim, KR., Jun, EM., Park, SH., Lee, TS., Suh, JW., y Kim, JP. (2008). Cyathuscavins A, B, and C, new free radical scavengers with DNA protection activity

from the Basidiomycete *Cyathus stercoreus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (Oxford: Pergamon Press) 18 (14): 4047-4050 pp.

Kirk, K.T., Schultz, E., Connors, W.J., Lorenz, L.F., y Zeikus, J.G. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 117. pp. 277-285.

Krzyczkowski, W. (2008). The structure, medicinal properties and biosynthesis of cyathane diterpenoids. *Biotechnologia* (Varsovia: Państwowe Wydawnictwo Naukowe) 1: 146-167 pp.

Kües, U., y Liu, Y. (2000). Fruiting Body Production in Basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 54:141-152 pp.

Kumar R., y Wayman CE. (2009). Cellulase adsorption and relationship to features of corn stover solids produced by leading pretreatments. *Biotechnology and Bioengineering* 103:252-267 pp.

Kunamneni, A., Ballesteros, A., Plou, A., y Alcalde, M. (2007). Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* A. Méndez-Vilas (Ed.).233–245.

Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A., y Alcalde, M. (2008). Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories* 7(1):32 p.

Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F. J., y Alcalde M. (2008b). Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. *Process Biochemistry*, 43(2):169-178 pp.

Lalita, Prasher I.B. (2014). Qualitative screening of lignocellulolytic enzymes in wood rotting agaricomycetes from North Western Himalayas. *Journal of Advanced Botany and Zoology.* (1:3) 1-3.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* vol.227, no. 5259, 680-685 pp.

Larios, G. (2010). La quema de la caña de azúcar en Guanacaste, impacto ambiental. Deber del estado disminuir sus efectos. Tesis para optar por el grado de Licenciada en Derecho. Facultad de Derecho. UCR, Costa Rica. 154 p.

Lee, J.-W., Gwak, K.-S., Park, J.-Y., Park, M.-J., Choi, D.-H., Kwon, M., y Choi, I.-G. (2007). Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. *J Microbiol.* 45, 485-491.

Lemieux, PM., Lutes, CC., y Santoianni, DA. (2004). Emissions of organic air toxics from open burning: a comprehensive review. *Progress in Energy and Combustion Science*, núm. 30, pp. 1-32.

Liu, Lihua., y col. (2009). Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 44, no. 6-7, p. 426–433 pp.

Liu, YJ., y Zhang, KQ. (2004). Antimicrobial activities of selected *Cyathus* species. *Mycopathologia* (La Haya: W. Junk) 157 (2): 185-189 pp.

Loera, C. O., Pérez, P. M., Barbosa, R. J., y Villaseñor, O. F. (2006). Laccases. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, 323-340 pp.

Lonergan G., Mew E., Schliephake K., y Baker, W. (1997). Phenolic substrate for fluorometric detection of laccase activity. *FEMS Microbiology Letters* 153, 485-490 pp.

López, J. (2001). Relación entre la actividad de las enzimas lacasa y la maduración de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonaris*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa. México, D.F.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., y Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66, 506-577.

Manals-Cutiño, Enma M., Penedo-Medina, Margarita., y Salas-Tort, Dolores. (2015). Caracterización del bagazo de caña como biomasa vegetal. *Tecnología Química*, 35(2), 244-255 pp. Recuperado en 15 de octubre de 2017, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-61852015000200010&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852015000200010&lng=es&tlng=es)

Manjarres, K., Castro, A., y Rodríguez, E. (2010). Producción de lacasa utilizando *Pleurotus ostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña. Revista Lasallista de Investigación, vol. 7, núm. 2, julio-diciembre, 9-15 pp.

Mansur, M., Suarez, T., y Gonzales, A.E. (2003). Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). Applied and Environmental Microbiology. 64: p. 771-774 pp.

Marquez, A. (2004). Determinación de patrones de inducción de lacasas en el hongo *Trametes* sp. EUM1. Tesis para obtener el grado de Especialización en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Iztalapa. Mexico, DF.

Martínez-Anaya C., y col. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. Revista Latinoamericana de Microbiología 50 (3-4): 119-131 pp.

Martínez, A., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martínez, M., Gutiérrez, A y Del Rio, J. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. Int Microbiol, 8. [En línea]. 195-204 pp.

Martínez de Lejarza, J. (2004). Análisis de varianza por un factor. Disponible en: [http://www.docstoc.com/3262706/ANOVA-ANOVA-ANC81LISIS-De-La\\_Varianza-Por-Un-Factor-Juan](http://www.docstoc.com/3262706/ANOVA-ANOVA-ANC81LISIS-De-La_Varianza-Por-Un-Factor-Juan).

Mata, G., y Savoie, J.M. (1998). Extracellular enzyme activities in six *Lentinula elodes* strains during cultivation in wheat straw. World Journal of Microbiology and Biotechnology 14:513-519 pp.

Mayer AM., y Staples RC. (2002). Laccase: New functions for old enzymes. Phytochemistry. 60(6):551-565 pp.

McKendry, P. (2002). Energy production from biomass (part I): Bioresource Technology., 83: p. 37-46 pp.

Mediavilla Molina, A., Angulo Romero, J., Rodero Franganillo, J.M., Domínguez Vilches, E., Galán Soldevilla, C., y García Pantaleón, F.I. (1996). Fungal contamination of

potential medical interest in Spanish grain stores. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 6: 196-201 pp.

Méndez, V. M. M., Maldonado, T. L., y González, Z. A. (1981). Estudio de la bagazosis en México durante ocho años. *Revista Médica IMSS (Méx.)* 19, 65 p.

Meza, J. C., Lomascolo, A., Casalot, L., Sigoillot, J. C., y Auria, R. (2005). Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar-cane. *Process Biochemistry* 40 (10), 3365-3371 pp.

Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31 (3), pp 426–428 pp.

Ministerio de Salud. (2016). Plan Nacional para la Gestión Integral de Residuos 2016-2020. 1ed. San Jose, Costa Rica. CD, 116 p. ISBN: 978-9977-62-166-1.

Minussi RC., Pastore G., y Durán N. (2002). Potential applications of laccase in the industry. *Trend Food Sci. Technol.* 13: 205-216 pp.

Moldes, D., Gallego, P., Couto, S.R., y Sanroman, A. (2003). Grape seeds: The best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsute*. *Biotechnology Letter* 25: 491-495 pp.

Morales, H. (2006). Aislamiento, selección y evaluación de la actividad celulolítica de 4 cepas de hongos nativos de Costa Rica. Informe de Trabajo Final de graduación. Escuela de Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 36 p.

More, S., Renuka, P.S., Pruthvi K., Swetha M., Malini S., y Veena, S. (2011). Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Lacasse from *Pleurotus* sp. *Enzyme Research*, 248735, 7 p.

Mosier NC., Wyman B., Dale B., Elander R., Lee YY., Holtzapple M., y Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96:673-686 pp.

Motato, K., Mejia, A., y Leon, A. (2006). Evaluación de los residuos agroindustriales de plátano (*Musa paradisiaca*) y aserrín de abarco (*Cariniana piriformes*) como sustratos

para el cultivo del hongo. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Vol. 13, no. 1, 24-29 pp.

Muñoz, C., Guillen, R., Martínez, A.T., y Martínez, M.J. (1997). Laccase Isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and Mn<sup>2+</sup> oxidation. *Applied Environmental Microbiology*, 63 (6):2166-2174 pp.

Murrieta Hernández, D., Iglesias Andreu, G., e 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* [en línea] 2002, 4 *Foresta Veracruzana* 4(1):47-52 pp.

Mussatto S I., Aguilar C N., Rodríguez L R., y Teixeira, J A. (2009). Fructooligosaccharides and B-fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* 59(1–3): 76-81 pp.

Nelson, D.W., y Sommers, L. (1982). Total carbon, organic carbon and organic matter in *Methods of soil analysis Part 2. Chemical and microbiological properties, (methodsofsoilan2)*, p.539-579 pp.

Niladevi, K. N., Sukumaran, R., y Prema, P. (2007). Utilization of rice straw for laccase production by *Streptomyces psammoticus* in solid-state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34, 665–674 pp.

Ohga, S., Cho, N., Thurston, CF., y Wood, D.A. (2000). Transcriptional regulation of laccases and cellulase in relation to fruit body formation in the mycelium of *Lentinula edodes* on a sawdust-based substrate. *Mycoscience* 41: 149-153 pp.

Okamoto, K., Yanagi, S.O., y Sakai, T. (2000). Purification and characterization of extracelular from *Pleurotus ostreatus*. *Mycoscience* 41: 7-13. pp

Oliveira A., Gomez R., y Haully M C O. (1996). Lactic acid production by biodegradation of agroindustrial residues. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 37(1– 2): 113 p.

Ortega G., Bueno G., Betancourt D., Alvarez I., y Gonzales AL. (2005). Biotransformación de residuos lignocelulósicos con hongos *Pleurotus*. Revista CENIC, Vol 36, No. Especial.

Ortiz, Martha L. (2009). Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina, Orinoquia, Redalyc, Vol. 13, núm. 2, Diciembre, pp 137-144 pp.

Osma, J J., Toca J L., y Rodríguez-Couto, S. (2011). Cost analysis in laccase production. Journal of Environmental Management, 1-6 pp.

Osma, J J., Toca J L., y Rodríguez-Couto, S. (2007). Banana skin: A novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration. En: Dyes and Pigments. Vol. 75, no. 1. 32-37 pp.

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., y Sannia, G. (2000). Copper Induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology. 66. pp. 920-924.

Plaster, Edward J. (2000). La ciencia del suelo y su manejo. Ed. Paraninfo. S.A. 419 p. ISBN: 9788428326438.

Pentilla, M., y Saloheimo, M. (1999). Lignocellulose breakdown and utilization by fungi. In: Oliver, R and Schweizer, M. Molecular fungal Biology. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom 377 p.

Peters, D. (2006). Carbohydrates for fermentation. Biotechnol J. 1, 806-814.

Porta, J., López-Acevedo, M., y Roquero, C. (2003). Edafología para la agricultura y el medio ambiente. 3ª edición, Mundi-Prensa, Madrid.

Potthast A., Rosenau T., Chen C., y Gratzl J. (1996). A novel method for the conversion of benzyl alcohols to benzaldehydes by laccase catalysed oxidation. Journal of Molecular Catalysis A. 108, 5-9 pp.

Preussler, César A., Shimizu, Ernesto, Villalba, Laura L., y Zapata, Pedro D. (2009). Copper laccase induction in white rot fungi *Trametes villosa* (Sw.: Fr.) kreisel. Revista de Ciencia y Tecnología, (12), 09-16. Recuperado en 12 de octubre de 2017, de

[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-75872009000200002&lng=es&tlng=en](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-75872009000200002&lng=es&tlng=en).

Programa Competitividad y Medio Ambiente (CYMA). (2007). Plan de Residuos Sólidos Costa Rica (PRESOL): Diagnóstico. 2007. Pág.12.

Puri, M., Sharma., D. y Barrow, C.J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. Trends in biotechnology [en línea]. 2012, Vol. 30, no. 1, pp. 37–44 pp.

Quemada, M., M. L. Cabrera., y McCracken, D. (1997). Nitrogen release from surface-applied covercrop residues: Evaluating the CERES N submodel. Agron.J. 89, 723-729 pp.

Quesada, K. (2003). Utilización Del rastrojo de piña (Ananás comosus) como refuerzo de una resina poliéster comercial. Tesis, Universidad Nacional. Costa Rica. Págs. 1-4.

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. Ingeniería Química. Bogotá D.C. 178 p.

Quijandría, G., Berrocal, J., y Pratt, L. (1997). La industria de la piña en Costa Rica. Análisis de sostenibilidad. Disponible en: <https://www.incae.edu/ES/clacds/publicaciones/pdf/cen707.pdf>

Ramírez, N. E., y col. (2003). Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. Revista Colombiana de Biotecnología, vol 5, no, 2, 64-72 pp.

Ramírez, F., Bravo, V., y de la Cruz, E. (2012). Importación y Uso de Plaguicidas en Costa Rica: período 2006-2012. Informe Área Ciencias Naturales 195.Diagnóstico, Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas. Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica.

Ranganna, S. (1977). Manual of Analysis of Fruits and Vegetable Products. New. Delhi: Tata Mc Graw. Hill Pub Co. Ltd. 634.



Reddy, G.V., y col. (2003). Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochemistry*. Vol. 38, no. 10, p. 1457-1462 pp.

Reto Steiner. (2006). Utilización energética de residuos orgánicos en la industria bananera, cafetalera y azucarera en Costa Rica, Trabajo de Tesis, Postgrado en Ingeniería Ambiental. San José, Costa Rica, 21 de abril.

Rodríguez O V., y Hansen H. (2007). Obtención de dextrano y fructosa, utilizando residuos agroindustriales con la cepa *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F. *Revista de la Escuela de Ingeniería de Antioquia, Medellín (Colombia)* 7: 159-172 pp.

Rodríguez Couto, S., y Sanroman, M. A. (2005). Application of solid state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, 22, 211–219 pp.

Rodríguez, S., Fernández, M., Bermúdez, R., y Morris, H. (2003). Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. *Revista Iberoamericana de Micología*, 20(4):164-168 pp.

Rodríguez, S., Gudín, M., y Lorenzo, M. (2002). Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochemistry*. 00. pp. 1-7.

Rodríguez E., Pickard M., Vázquez-Duhalt R. (1999). Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi. *Current Microbiology* 38, 27-32 pp.

Rojas, G. (2010). Producción de enzimas lignolíticas por hongos de pudrición blanca aislados en Nuevo León. Tesis Doctor en Ciencias. Especialidad Biotecnología. Universidad Autónoma de Nuevo León. 222 p.

Rosales, E., Rodríguez Couto, S., y Sanroman, A. (2002). New uses of food waste: application to laccase production by *Trametes*. *Biotechnology Letters*, 24, 701-704 pp.

Rosenberg, S.L. (1978). Cellulose and Lignocellulose degradation by thermophilic and thermotolerant fungi. *Mycologia*. 70. pp. 1-13.

Rubilar, O. (2007). Biorremediación de suelos contaminados con pentaclorofenol (PCF) por hongos de pudrición blanca. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias de Recursos Naturales, Universidad de la Frontera. Temunco. Chile. 43-48 pp.

Ruíz Kunstmann, J. (2004). Determinación de factores ambientales para el crecimiento de dos hongos (*Lentinus edodes* y *Stereum hirsutum*) y su acción biodegradante sobre la madera de *Pinus radiata* y *Eucalyptus globulus*. Disponible en <http://www.repositorio.uchile.cl/handle/2250/105052>.

Salmones, D., y Mata, G. (2005). Efecto de la presencia de compuestos solubles de lignina y fenoles sobre la producción de lacasa y biomasa en cultivos de *Pleurotus* spp. Revista Mexicana de Micología No. 21. núm. 21, diciembre, 63-69 pp.

Salony, G., Mishra S., y Bisaria, VS. (2006). Production and characterization of laccase from *Cyathus bulleri* and its use in decolourization of recalcitrant textile dyes". Applied Microbiology and Biotechnology 71 (5). Heidelberg: Springer-Verlag. pp. 646-653. ISSN 0175-7598. OCLC 5659082254. PMID 16261367. doi:10.1007/s00253-005-0206-4.

Samuels, G.J. (1996). Trichoderma: a review of biology and systematic of the genus. Mycological Research 100:923-935 pp.

Sánchez, S. R. (2013). Biotecnología microbiana: producción, caracterización e inmovilización de enzimas de interés industrial. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha (España).

Sánchez, Saray., Crespo, G., Hernández, Marta., y García, Y. (2008). Factores bióticos y abióticos que influyen en la descomposición de la hojarasca en pastizales. Pastos y Forrajes, 31(2), 1.

Sánchez, P.A., A. P. Cheryl., L.T. Scott., E. Cuevas., y 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.), pp. 125-152. Universities of Hawaii y of Georgia, Maui Hawaii.

Sandoval, N., y Ospina, X. (2008). Evaluación de inductores metálicos y co sustratos para la remoción de negro reactivo 5 empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizados en

Fique. Proyecto previo a la obtencion del título de Microbiologo Industrial. Pontificia Universidad Javenciana. Bogotá. Colombia. 50-54 pp.

Sariaslani, F. S. (1989). Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. Critical reviews in biotechnology. 9. pp. 171-257.

Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. BioTecnología, Vol. 16 No. 2.

Savoie, J.M. (1998). Changes in enzyme activities during early growth of the edible mushroom, *Agaricus bisporus*, in compost. Mycological Research 102(9):1113-1118 pp.

Savoie, J.M., Cesbron, V., y Delpech, P. (1995). Induction of polyphenol-oxidases in the mycelium of *Lentinula edodes*. Science and cultivation of Edible Fungi. Elliot (ed.), pp 787-793 pp.

Shah, V., y Nerud, F. (2002). Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. Canadian Journal of Microbiology, 48(10):857-80 pp.

Schwanninger, M., y Hinterstoisser, B. (2002). Klason lignin: Modifications to improve the precision of the standardized determination. Holzforschung 56(2): 161-166 pp.

Scott G.M., Akhtar M., Lentz M.J. Kirk T.K., Swaney, R., y Shipley, D.F. (1998). An overview of Biopulping Research: discovery engineering. Journal of Korea TAPPI. (30:4) 17-27.

Solis-Oba, M., Barzana E., Gracia-Garibay M., y Viniegra-Gonzales, G. (2007). El ABTS agente oxidante de diversos compuestos químicos y su mecanismo de reciclado entre la lacasa y el sustrato. Revista Mexicana de Ingenieria Quimica. Vol.6, No.3, 275-281 pp.

Sosa A., Rivas J., Mogollon G., Gutierrez I., y Aguilera A. (2011). Evaluación papelera del pseudotallo de platano (*Musa paradisiaca*) en formulaciones con *Hevea brasiliensis*, *Eucalyptus urophylla* y *Pinus caribea var hondrensis*. La Rev. For. Venez, no. 1, p 9.

Stevenson, F.J. (1986). Cycles of soil, Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients. John Wiley y Sons Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. 448 p. ISBN: 978-0-471-32071-5

Subramanian, C. (1983). *Hyphomycetes taxonomy and Biology*. London, Inglaterra. Academic Press. 502 p.

Sun, Y., y Cheng, J. (2002). Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. *Bioresource Technology*, 83, 1-11.

Sundstol F., y Coxworth, EM. (1984). Ammonia treatment. In: Sundstol F, Owen E. editors. *Straw and other fibrous by-products as feed*. Elsevier, Amsterdam; 1984:196-247 pp.

Taniguchi, M., Suzuki, H., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K., y Tanaka, T. (2005). Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. *J Bioscience Bioengineering*. 100, 637-643.

TAPPI, T (2002). 257 cm-02. Sampling and Preparing Wood for Analysis. Technical Association of the Pulp and Paper Industry.

TAPPI, T (2002). 222 om-02. Acid- insoluble lignin in wood and pulp. Technical Association of the Pulp and Paper Industry.

TAPPI, T (2007). 264 cm-07. Preparation of wood for chemical analysis. Technical Association of the pulp and paper industry.

Telke, A.A., Kalyani, D.C., Jadhav, U.U., Parshetti, G.K., y Govindwar, S.P. (2009). Purification and characterization of an extracelular laccase from a *Pseudomonas* sp. LBC1 and its application for the removal of bisfenol A. *Journal of Molecular Catalysis B*, vol 61, no. 3-4, 252-260 pp.

Thurston, Ch. (1994). The structure and function of fungal laccase, review article. *Microbiology* 140, 19-26 pp.

Tomás, R., Porras, S., Jiménez, L., Bolaños, A., y Van der Lucht, A. (2006). Plan de acción conjunto SFE/SENASA para el combate de la mosca del establo (*Stomoxys calcitrans*) (L.). Comisión Técnica Fitosanitaria / Dirección General SENASA. CRSFE-SENASA-PA-06-06. 18 p.

Tuomela M., Vikman M., Hattaka A., e Itävaara M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*; 72: 169-183 pp.

Turrado, José., Saucedo, Alma R., Sanjuán, Rubén., y Sulbaran, Belkis. (2009). Pinzote de Musa balbisiana y Musa acuminata como Fuente de Fibras para Papel. Información tecnológica, 20(4), 117-122 pp.

Yoshida H. (1883). Chemistry of lacquer (Urishi) part 1. Journal of the Chemical Society 43:472-486 pp.

Usayo, P. (2007). Optimización de medios de cultivo para la producción de enzimas ligninolíticas por cepas fungicas aisladas del Altiplano Boliviano. Trabajo de grado para optar por el título de Licenciado en Bioquímica, La Paz: Bolivia. 147 p.

Van Soest, P.J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. 2nd Edition, Cornell University Press, Ithaca, 476 p.

Vasdev, K. (1995). Lignin degrading enzymes and ligninolytic system of *Cyathus sp.* (PhD thesis). Delhi: University of Delhi.

Velasco, JM., Martín, A., y González, A. (2011). Los nombres comunes y vernáculos castellanos de las setas. Micoverna-I. Primera recopilación realizada a partir de literatura micológica e informantes». Boletín Micológico de FAMCAL (Madrid: Federación de Asociaciones Micológicas de Castilla y León) (6): 155-216 pp.

Velastegui, L. (2004). La era de la contaminación en Ecuador. Observatorio de la Economía en Latinoamérica. Ecuador. Revista Académica de Economía. Guayaquil, en: <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/ec/lavm-petr.htm>

Vera, R. (2006). Medios de cultivo líquidos para el desarrollo de inoculos de hongos de pudrición blanca aplicables en biopulpaje Kraft. Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero en Maderas. Santiago-Chile.

Vilchez, L. (2002). Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Tesis Lic. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 6-12 pp.

[http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Basic/Vilches\\_P\\_L/T\\_completo.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Basic/Vilches_P_L/T_completo.pdf) >

- Wackett, LP., Frias, J. A., Seffernick, J. L., Sukovich, D. J., y Cameron, S. M. (2007). Genomic and biochemical studies demonstrating the absence of an alkane-producing phenotype in *Vibrio furnissii* M1. *Appl Environ Microbiol.* 73, 7192-8.
- Wang, W., Yan, L., Cui Z., Gao, Y., y Wang, Y (2011) Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. *Bioresource Technology*, 102: 9321–9324 pp. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21831630>
- Wiegant W.M. (1992). Growth characteristics of the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* in relation to production of mushroom compost. *Applied and Environmental Microbiology.* 1. pp. 1301-1307.
- Winqvist, E., Moilanen, U., Mettälä, A., Leisola, M., y Hatakka, A. (2008). Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by solid-state cultivation of fungi. *Biochemical Engineering Journal*, 42(2):128-132 pp.
- Whitaker, R. (2002). *Handbook of Food Enzymology*. New York, NY, USA: Marcel Dekker Inc., p 526.
- Xiao, YZ., Chen, Q., Hang, J., y Shi, YY. (2006). Selective induction, purification and characterization of a laccase isoenzyme from the basidiomycete *Trametes* sp AH28-2. *Mycologia* 96:2635.
- Xiao, YZ., Tu, XM., Wang, J., Zhang, M., Cheng, Q., Zeng, WY., y Shi, YY. (2003). Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a Laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60:700-707 pp.
- Xu, C., Singh, D., Dorgan, KM., Zhang, X., y Chen S. (2015) Screening of ligninolytic fungi for biological pretreatment of lignocellulosic biomass. *Canadian Journal of microbiology.* (61:10) 745-752 pp.
- Zambrano, F., e Isaza H (1998). Demanda química de oxígeno y nitrógeno total, de los subproductos del proceso tradicional de beneficio húmedo del café. *Cenicafé* 49 (4): 279-289 pp.

Zhang, X., Xu, C., y Wang, H. (2007). Pretreatment of bamboo residues with *Coriolus versicolor* for enzymatic hydrolysis. *J Biosci Bioeng.* 104, 149-51.

## ANEXOS



Anexo 1. Hongo *Trametes* sp a los 10 días de cultivo en medios de cultivo de agar PDA.



Anexo 2. Hongos colocados en AEM durante la primera parte del ensayo.



Anexo 3. Erlenmeyers con los hongos *Ganoderma* sp y *Tricoderma* sp en Agar Wunder durante el proceso de agitación





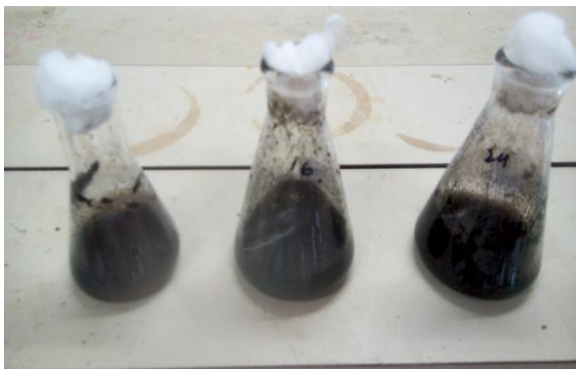
Anexo 4. Muestras en tanque Mini gel durante la corrida.



Anexo 5. Gel en agitación con azul de Coomassie R-250.



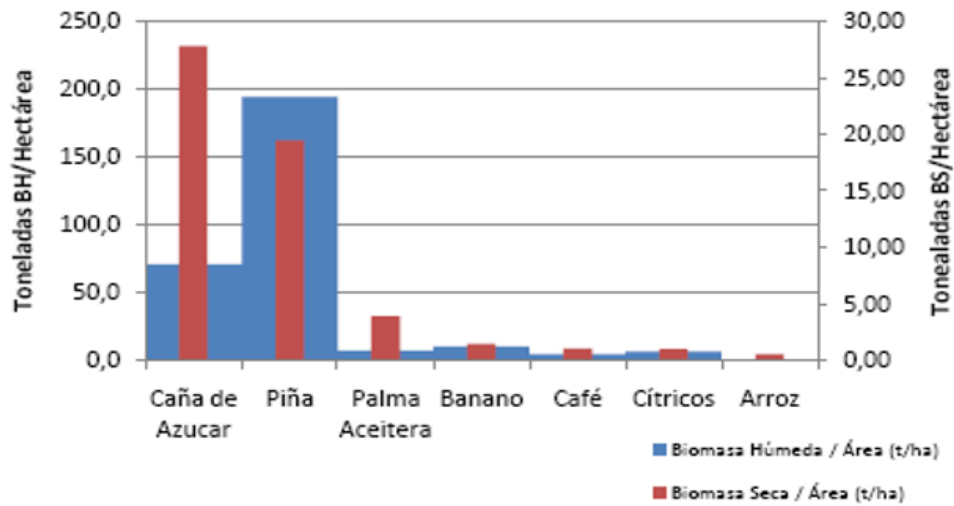
Anexo 6. Muestra de residuo con  $H_2SO_4$  al 4 % conectada a un refrigerante.



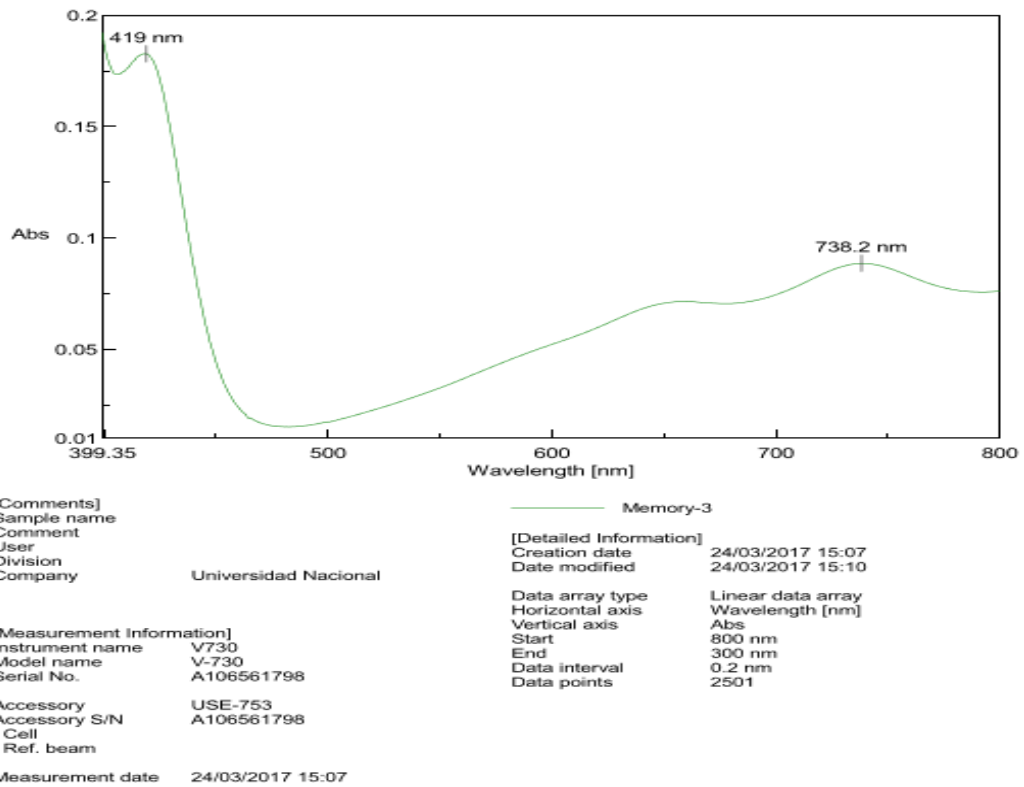
Anexo 7. Residuos de bagazo de caña, corona de piña y pinzote de banano durante el proceso de determinación de lignina Klason al tiempo 0.



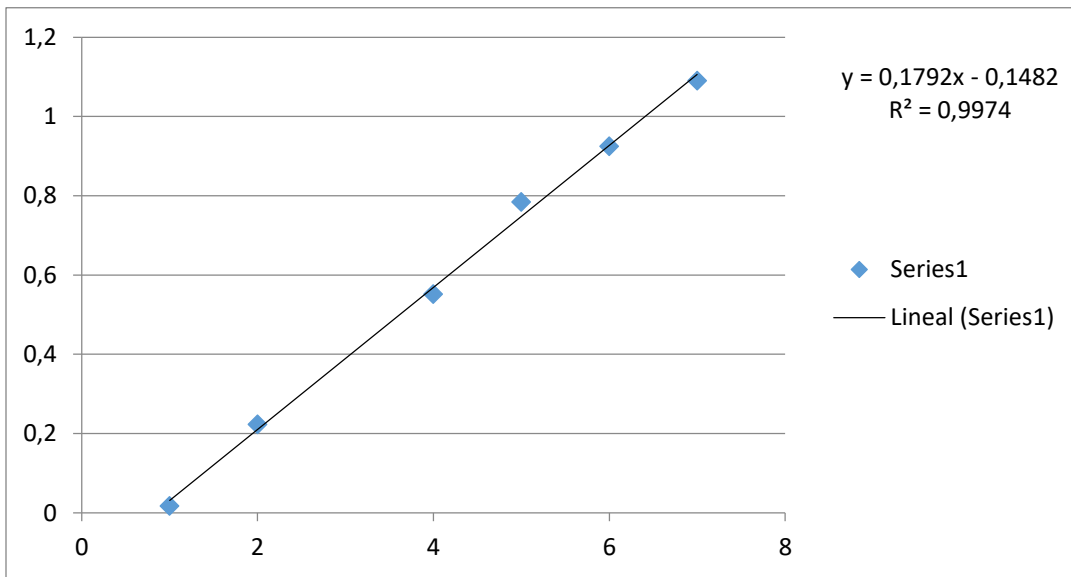
Anexo 8. Residuos de bagazo de caña, corona de piña y pinzote de banano al  $t_0$ , luego de 3h en ebullición.



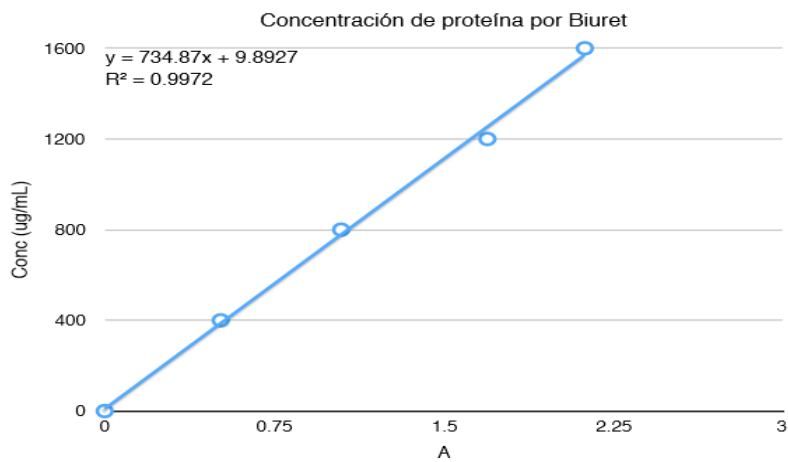
Anexo 9. Comparación de indicadores de biomasa seca y húmeda por área de cultivo para Costa Rica (2012).



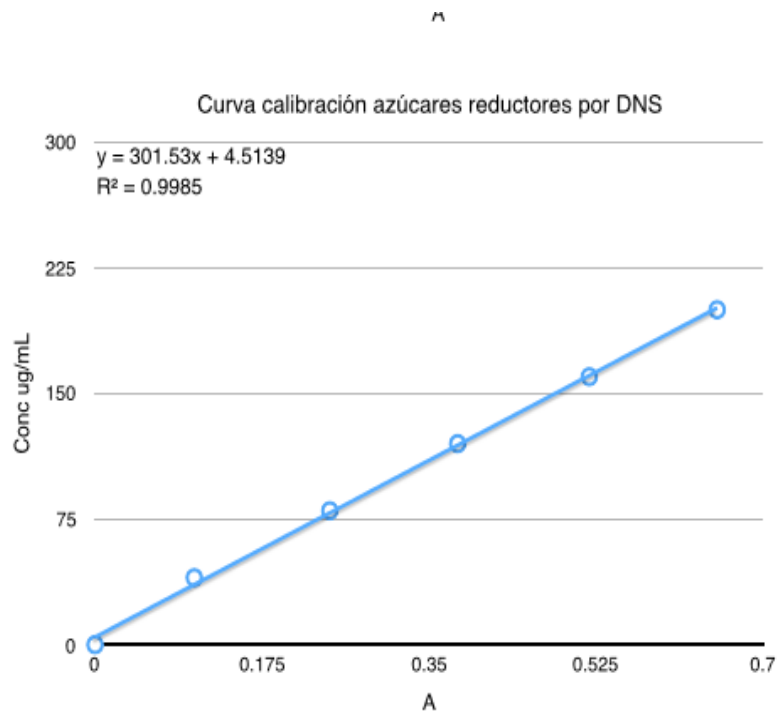
Anexo 10. Curva de absorbancia del ABTS.



Anexo 11. Curva patrón de ABTS



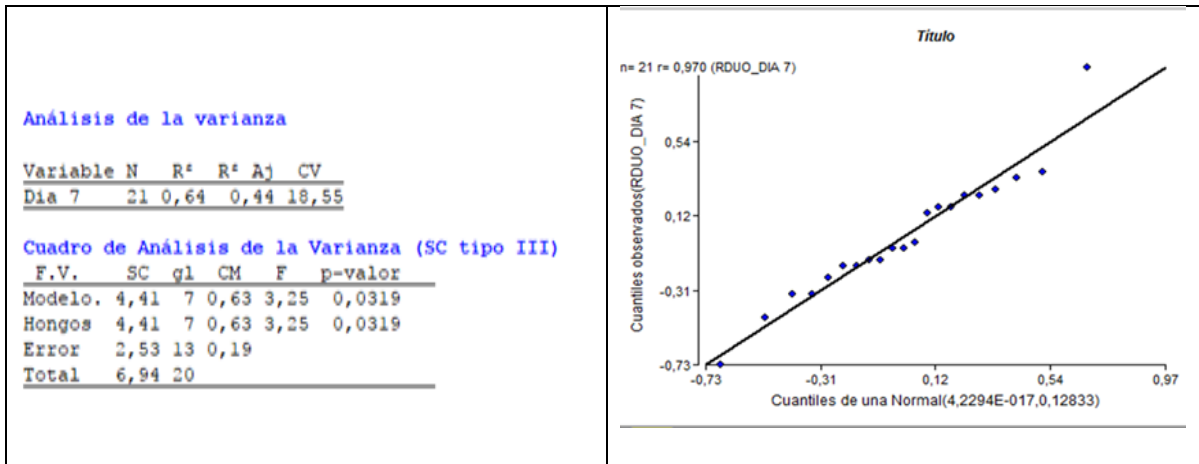
Anexo 12. Curva patrón de proteínas totales.



Anexo 13. Curva patrón de azúcares reductores por DNS.

## Anexo 14

Análisis de varianza y normalidad del diámetro del halo en medio con ABTS a través del tiempo (días)



No hay igualdad de varianzas:  $p = 0,0319$  ( $p < 0,05$ ) Si hay normalidad

Análisis de varianza no paramétrica: Kruskal Wallis

Variable	HONGO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
DIA 7	A	3	1,93	0,23	1,80	12,97	0,0328
DIA 7	Aspergillus niger	3	1,87	0,12	1,80		
DIA 7	B	3	2,17	0,29	2,00		
DIA 7	Cyathus spp	3	2,83	0,35	2,80		
DIA 7	Ganoderma spp	3	3,23	0,87	3,00		
DIA 7	Trametes spp	3	2,27	0,40	2,50		
DIA 7	Tricoderma spp	3	2,33	0,29	2,50		

Trat.	Ranks
Aspergillus niger	4,50 A
A	5,33 A
B	9,67 A B
Trametes spp	10,33 A B
Tricoderma spp	11,83 A B
Cyathus spp	17,33 B
Ganoderma spp	18,00 B

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

Análisis de varianza y normalidad de la actividad enzimática en 4 hongos, a través del tiempo (días)

Análisis de la varianza						Shapiro-Wilks (modificado)				
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV		Variable	n	Media D.E.	W*	p(Unilateral D)
RABS Actividad enzimática	72	0,17	0,13	67,03		RDUO Actividad enzimática	72	0,00 0,02	0,97	0,5935
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)										
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor					
Modelo.	1,5E-03	3	4,9E-04	4,59	0,0055					
Hongo	1,5E-03	3	4,9E-04	4,59	0,0055					
Error	0,01	68	1,1E-04							
Total	0,01	71								

No hay igualdad de varianza:  $p = 0,0055$  ( $p < 0.05$ ) Si hay normalidad

Análisis de varianza no paramétrica: Kruskal Wallis

Prueba de Kruskal Wallis									
Variable	Tiempo (d)	Hongo	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p	
Actividad enzimática	0,00	Cyathus	3	0,09	0,01	0,08	63,78	<0,0001	
Actividad enzimática	0,00	Ganoderma	3	0,08	0,01	0,08			
Actividad enzimática	0,00	Trametes	3	0,08	4,7E-03	0,08			
Actividad enzimática	0,00	Tricoderma	3	0,07	3,2E-03	0,07			
Actividad enzimática	5,00	Cyathus	3	0,15	0,01	0,14			
Actividad enzimática	5,00	Ganoderma	3	0,17	0,01	0,17			
Actividad enzimática	5,00	Trametes	3	0,08	0,01	0,07			
Actividad enzimática	5,00	Tricoderma	3	0,14	0,01	0,13			
Actividad enzimática	7,00	Cyathus	3	0,16	0,02	0,15			
Actividad enzimática	7,00	Ganoderma	3	0,18	0,01	0,18			
Actividad enzimática	7,00	Trametes	3	0,08	5,8E-04	0,08			
Actividad enzimática	7,00	Tricoderma	3	0,16	0,01	0,16			
Actividad enzimática	10,00	Cyathus	3	0,08	2,6E-03	0,08			
Actividad enzimática	10,00	Ganoderma	3	0,10	0,01	0,09			
Actividad enzimática	10,00	Trametes	3	0,08	0,01	0,08			
Actividad enzimática	10,00	Tricoderma	3	0,10	1,0E-03	0,10			
Actividad enzimática	12,00	Cyathus	3	0,10	0,02	0,09			
Actividad enzimática	12,00	Ganoderma	3	0,10	0,01	0,10			
Actividad enzimática	12,00	Trametes	3	0,08	0,01	0,08			
Actividad enzimática	12,00	Tricoderma	3	0,13	0,03	0,12			
Actividad enzimática	14,00	Cyathus	3	0,09	0,01	0,09			
Actividad enzimática	14,00	Ganoderma	3	0,12	0,01	0,11			
Actividad enzimática	14,00	Trametes	3	0,10	0,01	0,10			
Actividad enzimática	14,00	Tricoderma	3	0,11	0,01	0,10			

Trat.	Ranks											
0,00:Tricoderma	2,83	A										
5,00:Trametes	10,50	A	B									
7,00:Trametes	14,17	A	B	C								
0,00:Trametes	14,83	A	B	C								
10,00:Trametes	15,33	A	B	C								
10,00:Cyathus	15,50	A	B	C								
12,00:Trametes	18,17	A	B	C	D							
0,00:Ganoderma	19,67	A	B	C	D							
0,00:Cyathus	24,83	A	B	C	D	E						
14,00:Cyathus	32,17	A	B	C	D	E	F					
10,00:Tricoderma	34,50	A	B	C	D	E	F	G				
10,00:Ganoderma	35,33	A	B	C	D	E	F	G	H			
14,00:Trametes	35,83	A	B	C	D	E	F	G	H			
12,00:Cyathus	36,00	A	B	C	D	E	F	G	H			
12,00:Ganoderma	41,17		B	C	D	E	F	G	H			
14,00:Tricoderma	44,00			C	D	E	F	G	H			
14,00:Ganoderma	49,17				D	E	F	G	H			
12,00:Tricoderma	55,33					E	F	G	H			
5,00:Tricoderma	55,83						E	F	G	H		
5,00:Cyathus	58,33							F	G	H		
7,00:Cyathus	61,83								F	G	H	
7,00:Tricoderma	64,67									F	G	H
5,00:Ganoderma	67,33										G	H
7,00:Ganoderma	68,67											H

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

Análisis de varianza y normalidad de la actividad enzimática en 2 hongos, a través del tiempo (días)

Análisis de la varianza						Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV		Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RABS Actividad enzimática	36	0,30	0,15	99,31		RDUO Actividad enzimática	36	0,00	0,08	0,94	0,2468
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)											
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor						
Modelo.	0,04	6	0,01	2,03	0,0941						
Hongo	0,01	1	0,01	3,88	0,0584						
Tiempo (días)	0,03	5	0,01	1,66	0,1771						
Error	0,09	29	3,2E-03								
Total	0,13	35									

Se ajusta a la normalidad

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Actividad enzimática	36	0,80	0,70	37,09

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,72	11	0,07	8,51	<0,0001
Hongo	0,04	1	0,04	4,55	0,0434
Tiempo (días)	0,62	5	0,12	16,14	<0,0001
Hongo*Tiempo (días)	0,06	5	0,01	1,68	0,1784
Error	0,19	24	0,01		
Total	0,91	35			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,06041

Error: 0,0077 gl: 24

Hongo	Medias	n	E.E.
Tricoderma sp	0,21	18	0,02 A
Ganoderma sp	0,27	18	0,02 B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,15674

Error: 0,0077 gl: 24

Tiempo (días)	Medias	n	E.E.
0,00	0,03	6	0,04 A
9,00	0,15	6	0,04 A B
10,00	0,23	6	0,04 B C
2,00	0,23	6	0,04 B C
5,00	0,34	6	0,04 C D
8,00	0,45	6	0,04 D

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,25850

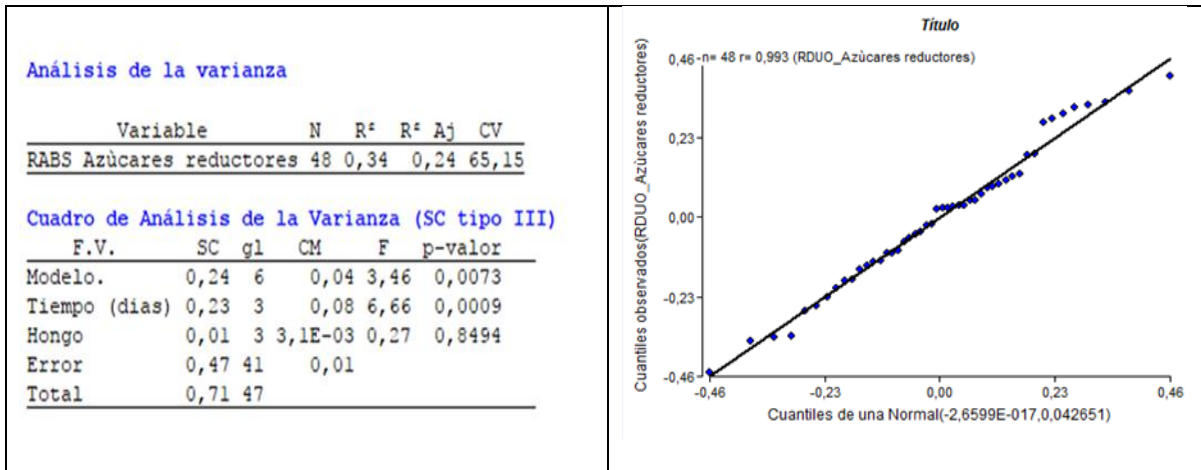
Error: 0,0077 gl: 24

Hongo	Tiempo (días)	Medias	n	E.E.
Tricoderma sp	0,00	0,03	3	0,05 A
Ganoderma sp	0,00	0,04	3	0,05 A B
Tricoderma sp	9,00	0,13	3	0,05 A B C
Tricoderma sp	10,00	0,13	3	0,05 A B C
Ganoderma sp	9,00	0,17	3	0,05 A B C
Ganoderma sp	2,00	0,19	3	0,05 A B C
Tricoderma sp	2,00	0,27	3	0,05 A B C D
Tricoderma sp	5,00	0,30	3	0,05 B C D
Ganoderma sp	10,00	0,32	3	0,05 C D
Ganoderma sp	5,00	0,38	3	0,05 C D
Tricoderma sp	8,00	0,38	3	0,05 C D
Ganoderma sp	8,00	0,51	3	0,05 D

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



Análisis de varianza y normalidad de azúcares reductores en Ganoderma sp, a través del tiempo (días)



ANOVA

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Azúcares reductores	48	0,73	0,61	37,34	

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,55	15	0,30	5,84	<0,0001
Tiempo (días)	0,79	3	0,26	5,06	0,0056
Hongo	3,41	3	1,14	21,94	<0,0001
Tiempo (días)*Hongo	0,34	9	0,04	0,74	0,6718
Error	1,66	32	0,05		
Total	6,21	47			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,25193

Error: 0,0519 gl: 32

Tiempo (días)	Medias	n	E.E.
7,00	0,45	12	0,07 A
0,00	0,52	12	0,07 A B
5,00	0,73	12	0,07 B
10,00	0,74	12	0,07 B

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,25193

Error: 0,0519 gl: 32

Hongo	Medias	n	E.E.	
Tricoderma sp	0,31	12	0,07	A
Cyathus sp	0,44	12	0,07	A B
Ganoderma sp	0,67	12	0,07	B
Trametes sp	1,01	12	0,07	C

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,68960

Error: 0,0519 gl: 32

Tiempo (días)	Hongo	Medias	n	E.E.	
0,00	Tricoderma sp	0,08	3	0,13	A
7,00	Tricoderma sp	0,15	3	0,13	A B
0,00	Cyathus sp	0,34	3	0,13	A B C
7,00	Cyathus sp	0,35	3	0,13	A B C
5,00	Tricoderma sp	0,45	3	0,13	A B C D
5,00	Cyathus sp	0,45	3	0,13	A B C D
7,00	Ganoderma sp	0,53	3	0,13	A B C D
10,00	Tricoderma sp	0,56	3	0,13	A B C D
0,00	Ganoderma sp	0,57	3	0,13	A B C D
10,00	Cyathus sp	0,63	3	0,13	A B C D
10,00	Ganoderma sp	0,72	3	0,13	A B C D
7,00	Trametes sp	0,77	3	0,13	B C D
5,00	Ganoderma sp	0,88	3	0,13	C D
10,00	Trametes sp	1,05	3	0,13	D
0,00	Trametes sp	1,09	3	0,13	D
5,00	Trametes sp	1,14	3	0,13	D

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

Análisis de varianza y normalidad de la biomasa en *Trametes sp*, *Tricoderma sp*, *Cyathus sp* y *Ganoderma sp*.

<p>Análisis de la varianza</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Variable</th> <th>N</th> <th>R<sup>2</sup></th> <th>R<sup>2</sup> Aj</th> <th>CV</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>RABS Biomasa</td> <td>12</td> <td>0,17</td> <td>0,00</td> <td>74,60</td> </tr> </tbody> </table> <p>Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>F.V.</th> <th>SC</th> <th>gl</th> <th>CM</th> <th>F</th> <th>p-valor</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Modelo.</td> <td>0,34</td> <td>3</td> <td>0,11</td> <td>0,55</td> <td>0,6615</td> </tr> <tr> <td>Hongo</td> <td>0,34</td> <td>3</td> <td>0,11</td> <td>0,55</td> <td>0,6615</td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>1,64</td> <td>8</td> <td>0,21</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>1,98</td> <td>11</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	RABS Biomasa	12	0,17	0,00	74,60	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Modelo.	0,34	3	0,11	0,55	0,6615	Hongo	0,34	3	0,11	0,55	0,6615	Error	1,64	8	0,21			Total	1,98	11				<p>Shapiro-Wilks (modificado)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Variable</th> <th>n</th> <th>Media</th> <th>D.E.</th> <th>W*</th> <th>p(Unilateral D)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>RDUO Biomasa</td> <td>12</td> <td>0,00</td> <td>0,76</td> <td>0,94</td> <td>0,6755</td> </tr> </tbody> </table>	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)	RDUO Biomasa	12	0,00	0,76	0,94	0,6755
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV																																																	
RABS Biomasa	12	0,17	0,00	74,60																																																	
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor																																																
Modelo.	0,34	3	0,11	0,55	0,6615																																																
Hongo	0,34	3	0,11	0,55	0,6615																																																
Error	1,64	8	0,21																																																		
Total	1,98	11																																																			
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)																																																
RDUO Biomasa	12	0,00	0,76	0,94	0,6755																																																

## ANOVA

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Biomasa	12	1,00	1,00	1,50

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2475,62	3	825,21	1030,61	<0,0001
Hongo	2475,62	3	825,21	1030,61	<0,0001
Error	6,41	8	0,80		
Total	2482,03	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,33969

Error: 0,8007 gl: 8

Hongo	Medias	n	E.E.
Cyathus sp.	50,41	3	0,52 A
Trametes sp	51,51	3	0,52 A
Trichoderma sp.	52,05	3	0,52 A
Ganoderma sp.	84,46	3	0,52 B

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

Análisis de varianza y normalidad de las proteínas solubles en Ganoderma sp a través del tiempo (días).

<p>Análisis de la varianza</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Variable</th> <th>N</th> <th>R<sup>2</sup></th> <th>R<sup>2</sup> Aj</th> <th>CV</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>RABS Proteínas (ug.mL)</td> <td>15</td> <td>0,76</td> <td>0,66</td> <td>57,40</td> </tr> </tbody> </table> <p>Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>F.V.</th> <th>SC</th> <th>gl</th> <th>CM</th> <th>F</th> <th>p-valor</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Modelo.</td> <td>4,2E-03</td> <td>4</td> <td>1,0E-03</td> <td>7,83</td> <td>0,0040</td> </tr> <tr> <td>tiempo (días)</td> <td>4,2E-03</td> <td>4</td> <td>1,0E-03</td> <td>7,83</td> <td>0,0040</td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>1,3E-03</td> <td>10</td> <td>1,3E-04</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>0,01</td> <td>14</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	RABS Proteínas (ug.mL)	15	0,76	0,66	57,40	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Modelo.	4,2E-03	4	1,0E-03	7,83	0,0040	tiempo (días)	4,2E-03	4	1,0E-03	7,83	0,0040	Error	1,3E-03	10	1,3E-04			Total	0,01	14				<p>Shapiro-Wilks (modificado)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Variable</th> <th>n</th> <th>Media</th> <th>D.E.</th> <th>W*</th> <th>p(Unilateral D)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>RDUO Proteínas (ug.mL)</td> <td>15</td> <td>0,00</td> <td>0,03</td> <td>0,94</td> <td>0,5961</td> </tr> </tbody> </table>	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)	RDUO Proteínas (ug.mL)	15	0,00	0,03	0,94	0,5961
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV																																																	
RABS Proteínas (ug.mL)	15	0,76	0,66	57,40																																																	
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor																																																
Modelo.	4,2E-03	4	1,0E-03	7,83	0,0040																																																
tiempo (días)	4,2E-03	4	1,0E-03	7,83	0,0040																																																
Error	1,3E-03	10	1,3E-04																																																		
Total	0,01	14																																																			
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)																																																
RDUO Proteínas (ug.mL)	15	0,00	0,03	0,94	0,5961																																																

## No Paramétrica

### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	tiempo (días)	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Proteinas (ug.mL)	0,00	3	0,66	0,01	0,67	13,36	0,0096
Proteinas (ug.mL)	5,00	3	0,83	0,04	0,81		
Proteinas (ug.mL)	8,00	3	0,93	0,02	0,92		
Proteinas (ug.mL)	10,00	3	0,76	0,06	0,80		
Proteinas (ug.mL)	12,00	3	0,96	3,6E-03	0,96		

### Trat. Ranks

0,00	2,00	A
10,00	5,17	A B
5,00	7,83	A B C
8,00	11,00	B C
12,00	14,00	C

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

Análisis de varianza y normalidad de las proteínas solubles en Ganoderma sp a través del tiempo (días).

<p><b>Análisis de la varianza</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Variable</th> <th>N</th> <th>R<sup>2</sup></th> <th>R<sup>2</sup> Aj</th> <th>CV</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>RABS Lignina</td> <td>36</td> <td>0,17</td> <td>0,03</td> <td>61,49</td> </tr> </tbody> </table>					Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	RABS Lignina	36	0,17	0,03	61,49	<p><b>Shapiro-Wilks (modificado)</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Variable</th> <th>n</th> <th>Media</th> <th>D.E.</th> <th>W*</th> <th>p(Unilateral D)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>RDUO Lignina</td> <td>36</td> <td>0,00</td> <td>2,12</td> <td>0,92</td> <td>0,0400</td> </tr> </tbody> </table>					Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)	RDUO Lignina	36	0,00	2,12	0,92	0,0400														
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV																																									
RABS Lignina	36	0,17	0,03	61,49																																									
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)																																								
RDUO Lignina	36	0,00	2,12	0,92	0,0400																																								
<p><b>Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>F.V.</th> <th>SC</th> <th>gl</th> <th>CM</th> <th>F</th> <th>p-valor</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Modelo.</td> <td>7,31</td> <td>5</td> <td>1,46</td> <td>1,22</td> <td>0,3221</td> </tr> <tr> <td>tiempo (días)</td> <td>5,84</td> <td>3</td> <td>1,95</td> <td>1,63</td> <td>0,2034</td> </tr> <tr> <td>Residuo</td> <td>1,47</td> <td>2</td> <td>0,74</td> <td>0,62</td> <td>0,5464</td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>35,82</td> <td>30</td> <td>1,19</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>43,13</td> <td>35</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>					F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Modelo.	7,31	5	1,46	1,22	0,3221	tiempo (días)	5,84	3	1,95	1,63	0,2034	Residuo	1,47	2	0,74	0,62	0,5464	Error	35,82	30	1,19			Total	43,13	35								
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor																																								
Modelo.	7,31	5	1,46	1,22	0,3221																																								
tiempo (días)	5,84	3	1,95	1,63	0,2034																																								
Residuo	1,47	2	0,74	0,62	0,5464																																								
Error	35,82	30	1,19																																										
Total	43,13	35																																											

## Análisis de los residuos de lignina

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Consumo	36	0,33	0,21	96,92

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,87	5	0,17	2,91	0,0293
Residuo	2,1E-04	2	1,0E-04	1,7E-03	0,9983
tiempo (días)	0,87	3	0,29	4,85	0,0072
Error	1,79	30	0,06		
Total	2,66	35			

## Normal

### Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Consumo	36	0,00	0,38	0,94	0,1978

## Consumo de lignina

## Interacción significativa

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Consumo	36	0,98	0,98	26,86

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	320,59	11	29,14	141,21	<0,0001
Residuo	32,02	2	16,01	77,56	<0,0001
tiempo (días)	76,32	3	25,44	123,26	<0,0001
Residuo*tiempo (días)	212,26	6	35,38	171,39	<0,0001
Error	4,95	24	0,21		
Total	325,55	35			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,46318

Error: 0,2064 gl: 24

Residuo	Medias	n	E.E.	
Corona piña	0,36	12	0,13	A
Pinzote de banano	2,32	12	0,13	B
Caña	2,40	12	0,13	B

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,59080

Error: 0,2064 gl: 24

tiempo (días)	Medias	n	E.E.	
0,00	0,00	9	0,15	A
30,00	0,60	9	0,15	B
45,00	2,55	9	0,15	C
15,00	3,61	9	0,15	D

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,33749

Error: 0,2064 gl: 24

Residuo	tiempo (dias)	Medias	n	E.E.	
Corona piña	45,00	-0,13	3	0,26	A
Corona piña	0,00	0,00	3	0,26	A
Caña	0,00	0,00	3	0,26	A
Pinzote de banano	0,00	0,00	3	0,26	A
Caña	45,00	0,27	3	0,26	A
Caña	30,00	0,30	3	0,26	A
Corona piña	30,00	0,70	3	0,26	A
Pinzote de banano	30,00	0,80	3	0,26	A
Corona piña	15,00	0,87	3	0,26	A
Pinzote de banano	15,00	0,93	3	0,26	A
Pinzote de banano	45,00	7,53	3	0,26	B
Caña	15,00	9,03	3	0,26	C

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



**PROYECTO DE TESIS**

**AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE ENZIMAS MICROBIANAS DE TIPO  
LACASA, PARA LA DEGRADACIÓN DE DESECHOS DE PIÑA; BANANO Y CAÑA**

**POR:  
SANDRA VALDES DIAZ**

**PROFESOR GUÍA:  
LUIS VILLEGAS, PhD**

**HEREDIA, COSTA RICA, MARZO 2018**



