



## CIENCIAS AGRARIAS Y DE LA PESCA

Artículo original de investigación

### Obtención de lacasas fúngicas para el mejoramiento de fuentes fibrosas destinadas a la alimentación animal

Maryen Alberto Vazquez <sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0562-1052>  
Elaine C. Valiño Cabrera <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4178-3286>  
Lourdes L. Savón Valdés <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9880-0310>  
Bárbara Rodríguez Sánchez <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0740-9346>

<sup>1</sup> Instituto de Ciencia Animal. Mayabeque, Cuba

\*Autor para la correspondencia: [mvazquez@ica.co.cu](mailto:mvazquez@ica.co.cu)

#### RESUMEN

**Introducción:** La utilización de enzimas lignolíticas en el campo de la producción animal es un tema que aún no se ha desarrollado. **Objetivo:** Obtener y evaluar lacasas fúngicas para su uso en la producción animal. **Métodos:** Se aislaron 50 cepas de hongos y se seleccionó la cepa de mayor potencial lignocelulolítico. Se evaluó su producción de lacasas con y sin inducción biológica. Las lacasas se purificaron mediante partición trifásica y se caracterizaron en cuanto a pH y temperatura de máxima actividad, estabilidad y termorresistencia. Las lacasas nativas e inducidas se evaluaron como método de pretratamiento de la paja de trigo cruda y del bagazo de caña de azúcar. La modificación de la fibra se monitoreó mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier. Se analizó el efecto del pretratamiento enzimático en el mejoramiento de la calidad nutritiva y la digestibilidad in vitro e in vivo (conejo y pollo de ceba) del bagazo de caña. **Resultados:** La cepa *Curvularia kusanoi* L7 fue la de mayor producción enzimática. Sus lacasas tanto nativas como inducidas se purificaron con rendimientos superiores al 100 % y con factores de purificación de 20. Las enzimas inducidas resultaron diferentes a la nativa en cuanto a su actividad, pH y termorresistencia. Ambos tipos fueron capaces de modificar la estructura de la lignina, mejorar la calidad nutritiva y la digestibilidad in vitro e in vivo del bagazo de caña de azúcar en las especies de interés productivo evaluadas. **Conclusiones:** Las lacasas fúngicas de *C. kusanoi* L7, constituyen una nueva variante de pretratamiento de fuentes fibrosas destinadas a la producción animal, a la vez que resultan interesantes para su utilización en la rama agropecuaria y biotecnológica.

**Palabras clave:** degradación; enzimas; hongos; pared celular; producción animal

### Obtention of fungal laccases for the improvement of the fibrous sources for animal feed

#### ABSTRACT

**Introduction:** The use of lignolytic enzymes in the field of animal production is an issue that has not yet been developed. **Objective:** To obtain and evaluate fungal laccases for use in

#### Editor

Lisset González Navarro  
Academia de Ciencias de Cuba.  
La Habana, Cuba

#### Traductor

Darwin A. Arduengo García  
Academia de Ciencias de Cuba.  
La Habana, Cuba



animal production. **Methods:** It was selected the strain with the highest lignocellulolytic potential from several isolates of fungi. It was evaluated their laccase production with and without biological induction. Laccases were purified by triphasic partitioning and characterized in terms of pH and temperature of maximum activity, stability and heat resistance. They were evaluated native and induced laccases as a pretreatment method for raw wheat straw and sugarcane bagasse. It was monitored fiber modification by Fourier Transformed Infrared Spectroscopy. It was analyzed the effect of enzymatic pretreatment in improving the nutritional quality and digestibility *in vitro* and *in vivo* (rabbit and broiler) of sugarcane bagasse. **Results:** The *Curvularia kusanoi* L7 strain was selected as the one with the highest enzyme production. They were purified both native and induced laccases with yields greater than 100% and with purification factors of 20. The induced enzymes were different from the native in terms of activity, pH and heat resistance. Both types were able to modify the structure of lignin, improve the nutritional quality and the *in vitro* and *in vivo* digestibility of the sugarcane bagasse. **Conclusions:** Fungal laccases constitute a new variant of pretreatment of fibrous sources for animal production, and it is also interesting to agricultural and biotechnological field.

**Keywords:** animal production; cell wall; degradation; Fungi; enzymes

## INTRODUCCIÓN

El crecimiento acelerado de la población mundial trae como consecuencia el agotamiento de muchos recursos y empeora la situación alimentaria internacional. Por estas razones el desarrollo de la producción animal se hace indispensable como una de las vías fundamentales para reducir el impacto negativo del déficit de alimentos. Numerosos estudios se conducen con la finalidad de lograr producciones más sostenibles, capaces de suplir la demanda internacional e impulsar la búsqueda y el estudio de fuentes alternativas de alimento animal que no compitan con la alimentación humana. En este sentido el empleo de la biotecnología presenta gran potencial para mejorar la competitividad de la producción agrícola especialmente en países subdesarrollados.

La revalorización de la biomasa lignocelulósica resulta una de las soluciones más alentadoras en la búsqueda de fuentes de alimento alternativas. <sup>(1)</sup> Sin embargo, la complejidad estructural de la pared vegetal y la baja digestibilidad de este tipo de fuentes, disminuyen su aprovechamiento por parte del animal. En casos así, el pretratamiento de la fibra es una de las soluciones más acertadas para mejorar la calidad nutritiva. <sup>(2)</sup> Dentro de los diferentes procesos de pretratamiento, el biológico, se destaca por presentar menor consumo de energía, no emplear productos químicos agresivos, operar en condiciones cercanas al ambiente, además de permitir la reducción de inhibidores y productos tóxicos en el medio de reacción. <sup>(3)</sup> Este tipo de pretratamiento incluye el uso de microorganismos y sus productos enzimáticos.

La utilización de enzimas, presenta grandes beneficios económicos al disminuir el tiempo global del proceso, por

lo que los estudios actuales se encaminan a la búsqueda de nuevas cepas con alta productividad enzimática, con la finalidad de purificar sus enzimas. <sup>(4)</sup> Dentro de los microorganismos que sobresalen por su alta producción enzimática se encuentran los hongos, que son capaces de producir, enzimas celulolíticas y aquellas que permiten la modificación de la lignina como las lacasas. <sup>(5)</sup> Estas últimas, claves en el proceso de acceso a la matriz polisacáridica. <sup>(6)</sup> Por todos los antecedentes expuestos, la presente investigación tuvo como objetivo obtener y evaluar lacasas fúngicas para su uso en la producción animal.

## MÉTODOS

### Aislamiento y selección de hongos productores de enzimas lignocelulolíticas

Se empleó como material vegetal para el aislamiento de los hongos la madera del árbol de la naranja (*Citrus aurantium*), del limón (*Citrus aurantifolia*), de la güira (*Crescentia cujete*), del cedro (*Cedrus*), del mamey (*Manilkara zapota*) y de la leucaena (*Leucaena leucocephala*) que presentaban signos de infestación. La selección de hongos productores de enzimas lignocelulolíticas se realizó mediante estudios cualitativos y cuantitativos que permitieron escoger las cepas de mayor potencial, las que posteriormente se identificaron mediante el aislamiento de ADN genómico. <sup>(7)</sup>

### Caracterización de la cepa de mayor potencial lignocelulolítico

La caracterización de la cepa de mejor potencial lignocelulolítico se determinó mediante fermentación sólida sumer-

gida del bagazo de caña de azúcar, <sup>(8)</sup> determinación de su capacidad de crecimiento en cocultivos, <sup>(7)</sup> mineralización del carbono de la paja de trigo crudo y monitoreo de la modificación de la estructura de la pared celular mediante espectroscopía infrarroja de reflexión total atenuada por transformada de Fourier (FTIR). <sup>(9)</sup>

### Obtención, purificación y caracterización de enzimas lacasas

La obtención de los crudos enzimáticos se realizó a partir del sobrenadante de la fermentación sólido sumergida de la cepa de mayor potencial según los estudios de actividad lignocelulolítica. La purificación de lacasa a partir de los crudos enzimáticos se realizó mediante sistema de partición trifásica. <sup>(10)</sup> Los cultivos de la cepa de mayor potencial se indujeron para obtener mayores concentraciones de lacasas, en sistema de fermentación sólida sumergida del salvado de trigo mediante interacciones biológicas con *Trichoderma viride* M5-2 y *Trichoderma pleuroticola*. Los crudos enzimáticos que se obtuvieron, luego de la inducción de lacasas, se purificaron de igual forma en sistema de partición trifásica. <sup>(10)</sup> Se calculó el factor de purificación y el rendimiento de la enzima. La lacasa purificada se caracterizó mediante el estudio del efecto de diferentes pH (3,5; 4,5; 6,5 y 8) y sistemas de amortiguadores (citrato, fosfato y acetato) en la actividad enzimática. Se evaluó, además, el efecto de la temperatura sobre la actividad, estabilidad y termo-resistencia de la enzima (30, 40, 50, 70 y 80) °C.

### Análisis estadísticos

Para evaluar el efecto del pH y del tipo de amortiguador en la actividad lacasa se utilizó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial (3 x 4) dispuesto en 3 sistemas de amortiguadores (fosfato, citrato y acetato) y 4 valores de pH (3,5; 4,5; 6,5 y 8) para cada enzima (nativa e inducida por interacciones biológicas). Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la enzima se realizó análisis de varianza simple, dispuesto en 4 tratamientos (lacasa nativa y lacasas inducidas en *C. kusanoi* L7 mediante interacciones biológicas con *T. viride* M5-2 y *T. pleuroticola*) con 3 repeticiones cada uno. Todos los resultados experimentales se analizaron con el paquete estadístico InfoStat. <sup>(11)</sup> La d-óxima de Duncan se empleó en los casos necesarios, para discriminar diferencias entre las medias. <sup>(12)</sup>

### Evaluación de actividad lacasa en sustratos fibrosos

La actividad ligninolítica de las lacasas purificadas se evaluó en paja de trigo cruda, mediante espectroscopía infrarroja de reflexión total atenuada con transformada de Fourier (ATR-FT-IR). Se realizó un experimento en bagazo de caña de azúcar para determinar el tiempo de incubación efectivo y la

mejor dosis de aplicación de las lacasas purificadas sobre la degradación de la lignina. Además, se evaluó el fraccionamiento fibroso y la digestibilidad in vitro del bagazo de caña de azúcar pretratado con lacasas purificadas. <sup>(13)</sup>

### Evaluación in vivo de la digestibilidad del bagazo de caña de azúcar pretratado con enzimas lacasas

#### Estudio en pollos de ceiba

El trabajo se desarrolló en la unidad experimental avícola del Instituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba. A los 21 d de edad se seleccionaron al azar 32 pollos de ceiba (HEEB55) con peso vivo promedio de 470 g ± 50. Los animales se distribuyeron individualmente en jaulas para metabolismo según diseño completamente aleatorizado con 8 repeticiones por tratamiento: a) tratamiento control (maíz/soya); b) inclusión de bagazo de caña sin tratamiento enzimático; c) bagazo de caña tratado con lacasa purificada de *Curvularia kusanoi* L7 y d) bagazo de caña tratado con lacasa inducida en *C. kusanoi* L7 por interacciones biológicas con *Trichoderma pleuroticola*. Se empleó el método de colecta total de excretas. Se determinaron los contenidos de materia seca (MS), y cenizas totales. <sup>(14)</sup> Para la extracción de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), lignina, celulosa y hemicelulosa se utilizó el método de fraccionamiento de Van Soest. <sup>(15)</sup> Cada análisis se realizó por triplicado al alimento y las excretas. Se determinó la retención fecal aparente de nutrientes como (1):

$$\text{Retención (\%)} = \frac{\text{Consumo} - \text{excreción fecal}}{\text{Consumo}} * 100 \quad (1)$$

#### Estudio en Conejos

Se utilizaron 15 conejos machos pardo cubano de 60 d de edad, con peso vivo promedio de 1,4 kg ± 2 kg. Se distribuyeron aleatoriamente en jaulas individuales en 3 tratamientos y 6 repeticiones, donde cada animal constituía una unidad experimental. Los tratamientos consistieron en: a) tratamiento control (20 % de bagazo sin tratar) y tratamientos b y c con la inclusión de 20 % de bagazo de caña tratado con lacasa purificada de *Curvularia kusanoi* L7 y 20 % de bagazo de caña tratado con lacasa inducida en *C. kusanoi* L7 por interacciones biológicas con *Trichoderma pleuroticola*, respectivamente. Las dietas se elaboraron acorde con las recomendaciones de Machado *et al.* <sup>(16)</sup>

El estudio tuvo una duración de 10 d, 7 de adaptación al consumo de las dietas y 3 para la colecta total de excretas. El agua de bebida se ofertó ad libitum y el alimento a razón de 100 g diarios distribuidos en 2 raciones: mañana y tarde. Durante la fase experimental, se controló el peso del alimento

ofertado, así como del rechazo para determinar el consumo diario de alimento. Se recolectaron las heces de los animales individuales, se conformó un pool de las excretas por tratamiento y se tomó el 10 %, que se conservó en congelación a -20 °C hasta el momento de su análisis. <sup>(17)</sup> Se determinaron los contenidos de materia seca (MS) y cenizas totales. <sup>(14)</sup> Para la extracción de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), lignina, celulosa y hemicelulosa se utilizó el método de fraccionamiento de Van Soest. <sup>(15)</sup> Cada análisis se realizó por triplicado al alimento y las excretas. Se determinó la retención fecal aparente de los nutrientes. <sup>(17)</sup>

### Análisis estadístico

En ambos experimentos *in vivo* se utilizó un diseño completamente aleatorizado. En el caso de las aves se utilizaron 4 tratamientos y 8 repeticiones cada uno, y en el estudio en conejos se utilizaron 3 tratamientos con 6 repeticiones cada uno. Cada animal representó una unidad experimental. Los resultados se analizaron con ayuda del paquete estadístico computadorizado InfoStat. <sup>(11)</sup> Los valores medios se compararon mediante la dócima de Duncan <sup>(12)</sup> en los casos necesarios.

## RESULTADOS

### Aislamiento y selección de hongos productores de enzimas lignocelulolíticas

Se obtuvieron 50 aislados con características celulolíticas. De ellas, la cepa identificada como *C. kusanoi* L7 presen-

tó además de una alta producción de enzimas celulolíticas, una producción significativa de enzimas lacasa, por lo que se seleccionó para posteriores estudios <sup>(7)</sup> (figura 1). Es necesario señalar que la producción de lacasa que se obtuvo con la cepa L7, se encuentra en el rango de las que se reportan para hongos basidiomicetos altos productores de esta enzima. <sup>(18)</sup>

### Caracterización de la actividad lignocelulolítica de *Curvularia kusanoi* L7

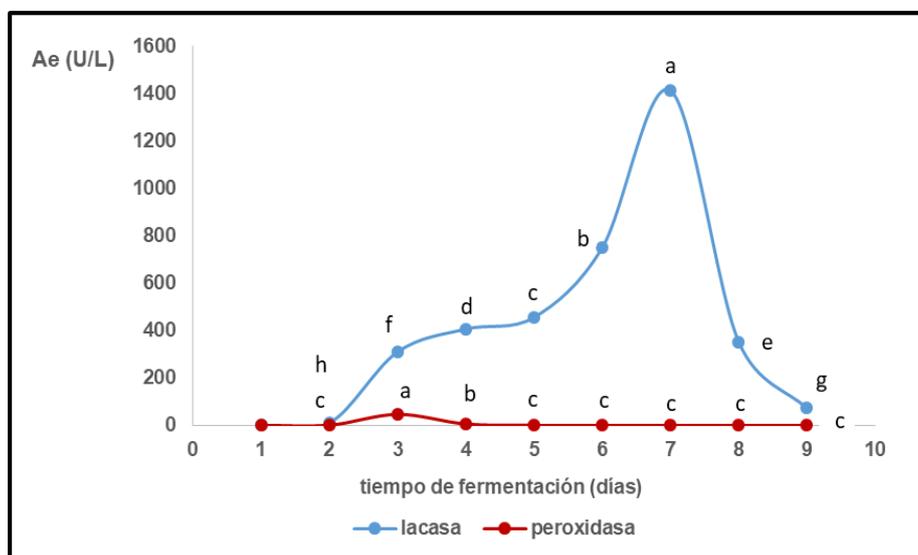
La cepa *C. kusanoi* L7 presentó alta actividad celulolítica en salvado de trigo y en bagazo de caña de azúcar como sustratos sólidos sumergidos <sup>(9)</sup> (tabla 1).

### Crecimiento de *Curvularia kusanoi* L7 en cocultivo

En cuanto a la capacidad de crecimiento en cocultivo se encontró que *C. kusanoi* puede crecer en presencia de diferentes microorganismos, resultados que pueden generar consorcios microbianos que permitan una biodegradación más completa de los sustratos lignocelulósicos. En el caso específico del cocultivo entre *C. kusanoi* L7 y las diferentes especies de *Trichoderma* se debe resaltar el alcance de los resultados, puesto que son combinaciones de grandes potencialidades debido al alto potencial degradativo de estas cepas. <sup>(7,9)</sup>

### Obtención, purificación y caracterización de las lacasas de *Curvularia kusanoi* L7

Los extractos crudos de la cepa *C. kusanoi* L7 se obtuvieron a las 168 h de fermentación (pico de mayor producción de lacasas). Con el uso de este sistema propuesto se concentró la proteína de interés y aumentó la actividad enzi-



**Fig. 1.** Cinética de producción de lacasas ( $EE \pm 3,52$ ;  $p < 0,0001$ ) y peroxidasas ( $EE \pm 1,18$ ;  $p < 0,0001$ ), de la cepa *C. kusanoi* L7 en medio sólido sumergido de salvado de trigo. Análisis de varianza simple para cada enzima. Paquete estadístico InfoStat. Fuente: Elaboración propia <sup>(11)</sup>

**Tabla 1.** Actividad celulolítica de la cepa *C. kusanoi* L7 en salvado de trigo y bagazo de trigo y bagazo de caña de azúcar

Salvado de trigo	Tiempo de fermentación (horas)							
Actividad celulolítica (U/mL)	24	48	72	96	120	144	168	EE y Signf.
endo-1,4-β-glucanasa	0,53 5 e	0,19 7 c	0,981 d	0,185 c	0,081 b	0,035 a	0,029 a	± 0,022 P = 0,0003
exo-1,4-β-glucanasa	0,34 c	0,19 b	0,15 b	0,08 a	0,08 a	0,08 a	0,05 a	± 0,011 P = 0,045
Bagazo de Caña	Tiempo de fermentación (horas)							
Actividad celulolítica (U/mL)	24	48	72	96	120	144	168	EE y Signf.
endo-1,4-β-glucanasa	2,73 g	2,06 e	2,36 f	1,85 d	1,14 c	1,04 b	0,934 a	± 0,22 P = 0,0004
exo-1,4-β-glucanasa	0,26 b	0,80 d	0,51 c	0,007 a	0,007 a	0,003 a	0,0006 a	± 0,36 P = 0,0021

a,b,c,d,e Medias con diferentes letras en cada fila difieren a  $p < 0,05$  <sup>(12)</sup> Fuente: Elaboración propia

mática lacasa. <sup>(9)</sup> Se obtuvo un extracto enriquecido en lacasa con rendimiento superior al 100 % y 20 veces más puro que el preparado inicial, aspecto de suma importancia para los futuros estudios de escalado del producto. Se encontró en la mayoría de los casos que las lacasas nativas del hongo *C. kusanoi* L7 presentan mejor actividad a pH alcalinos que a pH ácidos. En cuanto al efecto de la temperatura sobre la actividad lacasa se encontró el intervalo de 30 °C a 40 °C como el de máxima actividad para la enzima. En cuanto a su estabilidad, se observó que las lacasas del hongo *C. kusanoi* L7 mantienen su actividad entre 30 °C y 40 °C, encontrándose una pérdida gradual a partir de los 50 °C y hasta los 70 °C. Con temperaturas superiores a los 80 °C ocurre un rápido descenso en su actividad, con pérdida total de esta a los 30 min de reacción. <sup>(7)</sup>

### Inducción enzimática mediante interacciones biológicas

En los estudios de inducción realizados con las cepas *T. viride* M5-2 y *T. pleurotica* se observó un aumento en la in-

ducción de lacasa cuando se inoculan las diferentes especies de *Trichoderma* después de un determinado tiempo de crecimiento en el cultivo de *C. kusanoi* L7. <sup>(13)</sup> El mejor efecto inductor de lacasas se obtuvo tras la inoculación de *Trichoderma* luego de las primeras 48 h de crecimiento de *C. kusanoi* L7. En ambas interacciones biológicas (con *T. viride* M5-2 y con *T. pleurotica*) se observó un comportamiento similar y coincidió la máxima producción de la enzima en ambos casos con el noveno día de fermentación de los cultivos.

Los preparados enriquecidos con lacasa, procedentes de los cultivos inducidos por interacciones biológicas con las 2 especies de *Trichoderma*, se purificaron de igual forma que lo descrito para la enzima nativa. <sup>(10)</sup> Estos crudos presentaron actividades enzimáticas de 3,1 U/mL para el extracto inducido por interacción con *T. viride* M5-2 y 3,8 U/mL para el extracto inducido por interacción con *T. pleurotica*. Ambos con un factor de purificación de 25 y con rendimientos superiores al 100 % (257 % y 305 %, respectivamente).

Respecto al efecto del pH, del tipo de amortiguador y de la temperatura en la actividad de las lacasas inducidas en

*Curvularia kusanoi* L7, tanto las inducidas por *T. viride* M5-2 como las inducidas por *T. pleurotica* presentaron un comportamiento totalmente diferente a la enzima nativa. Estas enzimas inducidas mostraron mejor actividad a pH ácidos que a pH alcalinos. En cuanto al efecto de la temperatura, difirieron de la enzima nativa. Ambas lacasas inducidas presentaron un comportamiento similar y la mayor actividad se encontró en el intervalo de 60 °C-70 °C (figura 2 A). En cuanto a la termorresistencia de las lacasas de *C. kusanoi* L7, el proceso de inducción enzimática aumentó la termorresistencia de la enzima. La lacasa nativa pierde totalmente su actividad luego de los primeros 20 min, en cambio las enzimas inducidas mantienen su actividad residual (figura 2 B)

**Evaluación de la capacidad ligninolítica de lacasas *C. kusanoi* L7 en paja de trigo crudo mediante espectroscopía de reflexión total atenuada con transformada de Fourier**

Los tratamientos con lacasas, tanto inducidas como nativas, lograron marcada reducción de las intensidades de las señales asociadas a la lignina. El tratamiento con las lacasas inducidas por *T. pleurotica* logró la mayor reducción de estas señales, aunque solo hubo pequeñas diferencias con el resto. En todos los casos, las mayores reducciones se

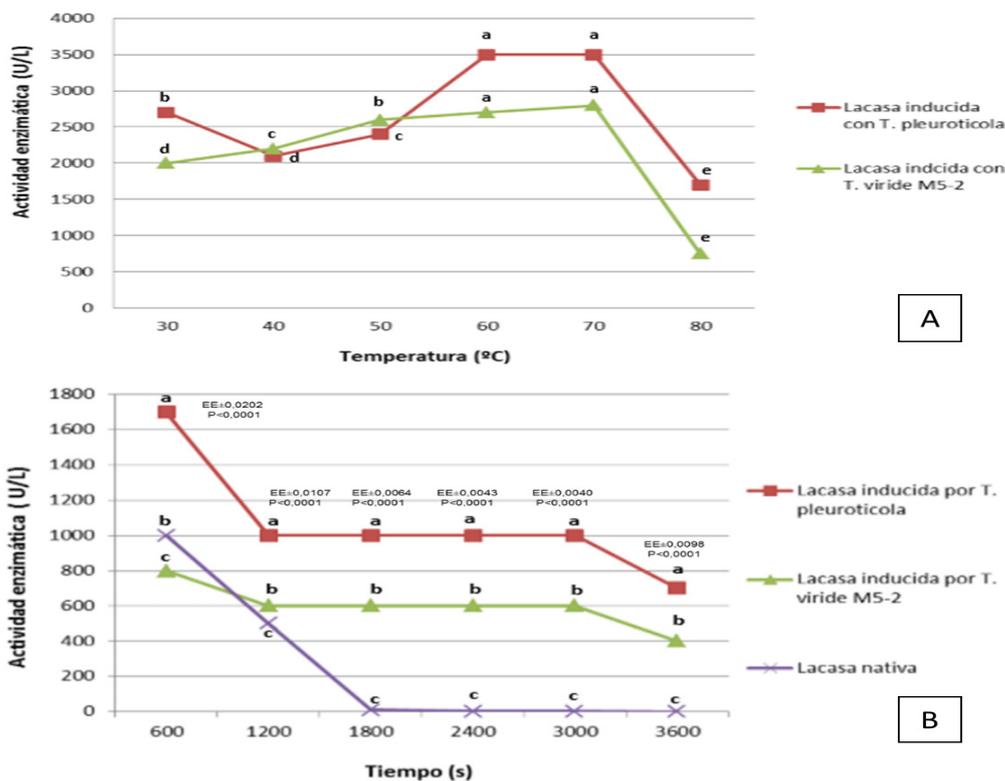
localizaron en el triplete característico atribuido a las vibraciones del anillo aromático de la lignina. (13)

**Tiempo de incubación efectivo del bagazo de caña de azúcar y estudio de dosis de aplicación de las lacasas**

El análisis de los resultados no encontró diferencias entre los tratamientos enzimáticos, tampoco se encontraron interacciones entre los factores, solo el tiempo de incubación y la dosis de enzima, influyeron en la concentración de fenoles solubles como medida indirecta del grado de degradación de lignina. (13)

Las lacasas de *C. kusanoi* L7, tanto las nativas como las inducidas, presentaron un comportamiento similar en cuanto a su actividad degradativa del bagazo de caña de azúcar. Estos resultados se encuentran en correspondencia con los que se obtuvieron anteriormente por ATR-FT-IR, donde todos los tratamientos enzimáticos mostraron un comportamiento similar en la degradación de la paja de trigo cruda.

A partir de estos resultados se empleó la dosis de mayor actividad ligninolítica (4 UI/g) y el tiempo de incubación que produjo mejor degradación del sustrato (72 h), como las condiciones de pretratamiento del bagazo de caña de azúcar para evaluar su digestibilidad. Al respecto, se evidenció que el proceso de pretratamiento enzimático permitió una dismi-



nución de los componentes fibrosos, especialmente de la fibra detergente ácido y de los niveles de lignina y celulosa mejorando la digestibilidad *in vitro* de la fibra del bagazo de la caña de azúcar. <sup>(13)</sup>

### Evaluación *in vivo* de la digestibilidad del bagazo de caña de azúcar pretratado con enzimas lacasas de *Curvularia kusanoi* L7

La evaluación de la digestibilidad *in vivo* del bagazo de caña de azúcar pretratado con las enzimas lacasas de *Curvularia kusanoi* L7, tanto en sus condiciones nativas como inducidas por interacciones biológicas con *Trichoderma*, se valoraron en 2 especies de interés productivo, en pollos de ceba (tabla 2) y conejos (tabla 3).

Según se observa en la tabla 2, no se encontraron diferencias en cuanto a la digestibilidad *in vivo* de la dieta control con maíz-soya y las dietas con bagazo pretratado con las lacasas de *C. kusanoi* L7. Por otra parte, es necesario señalar como el proceso de pretratamiento logró aumentar el peso vivo de los animales al finalizar el experimento, estos valores si bien están por debajo de los que se alcanzaron para el control con maíz-soya, si se encuentran por encima de los valores del tratamiento control con bagazo sin tratar.

En cuanto a las diferencias entre los tratamientos enzimáticos, se observa que se obtuvo resultados similares tanto en el pretratamiento con la lacasa nativa como la inducida por interacciones biológicas, por lo que ambas pueden utilizarse para estos fines.

Los resultados que se obtuvieron en conejos son similares a lo que se encontraron en el pollo de ceba. Como se observa en la tabla 3, los tratamientos que incluyeron el bagazo pretratado enzimáticamente, presentaron valores de digestibilidad *in vivo* mayores que el tratamiento control. Por otra parte, tampoco se encontraron diferencias entre los pretratamientos enzimáticos, obteniéndose resultados similares tanto en el pretratamiento con la lacasa nativa como en el pretratamiento con la inducida por interacciones biológicas, por lo que ambas enzimas pudieran utilizarse indistintamente para estos fines.

## DISCUSIÓN

El proceso de selección del microorganismo con mayor capacidad degradativa resultó en el ascomiceto identificado como *Curvularia kusanoi* L7. Este microorganismo presentó además de una alta capacidad celulolítica, una alta producción de enzimas que modifican la lignina como las lacasas. Los reportes del género *Curvularia* respecto a la producción de este tipo de enzimas son escasos. <sup>(19,20)</sup> Sin embargo, los resultados de la presente investigación, son una medida del alto potencial que puede tener este género en la degradación de compuestos recalcitrantes como la lignina.

La capacidad lignocelulolítica de *Curvularia kusanoi* L7, y su producción de celulasas frente a sustratos complejos (ver tabla 1), puede ser una alternativa eficiente en la bioconversión de la biomasa lignocelulósica. Se conoce que el proceso de

**Tabla 2.** Digestibilidad *in vivo* del bagazo de caña de azúcar pretratado con enzimas lacasas de *Curvularia kusanoi* L7. Estudio en pollos de ceba

Dietas Control		Dietas con Bagazo pretratado			
Ind. (%)	Maíz/ Soya	10 % de bagazo de caña	con lacasa nativa	EE ± Sign. con lacasa inducida	
DMS	87,38 b	80,09 a	87,34 b	87,46 b	± 1,51 p = 0,0031
DFA	75,61 b	65,37 a	77,90 b	79,36 b	± 2,29 p = 0,0007
DC	81,82 b	65,78 a	81,22 b	82,08 b	± 1,78 p < 0,0001
PVf	1,79 c	1,51 a	1,71 b	1,68 b	± 0,03 p < 0,0001

a,b,c,d,e Medias con diferentes letras en cada fila difieren a  $P < 0,05$ . (12) DMS, Digestibilidad de la materia seca; DFA, Digestibilidad de la fibra ácida; DC, Digestibilidad de la celulosa; PVf, Peso vivo al final del estudio. Fuente: Elaboración propia

**Tabla 3.** Digestibilidad *in vivo* del bagazo de caña de azúcar pretratado con enzimas lacasas de *Curvularia kusanoi* L7. Estudio en Conejos

Dietas con bagazo pretratado				EE ± Sign
Ind. (%)	Control	con lacasa nativa	con lacasa inducida	
DMS	85,23 a	87,02 b	88,16 b	± 1,12 p = 0,0016
DFA	82,56 a	85,22 b	86,19b	± 1,06 p < 0,0001
DC	83,91 a	88,03 b	88,65 b	± 1,78 p = 0,0009

a,b,c,d,e Medias con diferentes letras en cada fila difieren a  $p < 0,05$  <sup>(12)</sup>; DMS, Digestibilidad de la materia seca; DFA, Digestibilidad de la fibra ácida; DC, Digestibilidad de la celulosa. Fuente: Elaboración propia

degradación enzimática de la lignina, puede incrementar el número de poros y aumentar el área superficial disponible. Este proceso permite mejor acceso de las enzimas xilanasas y celulasas, además de que mejora de forma directa los rendimientos totales de la hidrólisis. <sup>(21)</sup>

La capacidad de crecimiento en cocultivo que presenta este microorganismo, es otra de sus ventajas como método biológico de pretratamiento de la fibra. Los cocultivos de hongos lignocelulolíticos constituyen una solución efectiva para lograr una degradación mejor y más completa de la pared celular de la planta. <sup>(22)</sup> Este proceso necesita la acción integrada no solo de las enzimas del complejo celulolítico, sino también aquellas enzimas implicadas en la degradación de la lignina. <sup>(23)</sup> Sin duda, las técnicas que emplean acertadamente los consorcios microbianos, son potenciales herramientas que mejoran los procesos de degradación de la fibra y de compuestos complejos de estructuras similares. Su aplicación a nivel industrial va en aumento. <sup>(24)</sup> destacándose su uso desde la obtención de biocombustibles, hasta el tratamiento de residuales y la biorremediación. No obstante, a pesar de todos los resultados positivos de los cocultivos en la degradación de la fibra, su utilización en el sector ganadero es muy pobre. Se conocen algunas investigaciones como las de Ghorai *et al.* (2009) <sup>(25)</sup> y Medina *et al.* (2016), <sup>(26)</sup> quienes emplearon satisfactoriamente cocultivos de hongos basidiomicetos en la biodegradación de diferentes fuentes fibrosas para alimentación de rumiantes. La posibilidad de *C. kusanoi* L7 y *T. pleurotica* de crecer en cocultivo, muestra un posible consorcio microbiano de grandes potencialidades en el campo de la producción animal. <sup>(9)</sup>

La utilización de las enzimas lacasas de *Curvularia kusanoi* L7 de forma aislada, es otro de los beneficios que ofrece este microorganismo. Su purificación a través de técnicas poco complejas y que garanticen un alto rendimiento, constituyen aspectos significativos a la hora del escalado del producto. El rendimiento global del proceso de purificación

mediante partición trifásica, se corresponde con resultados similares de Gagaoua y Hafid (2016) <sup>(27)</sup> quienes obtuvieron rendimientos superiores al 100 % con bajos factores de purificación, aspectos que según estos autores se asocian a la presencia de lacasa como proteína predominante en la fase intermedia del sistema de partición del crudo.

La obtención de las lacasas purificadas evidenciaron diferencias entre la enzima nativa y las que se obtuvieron por inducción en cuanto a pH, temperatura de máxima actividad y termorresistencia. Se conoce que son varios los factores que pueden afectar la estructura y estabilidad de las lacasas. <sup>(28)</sup>

Existen oxido-reductasas que a pesar de provenir del mismo género o de la misma especie, presentan un comportamiento totalmente distinto en cada estudio. Estas diferencias se asocian a la secreción de varias isoformas de la enzima, las que pueden ser codificadas por genes diferentes e inclusive por el mismo gen. En un proceso fermentativo se pueden encontrar varios tipos de isoenzimas producidas por el mismo microorganismo, las que pueden mostrar una marcada diferencia en cuanto a estabilidad, condiciones óptimas de reacción y afinidad por diferentes sustratos. <sup>(22)</sup> Se conoce que la transcripción de genes asociados a la producción de lacasas se regula por diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, adición de compuestos fenólicos y no fenólicos, la presencia de iones metálicos y a la interacción con otros organismos. <sup>(29)</sup> En el caso específico de la inducción enzimática por interacciones biológicas en hongos ligninolíticos, se manifiestan cambios en el patrón de isoenzimas que se producen y excretan al medio. <sup>(30)</sup>

Las enzimas oxido-reductasas y especialmente las lacasas, al ser importantes factores de virulencia de hongos patógenos y uno de los principales mecanismos de defensa de hongos ligninolíticos, su secreción se corresponde con el tipo de organismo al que se enfrente. <sup>(31)</sup> El aumento de la secreción de lacasas tras la inducción por interacciones biológicas en el presente estudio se corresponde con re-

portes similares de otras especies de hongos lignocelulolíticos enfrentados a *Trichoderma*.<sup>(32,33)</sup>

Se puede resumir que la interacción entre *Trichoderma* y un determinado hongo lignocelulolítico o patógeno, puede desencadenar un ataque lítico, donde se exagera la producción de enzimas extracelulares que degradan las paredes celulares del hospedero y posibilitan la penetración de las hifas.<sup>(34)</sup> Estas interacciones resultan productivas desde el punto de vista biotecnológico, principalmente en los casos en que se enfrenten a microorganismos productores de lacasas, pues aumentan de forma significativa la producción de esta enzima.

Los estudios de inducción de lacasas por interacciones biológicas, se informan mayoritariamente en basidiomicetos. En cambio, para los ascomicetos las investigaciones son mínimas. Solo se encuentran algunos informes como los de Copete *et al.* (2019)<sup>(35)</sup> quienes evaluaron la capacidad inductora de *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *Trichoderma viride*, *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. sobre la secreción de enzimática (lacasa) del ascomiceto *Leptosphaerulina* sp. Sin embargo, este tipo de inducción por interacciones biológicas en el género *Curvularia* no se discute en la literatura científica para ninguna de sus especies. De ahí que la presente investigación constituya el primer informe al respecto y constituya el punto de partida para la evaluación de otras especies pertenecientes a este mismo género.

La actividad ligninolítica de las lacasas frente a matrices fibrosas y sustratos complejos justifican su utilización creciente en la industria biotecnológica.<sup>(36)</sup> No obstante, en el campo de la producción animal, estas enzimas no se utilizan en la misma medida que lo hacen las enzimas celolíticas y xilanolíticas. De hecho, la mayoría de las compañías internacionales que comercializan productos enzimáticos fibrolíticos, presentan formulaciones a base de enzimas celolíticas y xilanolíticas, como es el caso de Grasszyme®, Alfazyme® y Fibrozyme®.<sup>(37)</sup> En cambio, en el mercado, la mayoría de estas preparaciones adolecen de enzimas modificadoras de lignina, a pesar de conocerse que estas biomoléculas son fundamentales para permitir el acceso a las fibras de celulosa. La unión de la actividad celolítica y la actividad ligninolítica es esencial para lograr una degradación más exhaustiva de los sustratos fibrosos.<sup>(38)</sup> Por estas razones, se pudiera esperar que la inclusión de enzimas lacasas en productos fibrolíticos optimice las formulaciones y consiga tecnologías mucho más eficientes.

Los resultados de la presente propuesta muestran cómo, a través del tratamiento fibrolítico de la fibra con las lacasas de *C. kusanoi* L7, se logra una modificación de la pared celular de la planta que permite una mejora en la calidad nutritiva de la fuente. Este resultado influye significativamente en la digestibilidad *in vitro* de un sustrato tan complejo como el

bagazo de caña de azúcar, con implicación positiva sobre la digestibilidad *in vivo* en especies de interés productivo como el conejo y el pollo de ceba.

La presente investigación ofrece los elementos necesarios para valorar la incorporación de enzimas como las lacasas que modifiquen la lignina en el pretratamiento de fuentes fibrosas para su uso en la producción animal, a la vez que traza nuevas líneas de pensamiento en la formulación y el estudio de productos fibrolíticos para la ganadería

## Conclusiones

Las lacasas fúngicas de *C. kusanoi* L7 constituyen una nueva variante de pretratamiento de fuentes fibrosas destinadas a la producción animal, a la vez que resultan interesantes para su utilización en la rama agropecuaria y biotecnológica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Isikgor F, Remzi C. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. *Polymers Chemistry*. 2015;6:4497-559. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/C5PY00263J>.
2. Aguiar N, Chicaiza E, Santana K, Caicedo WO. Composición química de subproductos agroindustriales destinados para la alimentación de cerdos. *Revista Caribeña de Ciencias Sociales*. 2019. Disponible en: <https://www.eumed.net/rev/caribe/2019/04/sub-productosalimentacioncerdos.html/>
3. Bala A y Singh B. Development of an environmental-benign process for efficient pretreatment and saccharification of Saccharum biomasses for bioethanol production. *Renewable Energy*. 2019;130:12-24. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.06.033/>
4. Zhao C, Xie B, Zhao R, Fang H. Microbial oil production by *Mortierella isabellina* from sodium hydroxide pretreated rice straw degraded by three-stage enzymatic hydrolysis in the context of on-site cellulase production. *Renewable Energy*. 2019;130:281-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.06.080/>
5. Munk L, Sitarz AK, Kalyani DC, Mikkelsen JD, Meyer AS. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? *Biotechnology Advances*. 2015;33(1):13-24. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.008>
6. Mehandiaa S, Shailendra S, Arya K. Isolation and characterization of an alkali and thermostable laccase from a novel *Alcaligenes faecalis* and its application in decolorization of synthetic dyes. *Biotechnology Reports*. 2020;25:e00413. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00413/>
7. Alberto M, Valiño E C, Ayala M, Folch JL, Sánchez R. Cellulolytic and ligninolytic potential of new strains of fungi for the conversion of fibrous substrates. *Biotechnology Research and Innovation*. 2019;3(1):177-86. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biori.2018.11.001>
8. Wang LY, Cheng GN, May AS. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulases production. *Biomass and Bioenergy*. 2014;67:319-38. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.013>

9. Alberto M, Valiño EC, Torta L, Laudicina VA, Sardina MT, Mirabile G. Potencialidades del consorcio microbiano *Curvularia kusanoi*-*Trichoderma pleuroticola* como pretratamiento biológico de fuentes fibrosas. *Revista MVZ Córdoba*. 2022;27(2). Disponible en: <https://doi.org/10.21897/issn.0122-0268>
10. Alberto M, Valiño E C, Ayala M, Folch JL, Sánchez R, Tapia I, Albelo N. Manual de procesos para la obtención y purificación de lacasa a partir del hongo *Curvularia kusanoi* L7. 2018; Registro OCPI: 2137-07-2018.
11. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2012. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>
12. Duncan DB. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 1955;11(1):1-42. Disponible en: <https://doi.org/10.2307/3001478>.
13. Alberto M, Valiño EC, Torta L, Laudicina VA, Sardina MT, Mirabile G. Lignolytic potential of *Curvularia kusanoi* L7 laccases for animal production. *Cuban Journal of Agricultural Science*. Cuba. 2020;54(2):157-67
14. AOAC (Official Method of Analysis: Association of Official Analytical Chemists). Arlington, Virginia, USA. 16th Edition. Ed. AOAC International. 1995. 474. ISBN: 0935584544
15. Goering HK, Van Soest PJ. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Washington: USDA. *Agricultural Handbook*; 1970;379:1970.
16. Machado LC, Motta W, Scapinello C, Sangoi M, Castro A. Manual de formulação de ração e suplementos para coelhos. Brasilia: Associação Científica Brasileira de Cunicultura; 2011. 24 p. ISBN 978-85-912388-1-1.
17. Pérez J, Cervera C, Falcao E, Concha L, Maertens L, Villamide MJ, Xiccato G. European ring-test on In Vivo determination of digestibility in rabbits: reproducibility of a reference method compared with individual laboratory procedures. *World Rabbit Science*. 1995;3:41-3.
18. García N, Bermúdez R C, Téllez I, Chávez M y Perraud I. Enzimas lacasa en inóculos de *Pleurotus* spp. *RTQ*. 2017;37(1):33-9. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-61852017000100004&lng=es&nrn=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852017000100004&lng=es&nrn=iso), ISSN 2224-6185.
19. Sumathi T, Lakshmi A, Viswanath B, Gopal DVR. Production of Laccase by *Cochliobolus* sp. Isolated from plastic dumped soils and their ability to degrade low molecular weight PVC. *Biochemistry Research International*. 2016; Article ID9519527: 10. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9519527/>
20. Bello A, Machido DA, Mohammed AI, Ado SA. Optimization of laccase production by *Curvularia lunata* using maize cob as substrate. *FUDMA Journal of Sciences*. 2020.4(4):460-8. Disponible en: <https://doi.org/10.33003/fjs-2020-0404-503>
21. Moreno A. Estudio de enzimas oxidoreductasas en latransformación de biomasa lignocelulósica enbiocombustibles. Deslignificación y destoxificación tesis doctoral.Universidad Complutense de Madrid, Facultad De Ciencias Biológicas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. 2013:1-247. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10839/2130>
22. Singh GD, Singh HO, Kaur S, Bansal SI y Kaur SB. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Industrial Crops and Products*. 2011;34(1):1160-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.001>
23. Van Dyk JS, Pletschke BI. A review of lignocelluloses bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes factor affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*. 2012;30:1458-80.
24. Kapoore RV, Padmaperuma G, Maneein S, Vaidyanathan S. Co-culturing microbial consortia: approaches for applications in biomanufacturing and bioprocessing. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2022;42(1):46-72. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1921691>
25. Ghorai S, Banik SP, Verma D, Chowdhury S y Khawala S. Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*. 2009;42(5-6):577-87. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.019>
26. Medina GE, Barragán H, Hernández CE, Martínez CA, Soto G. Uso de basidiomicetos nativos en la biotransformación del pasto buffel (*Cenchrus ciliaris*) para mejorar la calidad nutricional. *Revista Mexicana de Micología. Xalapa*. 2016;43:31-5. ISSN 0187-3180
27. Gagaoua M, Hafid K. Three Phase Partitioning System, an Emerging Non-Chromatographic Tool for Proteolytic Enzymes Recovery and Purification. *Biosensors Journal*. 2016;5(1):1-4. Disponible en: <http://doi.org/10.4172/2090-4967.1000134/>
28. Mehandiaa S, Shailendra S y Arya K. Isolation and characterization of an alkali and thermostable laccase from a novel *Alcaligenes faecalis* and its application in decolorization of synthetic dyes. *Biotechnology Reports*. 2020;25:e00413. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00413/>
29. Degerli E, Yangın S, Cansaran D. Determination of the effect of RBBR on laccase activity and gene expression level of fungi in lichen structure. *Biotechnology*. 2019;9(8):297. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1832-3>
30. Zhang Q, Zhao L, Li Y, Wang F, Li S, Shi G y Ding Z. Comparative transcriptomics and transcriptional regulation analysis of enhanced laccase production induced by co-culture of *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* with *Rhodotorula mucilaginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020;104(1):241-55. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10228-z/>
31. Metreveli E, Kachlishvili E, Singer SW, Elisashvili V. Alteration of white-rot basidiomycetes cellulase and xylanase activities in the submerged co-cultivation and optimization of enzyme production by *Irpex lacteus* and *Schizophyllum commune*. *Bioresource Technology*. 2017;241:652-60. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.148>
32. Savoie J M, Mata G. The antagonistic action of *Trichoderma* sp. hyphae to *Lentinula edodes* hyphae changes lignocellulolytic activities during cultivation in wheat straw. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1999;15:369-73. <https://doi.org/10.1023/A:1008979701853>
33. Hatvani N. Mécs I. Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. *Enzyme Microbiology Technology*. 2002;30(3):381-6. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00512-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00512-9)
34. Sharma A, Aggarwal NK. Lignocellulolytic Enzymology. In: *Water Hyacinth: A Potential Lignocellulosic Biomass for Bioethanol*. Springer, Cham. 2020. ISBN 978-3-030-35631-6. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-35632-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-35632-3_3)
35. Copete LS, Alandete F, Plácido J, Correa GA, Mora AL. Enhancement of ligninolytic enzymes production and decolourising acti-

- vity in *Leptosphaerulina* sp. by co-cultivation with *Trichoderma viride* and *Aspergillus terreus*. *Science of The Total Environment*. 2019;646(1):1536-45. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.387>
36. Sun K, Li S, Si Y, Huang Q. Advances in laccase-triggered anabolism for biotechnology applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2021;41(7):969-93.
37. Zilio C, Del Valle A, Ghizzi G, Takiya S, Días S S, Nunes T, Silva G y Rennó P. Effects of exogenous fibrolytic and amyolytic enzymes on ruminal fermentation and performance of mid-lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(5):4179-4189. Disponible en: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14949>
38. Lillington P, Leggieri P, Heom K, O'Malley M. Nature's recyclers: anaerobic microbial communities drive crude biomass deconstruction. *Current Opinion in Biotechnology*. 2020;62:38-47. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.08.015/>

---

Recibido: 28/02/2024

Aprobado: 29/04/2024

---

### Agradecimientos

Los autores de la presente investigación agradecen al Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México, al Centro de Investigación Biotecnológica (CEIB) de la Universidad Autónoma del estado de Morelos y al Departamento de Ciencias Agrarias Agroalimentarias y Forestales de la Universidad de estudios de Palermo, Italia, por su colaboración en la ejecución de los experimentos.

### Conflictos de intereses

Los autores del presente estudio declaramos que no existe conflicto de intereses con la publicación de este manuscrito.

### Contribuciones de los autores

Conceptualización: Maryen Alberto Vázquez, Elaine C. Valiño Cabrera, Lourdes L. Savón Valdés  
Curación de datos: Maryen Alberto Vázquez

Análisis formal: Maryen Alberto Vázquez, Elaine Valiño Cabreras, Lourdes Savón Valdés  
Investigación: Maryen Alberto Vázquez, Elaine Valiño Cabreras, Bárbara Rodríguez Sánchez  
Metodología: Maryen Alberto Vázquez, Elaine Valiño Cabreras, Bárbara Rodríguez Sánchez  
Administración del proyecto: Elaine Valiño Cabreras  
Supervisión: Elaine Valiño Cabreras, Lourdes Savón Valdés  
Validación: Maryen Alberto Vázquez, Bárbara Rodríguez Sánchez  
Redacción-Borrador original: Maryen Alberto Vázquez,  
Redacción-Revisión y edición: Maryen Alberto Vázquez, Elaine Valiño

### Financiamientos

Las investigaciones de la presente propuesta se financiaron por los proyectos: "Obtención y evaluación de un producto enzimático con actividad fibrolítica para el sector ganadero y la bioindustria", y el proyecto "Obtención de un aditivo enzimático con actividad lacasa para la alimentación del pollo de ceba" ambos pertenecientes al Programa Nacional de Alimento Animal. Código: P131LH002-034 y P131LH002-081, respectivamente.

### Cómo citar este artículo

Alberto Vazquez M, Valiño Cabrera EC, Savón Valdés LL, Rodríguez Sánchez B. Obtención de lacasas fúngicas para el mejoramiento de fuentes fibrosas destinadas a la alimentación animal. *An Acad Cienc Cuba* [internet] 2024 [citado en día, mes y año];14(2):e1545. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1545>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2024.

