

Ligninolytic potential of *Curvularia kusanoi* L7 laccases for animal production

Evaluación del potencial ligninolítico de las lacasas de *Curvularia kusanoi* L7 para su empleo en la producción animal

Maryen Alberto Vazquez¹, Elaine Cristina Valiño Cabrerar¹, Livio Torta², A. Laudicina² and Giulia Mirabile²

¹*Institute of Animal Science (ICA), km 47 ½ Carretera Central San José de Las Lajas, 32700, Mayabeque, Cuba*
²*Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali (SAAF) Department, Università degli Studi di Palermo, Viale Delle Scienze, Ed. 5, 90128 Palermo, Italy*

Maryen Alberto Vazquez: <https://orcid.org/0000-0003-0562-1052>

Elaine Cristina Valiño Cabrerar: <https://orcid.org/0000-0003-4178-3286>

Livio Torta: <https://orcid.org/0000-0003-2694-8265>

Vito Armando Laudicina: <https://orcid.org/0000-0002-5531-0669>

Giulia Mirabile: <https://orcid.org/0000-0001-8070-307X>

Email: m vazquez@ica.co.cu

The present research was conducted with the objective of evaluating the ligninolytic potential of *Curvularia kusanoi* L7 laccases in improving the nutritional quality of fibrous substrates for animal feed. Laccase production was obtained from *C. kusanoi* L7 under native conditions by solid submerged fermentation of wheat bran and by biological interactions with *Trichoderma viride* M5-2 and *Trichoderma pleuroticola*. The enzymes were purified from the culture broths by triphasic partition. The degradative potential of native and induced laccases were evaluated by determining foliar ligninolytic capacity, raw wheat (*Triticum aestivum*) straw delignification and the effect of enzyme pretreatment on fibrous fractionation and *in vitro* digestibility of sugarcane bagasse. Laccases, both native and induced, presented high foliar degradation and delignification of raw wheat straw. Regarding the improvement of nutritional quality of sugarcane bagasse, all the enzyme pretreatments managed to decrease the fiber content and increase *in vitro* digestibility. Compared to untreated bagasse, native laccase pretreatment obtained the highest digestibility values ($P < 0.05$) for dry matter (54.71 %), organic matter (63.14 %), acid detergent fiber (63.59 %) and cellulose (65.46%). It is concluded that *C. kusanoi* L7 laccases can be used as a novel tool in improving the nutritional quality of fibrous sources for animal feed.

Key words: *Enzyme, induction, fiber, pretreatment, in vitro digestibility*

The rapidly grow of world population results in the depletion of many resources and aggravates the international food situation. According to FAO (2019), hunger affects over 42.5 millions of people only in the Caribbean and Latin America region. For these reasons, the development of tropical animal production is essential as one of the important ways to reduce the negative impact of the food deficit.

Several studies are conducted with the aim of achieving more sustainable productions, capable of supplying international demand and promoting the use of

La presente investigación se condujo con el objetivo de evaluar la capacidad ligninolítica de las enzimas lacasas del hongo *Curvularia kusanoi* L7 en el mejoramiento de la calidad nutritiva de fuentes fibrosas para su empleo en la alimentación animal. La producción de lacasas se obtuvo mediante fermentación sólida sumergida del salvado de trigo, en condiciones nativas y con inducción por interacciones biológicas con *Trichoderma viride* M5-2 y *Trichoderma pleuroticola* y se purificaron mediante partición trifásica. La capacidad degradativa de las enzimas nativas e inducidas se evaluó mediante la determinación de su capacidad ligninolítica foliar, deslignificación de la paja cruda de *Triticum aestivum* (trigo) y determinación del efecto del pretratamiento enzimático en el fraccionamiento fibroso y la digestibilidad *in vitro* del bagazo de *Saccharum officinarum* (caña de azúcar). Las lacasas, tanto nativas como inducidas, presentaron resultados similares de degradación foliar y deslignificación de la paja de trigo cruda. En cuanto a la calidad nutricional del bagazo de caña de azúcar, los pretratamientos enzimáticos lograron disminuir los componentes fibrosos, e incrementar su digestibilidad *in vitro*. Respecto al bagazo sin tratar, el pretratamiento con lacasa nativa presentó los mayores valores ($P < 0.05$) de digestibilidad de la materia seca, (54.71 %) de la materia orgánica (63.14 %) de la fibra de detergente ácido (63.59 %) y de la celulosa (65.46%). Se concluye que el potencial ligninolítico de las lacasas de *C. kusanoi* L7 y su capacidad para mejorar la calidad nutritiva y la digestibilidad *in vitro* del bagazo de caña de azúcar, encaminan su evaluación *in vivo* en la alimentación de especies monogástricas y ruminantes.

Palabras clave: *Enzima, inducción, fibra, pretratamiento, digestibilidad in vitro*

El crecimiento acelerado de la población mundial trae como consecuencia el agotamiento de muchos recursos y empeora la situación alimentaria internacional. Según reportes de la FAO (2019), el hambre afecta a más de 42,5 millones de personas en la región de América Latina y el Caribe. Por estas razones, el desarrollo de la producción animal en el trópico 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

alternative sources for animal feed that do not compete with human consumption. In this sense, different strategies are valued, where enzymatic pretreatment of fibrous sources stands out (Pinos *et al.* 2019). However, the structural complexity of lignin, as well as its close association and chemical crosslinking with the carbohydrate fraction of the plant cell wall, make it a biomolecule with a recalcitrant character and difficult degradation.

The enzymes that modify this biopolymer are oxidative, nonspecific and, in addition, they act through non-protein mediators in contrast to hydrolytic cellulase and hemicellulase enzymes (Mehandiaa *et al.* 2020). One of the main lignolytic enzymes that catalyze the progressive depolymerization of lignin is laccase and within their group, they have the greatest industrial application (Munk *et al.* 2015).

Compared to the use of lignocellulolytic microorganisms, the enzymatic pretreatment of high fiber substrates has great economic benefits and reduces the time of the degradation process (Zhao *et al.* 2019). However, there are only few studies on the evaluation of ligninolytic enzymes in improving the nutritional quality of fibrous sources for animal feed, and none of them highlight the importance of laccase for these purposes. That's why the present research aims to: Evaluate the ligninolytic potential of *Curvularia kusanoi* L7 laccases for its use in animal feed

Material and Methods

Enzyme crudes obtaining by solid submerged fermentation of wheat bran. Microorganism. *Curvularia kusanoi* L7 strain was used, isolated from lemon tree, with number of nucleotide sequences registered in the GenBank, and accession number KY795957.

Procedure. From the pure culture of *C. kusanoi* L7, 3 cm² were taken and inoculated in an Erlenmeyer flask containing 3 g of wheat bran and 100 mL of citrate buffer (50 mM, pH 5.0), and they were incubated at 30 °C in an orbital shaker at 120 rpm for 168 h of fermentation. The contents of each Erlenmeyer were filtered through a Buchner funnel, the resulting liquid was centrifuged (4 °C, 10 000 rpm, 3 min) and the supernatant (crude enzyme extract) were stored in Corning tubes at -20 °C for subsequent determinations (Wang *et al.* 2014).

Laccase induction in C. kusanoi L7 cultures through biological interactions with Trichoderma viride M5-2 and Trichoderma pleuroticola. The induction of laccase enzymes in *C. kusanoi* L7 cultures was carried out through biological interactions with two strains of *Trichoderma* (*T. viride* M5-2 and *T. pleuroticola*, with nucleotide sequences registered in the GenBank and number of accession KY977981 and MK992922, respectively). Inoculums of these

la demanda internacional e impulsar la búsqueda y el estudio de fuentes alternativas de alimento animal que no compitan con la alimentación humana. En ese sentido, se valoran diferentes estrategias dentro de las que sobresale el pre tratamiento enzimático de fuentes fibrosas (Pinos *et al.* 2019). Sin embargo, la complejidad estructural de la lignina, así como su estrecha asociación y entrecruzamiento químico con la fracción de carbohidratos de la pared celular de la planta, la convierte en una biomolécula de carácter recalcitrante y de difícil degradación.

Las enzimas que modifican este biopolímero son de tipo oxidativo, inespecíficas y además, actúan a través de mediadores no-proteicos en contraste con las enzimas hidrolíticas celulasas y hemicelulasas (Mehandiaa *et al.* 2020). Dentro de las principales enzimas lignolíticas que catalizan la despolimerización progresiva de la lignina, se encuentran las lacasas, las que constituyen dentro de su grupo, las de mayor aplicación industrial (Munk *et al.* 2015).

El empleo de este tipo de enzimas en el pre tratamiento de sustratos altos en fibra, supone grandes beneficios económicos y disminuye el tiempo global del proceso degradativo, si se compara con el empleo de microorganismos lignocelulolíticos (Zhao *et al.* 2019). No obstante, son escasos los estudios sobre la evaluación de estas enzimas en el mejoramiento de la calidad nutritiva de fuentes fibrosas para la alimentación animal. Por estas razones la presente investigación tuvo como objetivo: Evaluar las lacasas de *Curvularia kusanoi* L7 en la degradación de fuentes fibrosas para la alimentación animal

Material y Métodos

Obtención de los crudos enzimáticos mediante fermentación sólida sumergida del salvado de trigo. Microorganismo: en el presente estudio se empleó el hongo ascomiceto *Curvularia kusanoi* L7, aislado del árbol del limón, con número de secuencias de nucleótidos registradas en el GenBank y número de acceso L7 KY795957

Procedimiento. Del cultivo puro de la cepa *C. kusanoi* L7, se tomaron 3 cm² y se inocularon en un Erlenmeyer que contenía 3 g de salvado de trigo y 100 mL de tampón citrato (50 mM, pH 5.0). Estos se incubaron a 30 °C en una zaranda orbital a 120 rpm durante 168 h de fermentación (tiempo de mayor producción de lacasa). El contenido de cada Erlenmeyer se filtró a través de un embudo Büchner, el líquido resultante se centrifugó (4 °C, 10,000 rpm, 3 min) y al sobrenadante (extracto crudo enzimático) se le determinó la actividad enzimática y la concentración de proteína. El resto se almacenó en tubos Corning a -20 °C para determinaciones posteriores (Wang *et al.* 2014).

Inducción de lacasas en cultivos de C. kusanoi L7 a través de interacciones biológicas con Trichoderma viride M5-2 y Trichoderma pleuroticola. La inducción de enzimas lacasa en los cultivos de *C. kusanoi* L7 se realizó a través de interacciones biológicas con dos especies de *Trichoderma* (*T. viride* M5-2 y *T. pleuroticola*, con número de secuencias de nucleótidos registradas

strains (1×10^7 CFU/g of substrate) were incorporated into the *C. kusanoi* L7 cultures at 48h of growth. The induction process was carried out in solid submerged fermentation of wheat bran as described in the previous section. For both *Trichoderma* strains the procedure was similar.

Laccase purification by three phase partition. The enzymatic extracts of *C. kusanoi* L7 and those resulting from the induction process, were purified using the three-phase partitioning methodology proposed by Alberto *et al.* (2018). Ter-butanol was added to the crude extracts in a ratio of 1.0: 1.1 (v/v), respectively. This mixture was saturated at 78 % with ammonium sulfate. The system formed was homogenized by vortex for 1 minute and then incubated for 1 hour at 38 °C in a temperature controlled incubation bath until the phases were separated. The system was centrifuged (4000 rpm x 10 minutes at 25 °C) in an IEC CL31R thermo-scientific centrifuge. The middle phase was separated from the rest and re-dissolved in phosphate buffer (50 mM, pH 7). Finally, enzyme activity and protein concentration were determined.

Determination of laccase activity. Laccase activity was determined using a UV-Vis split beam spectrophotometer, Rigol Ultra-3400. The reaction mixture formed by 100 µL of syringaldazine (5 mM in ethanol) and 800 µL of citrate buffer (50 mM, pH 4.5) was incubated at 30 °C for 1 minute. An aliquot of 100 µL of the enzyme crude was added to reach the final reaction volume of 1mL and the syringaldazine oxidation reaction was monitored kinetically for 1 minute under aerobic conditions at 530 nm. The amount of enzyme that catalyzes the conversion of 1.0 mmol of syringaldazine per minute was considered as a unit of laccase activity (U) according to Perna *et al.* (2018).

Determination of protein concentration. Protein concentration was determined by the method proposed by Bradford (1976) using a standard curve of bovine serum albumin (BSA) in the concentration range of 50 - 0.01 mg/mL. The procedure was conducted in the same way for initial crude extracts and those resulting from the purification process.

Evaluation of the ligninolytic capacity of C. kusanoi L7 laccases on raw wheat straw by Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy with Fourier Transform (ATR-FT-IR). To evaluate the ligninolytic capacity of *C. kusanoi* L7 laccases on raw wheat straw, the substrate was incubated with the different enzymes preparation (native laccase of *C. kusanoi* L7, laccase induced by *T. viride* M5-2 and laccase induced by *T. pleuroticola*) at a ratio of 1: 1 (w/v) in glass tubes, for 5 days at 40 °C. The ligninolytic capacity of the enzyme treatments was compared with a control treatment where the enzyme was replaced by 1 mL of distilled water. Differences in lignin degradation were evidenced by Total Attenuated

en el GenBank y número de acceso de KY977981 y MK992922, respectivamente). Se empleó un inóculo de 1×10^7 UFC/g de sustrato, el cual se incorporó a los cultivos de *C. kusanoi* L7 a las 48h de crecimiento.

El proceso de inducción se realizó en fermentación sólido sumergida del salvado de trigo, igual a lo descrito en la sección anterior. Para ambas especies de *Trichoderma* se procedió de forma similar.

Purificación de lacasa mediante partición trifásica. Las lacasas de los extractos enzimáticos de *C. kusanoi* L7 y las resultantes del proceso de inducción, se purificaron mediante la metodología de partición trifásica propuesta por Alberto *et al.* (2018). A los extractos crudos se añadió ter-butanol en una relación de 1.0: 1.1 (v/v), respectivamente. Esta mezcla se saturó al 78 % con sulfato de amonio. El sistema formado se homogeneizó mediante agitación vórtex durante 1 minuto. Después se incubó durante 1 h a 38 °C en baño de incubación con temperatura controlada hasta que las fases se separaron. Este sistema se centrifugó (4000 rpm, 10 minutos a 25 °C) en una centrífuga termocientífica IEC CL31R, con el objetivo de compactar y separar con mayor facilidad el precipitado depositado en la fase intermedia. A continuación de la centrifugación, las fases se separaron mediante un embudo separador, la fase intermedia se reservó y se re disolvió en tampón fosfato (50 mM, pH 7). Finalmente, se determinó la actividad enzimática y la concentración de proteína.

Determinación de la actividad de la enzima lacasa. La actividad lacasa se determinó por espectrofotometría mediante el espectrofotómetro UV-Vis split beam, Rigol Ultra-3400. Se emplearon 100 µL de siringaldazina (5 mM en etanol) y 800 µL de amortiguador de citrato (50 mM, pH 4,5). La mezcla de reacción se incubó a 30 °C y se adicionó 100 µL del crudo enzimático hasta volumen final de reacción de 1mL. La reacción de oxidación de la siringaldazina se monitoreó en modo cinético durante 1 minuto en condiciones aerobias a 530 nm. Se consideró como una unidad de actividad lacasa (U), la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1.0 mmol de siringaldazina por minuto (Perna *et al.* 2018).

Determinación de la concentración de proteínas. La concentración de proteínas se determinó de igual forma para los crudos iniciales y los resultantes luego de la purificación en sistemas trifásicos, mediante el método de Bradford (1976), con el empleo de una curva estándar de seroalbumina bovina (BSA) en el rango de concentraciones 50-0.01 mg/mL.

Evaluación de la capacidad ligninolítica de las lacasas de C. kusanoi L7 en la paja de trigo cruda mediante Espectroscopía Infrarroja de Reflexión Total Atenuada con Transformada de Fourier (ATR-FT-IR). Para evaluar la capacidad ligninolítica de las lacasas de *C. kusanoi* L7 en la paja de trigo cruda, se incubó el sustrato con las diferentes enzimas (lacasa nativa de *C. kusanoi* L7, lacasa inducida por *T. viride* M5-2 y lacasa inducida por *T. pleuroticola*) a razón de 1:1 (p/v) en tubos de vidrio, durante 5 días a 40 °C. La capacidad ligninolítica de los tratamientos enzimáticos

Reflection Infrared Spectroscopy (ATR-FT-IR) on Pelkin Elmer equipment with ATR diamond base and MCT/A detector. The scans were performed from 4000 to 400 cm^{-1} .

Fibrous fractioning and in vitro digestibility of sugarcane bagasse pretreated with purified laccases from C. kusanoi L7. To evaluate the activity of *C. kusanoi* L7 laccases on the fibrous components of sugarcane bagasse, a completely randomized design with four treatments was used: control (untreated bagasse) and three enzymatic treatments (bagasse treated with native laccase, bagasse treated with laccase induced by *T. viride* M5-2 and bagasse treated with laccase induced by *T. pleurotica*). The analyses were performed with six repetition for a total of 24 samples.

To obtain each treatment, the different enzymes were incubated with 1g of substrate at a rate of 4 IU/g in an orbital shaker at 40 °C for 72 hours. Fibrous fractioning was performed according to Goering and Van Soest (1970).

The digestibility of sugarcane bagasse pretreated with *C. kusanoi* L7 laccases was evaluated using the *in vitro* technique proposed by Marrero *et al.* (1998) with pig fecal inoculum. A crossbred pig (Yorkshire x Landrace x Duroc) was taken as the feces donor, who received 1.5 kg of corn-soybean based feed and water at will. Feces were taken immediately after defecation. Subsequently, in the residues was determined the content of dry matter (DM) and organic matter (OM) by AOAC (1995), acid detergent fiber (FND) lignin and cellulose by Goering and van Soest (1970). Incubation medium was used as the blank for digestibility calculations.

Statistical analysis. Both experiments were processed according to a simple classification model by the InfoStat statistical package (Di Rienzo *et al.* 2012). Duncan (1955) test was used when necessary to discriminate differences between the means.

Foliar ligninolytic capacity of laccase C. kusanoi L7 in lemon tree (Citrus x limon). To evaluate the ligninolytic effect of *C. kusanoi* L7 laccases on the lemon tree leaf surface, 3 young plants were used for each treatment (control with distilled water, native laccase of *C. kusanoi* L7, laccase induced by *T. viride* M5-2 and laccase induced by *T. pleurotica*). All of these treatments were applied in 5 leaves per each plant, for a total of 15 leaves per treatment. The leaf surface was cleaned with distilled water and 1 mL of the enzyme was sprayed. Foliar degradative capacity was evaluated every 24 hours for a period of 7 days. The experiment was carried out at room temperature at the experimental station of the Agri-Food and Forest Sciences of the University of Palermo, Sicily, Italy.

Results and Discussion

Evaluation of the ligninolytic capacity of C. kusanoi

se comparó con un tratamiento control donde se sustituyó la enzima por 1mL de agua destilada. Las diferencias en cuanto a la degradación de la lignina se evidenciaron mediante Espectroscopía Infrarroja de Reflexión Atenuada Total (ATR-FT-IR) en un equipo Pelkin Elmer con base de diamante ATR y detector MCT / A. Las exploraciones se realizaron desde 4000 cm^{-1} hasta 400 cm^{-1} .

Fraccionamiento fibroso y digestibilidad in vitro del bagazo de caña de azúcar pretratado con lacasas purificadas de C.kusanoi L7. Para evaluar la actividad de las lacasas de *C. kusanoi* L7 en los componentes fibrosos del bagazo de caña de azúcar, se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro tratamientos: tratamiento control (bagazo sin tratar) y tres tratamientos enzimáticos (bagazo tratado con lacasa nativa, bagazo tratado con lacasa inducida por *T. viride* M5-2 y bagazo tratado con lacasa inducida por *T. pleurotica*). Los análisis se realizaron por sextuplicado para un total de 24 muestras.

Para obtener cada uno de los pretratamientos enzimáticos, se incubó 1g de sustrato con la enzima a razón de 4 UI/g y se mantuvo en una zaranda orbital a 40°C durante 72 horas. El fraccionamiento fibroso se realizó según la metodología de Goering y Van Soest (1970).

Se evaluó la digestibilidad del bagazo de caña pretratado con las lacasas de *C. kusanoi* L7 mediante la técnica *in vitro* con inóculo fecal de cerdo propuesta por Marrero *et al.* (1998). Para esto se empleó un diseño completamente aleatorizado con cuatro tratamientos: tratamiento control (bagazo sin tratar) y tres tratamientos enzimáticos (bagazo pretratado con lacasa nativa, bagazo pretratado con lacasa inducida por *T. viride* M5-2 y bagazo pretratado con lacasa inducida por *T. pleurotica*). Los análisis se realizaron por sextuplicado para un total de 30 muestras. Como donante de las heces se tomó un cerdo mestizo (Yorkshire x Landrace x Duroc), quien recibió 1.5 kg de pienso basado en maíz-soja y agua a voluntad. Las heces se tomaron inmediatamente después de la defecación. Posteriormente, se determinó en los residuos el contenido de materia seca (MS), orgánica (MO) y ceniza (AOAC, 1995), además de la concentración de fibra detergente ácida (FND) y celulosa (Goering y van Soest, 1970). Para los cálculos de la digestibilidad se usó como blanco el medio de incubación.

Análisis estadístico. En ambos experimentos, los datos se procesaron según modelo de clasificación simple, con la ayuda del paquete estadístico InfoStat versión 1.0 (Di Rienzo *et al.* 2012). La dócima de Duncan (1955) se empleó en los casos necesarios, para discriminar diferencias entre las medias.

Capacidad lignolítica foliar de lacasas C. kusanoi L7 en árbol de limón (Citrus aurantifolia). Para evaluar el efecto ligninolítico de las lacasas de *C. kusanoi* L7 en la superficie foliar del árbol de limón, se emplearon 3 plantas jóvenes por cada tratamiento (control con agua destilada, lacasa nativa de *C. kusanoi* L7, lacasa inducida por *T. viride* M5-2 y lacasa inducida por *T. pleurotica*). Estos tratamientos se aplicaron en 5 hojas por cada planta, para un total de 15 hojas por tratamiento. La superficie

L7 laccases on raw wheat straw by Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy with Fourier Transform (ATR-FT-IR). The ATR-FT-IR spectra of raw wheat straw and straw treated with *C. kusanoi* L7 laccases are shown in Figure 1. In accordance with previous studies by Xu *et al.* (2004 and 2006), the presence of lignin in the sample is detected through characteristic signals in the spectrum.

foliar se limpió con agua destilada y se asperjó 1 mL de la enzima. La capacidad degradativa foliar se evaluó cada 24 horas por un período de 7 días. El experimento se realizó a temperatura ambiente en la estación experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias Agroalimentarias y Forestales de la Universidad de Palermo, Sicilia, Italia.

Resultados y Discusión

Evaluación de la capacidad ligninolítica de las lacasas

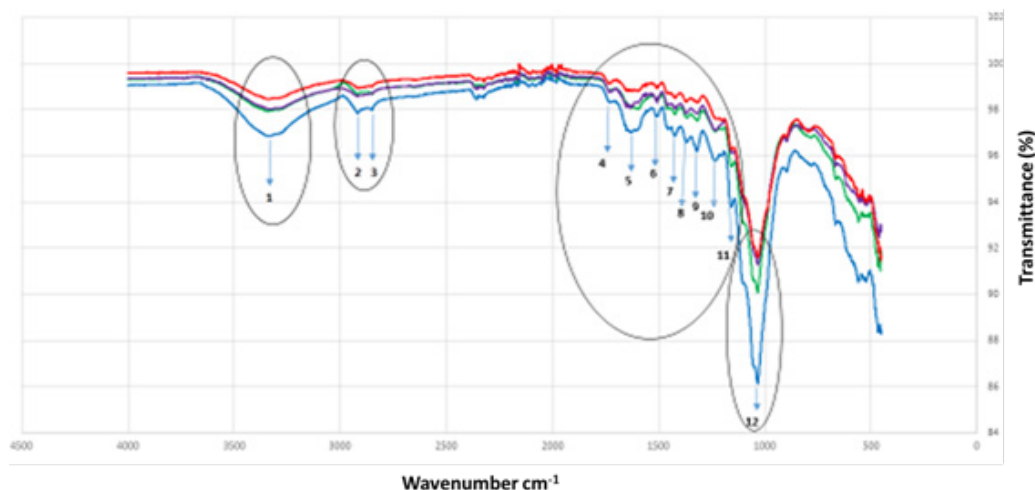


Figure 1. ATR-FT-IR spectrum of raw wheat straw and treated with native and induced lacases of *C. kusanoi* L7 in the range 400 to 4000 cm^{-1} . The numbers 1-12 correspond to the characteristic signals of lignin. Blue line represent raw wheat straw, green line represent raw wheat straw degraded by native laccase, purple line represent raw wheat straw degraded by *T. viride* M5-2 induced laccase and red line represent raw wheat straw degraded by *T. pleuroticola* induced laccase

In the present investigation, the following bands associated with lignin were identified:

1. Stretching vibration of O-H groups (phenolic and aliphatic) corresponding band in the range of 3400 to 3200 cm^{-1}

2. Stretching vibration of C-H of the CH_3 and CH_2 groups detected at 2930 cm^{-1}

3. Small band at 2850 cm^{-1} attributed to vibration of OCH_3 groups.

4. Band at 1711 cm^{-1} attributed to the C=O stretching of unconjugated ketones, carbonyl groups, conjugated aldehyde or ester groups and carboxylic acids.

5. Band at 1610 cm^{-1} associated with aromatic C=C double bonds

6. Band at 1510 cm^{-1} associated with vibrations of C=C bonds of the aromatic and phenolic units of lignin

7. Band detected at 1420 cm^{-1} associated with vibrations of lignin phenylpropane aromatic skeleton

8. Band detected at 1333 cm^{-1} associated with the vibrations of the aliphatic C-H bonds (CH or CH_2 groups)

9. Band detected at 1320 cm^{-1} associated with symmetrical flexing of C-H aliphatic bonds.

10. Band detected at 1210 cm^{-1} associated with the presence of C-O bonds of the guaiacyl ring.

de *C. kusanoi* L7 en la paja de trigo cruda mediante Espectroscopía Infrarroja de Reflexión Atenuada Total con Transformada de Fourier (ATR-FT-IR). Los espectros ATR-FT-IR de la paja de trigo cruda y de la paja tratada con las lacasas de *C. kusanoi* L7 se muestran en la figura 1. De acuerdo con los estudios previos de Xu *et al.* (2004 y 2006), la presencia de la lignina en la muestra se detecta a través de señales características en el espectro.

En la presente investigación se identificaron las siguientes bandas asociadas a la lignina:

1. Banda correspondiente a la vibración de estiramiento de grupos O-H (fenólicos y alifáticos) en el intervalo de 3400 a 3200 cm^{-1}

2. Banda correspondiente al estiramiento de C-H de los grupos CH_3 y CH_2 detectada a 2930 cm^{-1}

3. Pequeña banda a 2850 cm^{-1} atribuida a la vibración de grupos OCH_3 .

4. La banda a 1711 cm^{-1} atribuida al estiramiento C=O de cetonas no conjugadas, grupos carbonilos, grupos éster o aldehídos conjugados y ácidos carboxílicos.

5. Banda a 1610 cm^{-1} asociada a dobles enlaces C=C aromáticos

6. Banda a 1510 cm^{-1} asociada a vibraciones de enlaces C=C de las unidades aromáticas y fenólicas de la lignina

7. Banda detectada a 1420 cm^{-1} asociada a las vibraciones del esqueleto aromático de fenilpropano de la lignina

11. Band detected at 1160 cm^{-1} associated with the antisymmetric stretch vibration C–O of the secondary alcohols or of the hydroxycinnamic acids ester-bound (such as esterified ρ -coumaric acid and ferulic acid) (Sun and Cheng, 2002)

12. Band detected at 1035 cm^{-1} associated with the vibrations produced by the O-CH₃ bonds of the guaiacyl and syringyl type units

Laccase treatments, both induced and native, show a marked intensities reduction of the lignin associated signals. *T. pleurotica* induced laccase treatment achieves the greatest reduction of these signals, although there are only small differences from the rest. In all cases, the greatest reductions were observed in the characteristic triplet (5, 6 and 7), attributed to the vibrations of the lignin aromatic ring, which corresponds to similar studies made by Ibarra *et al.* (2004)

These results are also agree to those proposed by Mwaikambo and Ansell (2011), who found a marked decrease in the band between 3300 and 3100 cm^{-1} after treatments of straw fibers with laccase enzyme. It is known that the action mechanism of this enzyme itself implies the oxidative depolymerization of phenolic compounds through the formation of unstable phenoxyl radicals (Ghoul and Chebil, 2012), which is why variations in the intensity of these bands are indicative of the enzyme action on the phenolic units of lignin. According to Mattinen *et al.* (2005) and Kahar (2013) changes at 1512 cm^{-1} attributed to lignin aromatic ring vibrations due to aromatic skeletal vibration (C=C), are indicative of changes in lignin surface, by what a lower intensity of this band demonstrates the laccase capacity to oxidize the phenolic units present on the fibers surface (Oliva *et al.* 2015 and Liu *et al.* 2014).

In vitro digestibility and fibrous fractioning and of sugarcane bagasse pretreated with purified laccases from *C. kusanoi* L7. Table 1 summarizes the fibrous fractioning of sugarcane bagasse pretreated with the laccase enzymes of *C. kusanoi* L7. In all cases, the enzymatic pretreatment process allowed a decrease in both the acid detergent fiber and the levels of lignin and cellulose. The reduction of these indicators is an important aspect for a better utilization of sugarcane bagasse in animal production.

López *et al.* (2018) stated that pretreatment methods must be able to improve the biodegradability of the substrate and present low energy consumption, ease waste disposal and low economic cost. That is why pretreatment methods constitute a sustainable and effective alternative for the bioconversion of lignocellulosic biomass.

The modification of the sugarcane bagasse fibers through the action of laccase enzymes, allows obtaining a more accessible and more biodegradable substrate. The *in vitro* digestibility of pre-treated bagasse is summarized

8. Banda detectada a 1333 cm^{-1} asociada a las vibraciones de los enlaces C–H alifáticos (grupos CH o CH₂)

9. Banda detectada a 1320 cm^{-1} asociada a la flexión simétrica de enlaces alifáticos C–H

10. Banda detectada a 1210 cm^{-1} asociada a la presencia de enlaces de C–O del anillo guaiacil

11. Banda detectada a 1160 cm^{-1} asociada a la vibración del estiramiento antisimétrico C–O de alcoholes secundarios o de los ácidos hidroxicinámicos unidos a éster (como el ácido ρ -cumárico esterificado y ácido ferúlico) (Sun y Cheng, 2002)

12. Banda detectada a 1035 cm^{-1} asociada a las vibraciones producidas por los enlaces O-CH₃ de las unidades de tipo guayacilo y siringilo

Los tratamientos con lacasa, tanto inducida como nativa, muestran marcada reducción de las intensidades en todas las señales que se asocian a la lignina. El tratamiento que logra mayor disminución de las señales en el espectro es el que emplea la lacasa inducida con *T. pleurotica*, aunque las diferencias con el resto no son en gran medida. En todos los casos, las mayores reducciones se observan en el triplete característico (5, 6 y 7), atribuido a las vibraciones del anillo aromático de la lignina, lo que se corresponde con estudios similares de Ibarra *et al.* (2004).

Estos resultados también se corresponden con los planteados por Mwaikambo y Ansell (2011), quienes encontraron marcada disminución de la banda comprendida entre 3300 y 3100 cm^{-1} después del tratamiento de la fibra de la paja de trigo con la enzima lacasa. Se conoce que el propio mecanismo de acción de esta enzima, implica la despolimerización oxidativa de los compuestos fenólicos mediante la formación de radicales fenoxilo inestables (Ghoul y Chebil, 2012), es por ello que las variaciones en la intensidad de estas bandas son indicativas de la acción de la enzima sobre las unidades fenólicas de la lignina. Según Mattinen *et al.* (2005) y Kahar (2013) los cambios a 1512 cm^{-1} atribuidos a las vibraciones de los anillos aromáticos de la lignina debido a la vibración esquelética aromática (C=C), son indicativos de cambios en la superficie de la lignina, por lo que la menor intensidad de esta banda demuestra la acción de la lacasa para oxidar las unidades fenólicas presentes en la superficie de las fibras (Oliva *et al.* 2015 y Liu *et al.* 2014).

Digestibilidad in vitro y fraccionamiento fibroso del bagazo de caña de azúcar pretratado con lacasas purificadas de C. kusanoi L7. En la tabla 1 se resume el fraccionamiento fibroso del bagazo de caña pretratado con las enzimas lacasas de *C. kusanoi* L7. En todos los casos, el proceso de pre tratamiento enzimático permitió la disminución tanto de la fracción ácida de la fibra como de los valores de lignina y celulosa. La reducción de estos indicadores es un aspecto fundamental para mejorar el aprovechamiento del bagazo de caña de azúcar.

López *et al.* (2018) plantearon que los métodos de pretratamiento deben ser capaces de mejorar la

Table 1. Fibrous fractioning of sugarcane bagasse pretreated with laccase enzymes from *C. kusanoi* L7

Indicators (%)	Sugarcane bagasse				SE ± sign.
	Bagasse control	Treated with native laccase	Treated with <i>T. viride</i> induced laccase	Treated with <i>T. pleuroticola</i> induced laccase	
DM	94.65	94.68	94.79	94.28	±0.24 P=0.4875
ADF	51.88 ^a	40.14 ^b	39.72 ^c	39.74 ^c	±0.09 P<0.0001
Lignin	8.93 ^a	6.12 ^b	6.12 ^b	5.35 ^c	±0.10 P<0.0001
Cellulose	39.49 ^a	30.06 ^b	28.07 ^c	27.57 ^c	±0.26 P<0.0001

^{a, b, c} Different letters indicate significant differences for P < 0.05 (Duncan, 1955). DM (dry matter), ADF (acid detergent fiber)

in table 2. As observed, the difference compared to the control, clearly indicate that degradation process was effective in improving the nutritional quality of this fibrous source.

biodegradabilidad del sustrato y presentar bajo consumo de energía, facilidad en la disposición de residuos y bajo costo económico. Es por ello que constituyen una alternativa sustentable y eficaz para la bioconversión de

Table 2. *In vitro* digestibility of sugarcane bagasse pretreated with the laccase enzymes of *C. kusanoi* L7

Indicators (%)	Sugarcane bagasse				SE ± sign.
	Bagasse control	Treated with native laccase	Treated with <i>T. viride</i> induced laccase	Treated with <i>T. pleuroticola</i> induced laccase	
DMD	34.88 ^d	54.71 ^a	44.59 ^c	48.60 ^b	±0.48 P<0.0001
OMD	45.43 ^d	63.14 ^a	54.78 ^c	58.91 ^b	±0.60 P<0.0001
ADFD	50.53 ^d	63.59 ^a	56.88 ^c	61.16 ^b	±0.36 P<0.0001
CD	52.45 ^c	65.46 ^a	60.88 ^b	64.48 ^a	±0.51 P<0.0001

^{a, b, c, d} Different letters indicate significant differences for P < 0.05 (Duncan, 1955). DMD (dry matter digestibility), OMD (organic matter digestibility), ADFD (acid detergent fiber digestibility) and CD (cellulose digestibility).

Vargas and Pérez (2018) stated that the utilization of sugarcane bagasse is affected by its low digestibility, which is the fundamental reason for the application of pre-digestion processes that improve its nutritional quality. These types of pretreatments vary from the use of alkalis such as sodium hydroxide to the use of physical methods with high energy consumption that can increase digestibility up to 60 %.

Lagos and Castro (2019) stated that sugarcane bagasse, unlike whole cane, has higher fiber content, so its digestibility is lower (around 25 %). These authors pointed out that the use of this fibrous source in animal feed requires the incorporation of different methodologies and procedures that improve its bioconversion and extend its use. An example of this statement is the investigations made in Veracruz, Mexico, where a predigested feed was developed from sugarcane bagasse for animal feed. The increase in the fibrous component digestibility was achieved by alkaline pretreatment, obtaining greater digestibility and applicability of this resource in cattle feeding (Llanes 2012).

Other strategies to increase the fibrous digestibility of highly fiber substrate are the use of fibrolytic enzymes (Gado *et al.* 2009). These types of enzymes are used in the feeding of monogastrics and ruminants

la biomasa lignocelulósica.

La modificación de las fibras del bagazo de caña mediante la acción de las enzimas lacasas, permite obtener un sustrato mas accesible y de mayor biodegradación. Los resultados de la digestibilidad *in vitro* del bagazo pretratado se resumen en la tabla 2. Según se observa, las diferencias respecto al tratamiento control denotan claramente que el proceso degradativo fue efectivo para mejorar la calidad nutritiva de esta fuente fibrosa.

Vargas y Pérez (2018) plantearon que el empleo del bagazo de caña de azúcar se afecta por su baja digestibilidad, lo que constituye la razón fundamental para la aplicación de procesos de predigestión que permitan mejorar su calidad nutritiva. Estos pretratamientos varían desde el empleo de álcalis como el hidróxido de sodio hasta el empleo de métodos físicos con alto consumo energético que pueden llegar a incrementar la digestibilidad hasta 60 %.

Lagos y Castro (2019) informaron que el bagazo de caña de azúcar a diferencia de la caña integral, presenta mayor contenido de fibra por lo que su digestibilidad es menor (alrededor de 25 %). Estos autores señalaron que el empleo de esta fuente fibrosa en la alimentación animal necesita la incorporación de diferentes metodologías y procedimientos que mejoren su bioconversión y extiendan su uso. En Veracruz, México, se desarrolló un alimento predigerido a partir del bagazo de caña de azúcar para alimentación

species and allow a better utilization of these sources.

In ruminant species, fibrolytic enzymes are used mainly as additives in cattle feed, where they present important results by increasing the digestibility of fiber, improving the efficient use of energy from pastures and reducing the costs of diets (Mendoza 2000). In monogastric species, the addition of fibrolytic enzymes allows altering the structure of the cell wall and improving the utilization of the fibrous fraction of the nutrients. According to Aranda *et al.* (2004), the fibrolytic pretreatment of alternative food sources allows increase its inclusion levels in the diets of these species. The use of fibrolytic products in animal production has an important impact in the diet optimization and nutrient assimilation, especially because fibrolytic enzymes stimulate the complex fiber degradation mechanism.

Most of the international companies that commercialize fibrolytic enzyme products, presents formulation based on cellulase, hemicellulase and xylanase enzymes, such as Grasszyme®, Alfazyme® and Fibrozyme® (Zilio *et al.* 2019). However these preparations doesn't have lignin-modifying enzymes. It is known that ligninolytic enzymes are fundamentals for accomplish the lignin rupture and bring better access to cellulose fibers. According to Lillington *et al.* (2020) the joint action of cellulolytic and ligninolytic enzymes are essential to accomplish a better degradation of fibrous substrates. For these reasons, the inclusion of laccase like enzymes in fibrolytic preparations might convert these products in much more efficient technologies.

Foliar lignolytic capacity of C. kusanoi L7 laccases on the lemon tree (Citrus aurantifolia). *C. kusanoi* L7 fungus was isolated from lemon tree, that's why the evaluation of the laccases lignolytic capacity on it constitute an example of how these enzymes are essential in the colonization and pathogenicity of the microorganism. On the other hand, it is known that enzymatic activity is affected in highly degree by substrate conditions, for that is important to evaluate different reaction environments to be sure of enzyme catalytic capacity. According to this, the evaluation of *C. kusanoi* L7 laccases on lemon tree, allows to confirm the fibrolytic ability of these enzymes.

The present study showed that *C. kusanoi* L7 laccases treatments had high differences respect to the untreated control. After spraying the enzyme, the wilting state of the leaves was observed almost immediately. After the first 24 hours (figure 2), great degradation of the leaf surface was found and after 72 hours of application, general tissue necrosis and loss of all the treated leaves were observed. Although the induced laccases differ from the native enzyme, all the treatments generated in the same level the progressive depolymerization of lignin and the consequent

animal. El incremento de la digestibilidad del componente fibroso se logró mediante el tratamiento químico alcalino, corroborándose mayor digestibilidad y aplicabilidad de este recurso en la alimentación de bovinos (Llanes 2012).

Otra de las estrategias que también se utilizan con resultados positivos en la digestibilidad de fuentes fibrosas, es el empleo de las enzimas fibrolíticas (Gado *et al.* 2009). Estas se emplean tanto en la alimentación de especies monogástricas como de rumiantes y permiten mejorar el grado de aprovechamiento del alimento.

En especies rumiantes, las enzimas fibrolíticas se emplean mayoritariamente como aditivos en la alimentación de bovinos, donde presentan importantes resultados al incrementar la digestibilidad de la fibra, mejorar el aprovechamiento eficiente de la energía de los pastos y disminuir los costos de las dietas (Mendoza, 2000). En especies monogástricas, la adición de enzimas fibrolíticas permite alterar la estructura de la pared celular y mejorar la utilización de la fracción fibrosa del alimento. Según Aranda *et al.* (2004), el tratamiento fibrolítico de fuentes alternativas de alimentación animal, permite aumentar sus niveles de inclusión en las dietas de estas especies. El empleo de productos enzimáticos fibrolíticos en la producción animal, permite no solo la optimización de las dietas sino el aprovechamiento de los nutrientes al estimular los complejos mecanismos de degradación de la fibra.

La mayoría de las compañías internacionales que comercializan productos enzimáticos fibrolíticos, presentan formulaciones basadas en enzimas celulolíticas y xilanolíticas, como es el caso de Grasszyme®, Alfazyme® y Fibrozyme® (Zilio *et al.* 2019). En cambio, en el mercado, la mayoría de estas preparaciones adolecen de enzimas modificadoras de lignina. Se conoce que las enzimas ligninolíticas son fundamentales en la despolimerización de la lignina y por lo tanto permiten mejor acceso a las fibras de celulosa. Según Lillington *et al.* (2020), la unión de la actividad celulolítica con la actividad ligninolítica es esencial para lograr mejor biodegradación de los sustratos fibrosos. Por estas razones, la inclusión de las enzimas lacasas en productos fibrolíticos, pudiera convertir estas formulaciones en tecnologías mucho más eficientes.

Capacidad lignolítica foliar de las lacasas de C. kusanoi L7 en el árbol de Limón (Citrus aurantifolia). Las hojas del árbol de limón constituyeron el sustrato de aislamiento de *C. kusanoi* L7, por lo que su actividad degradativa sobre éste, constituye un ejemplo de cómo las lacasas son fundamentales en el proceso de colonización y patogenicidad vegetal de este microorganismo. Por otra parte, se conoce que la actividad enzimática se afecta en gran medida por las condiciones del sustrato, por lo que es esencial evaluar diferentes condiciones de reacción para poder asegurar que se mantiene la capacidad catalítica de la enzima. Al respecto, la evaluación de la actividad lignolítica de las lacasas de *C. kusanoi* L7 en las hojas del árbol de limón, permite confirmar la actividad fibrolítica que poseen estas enzimas.

Se encontró que todos los tratamientos enzimáticos



Figure 2. Foliar lignolytic capacity of *C. kusanoi* L7 laccases at 24 h of treatment

degradation of the plant tissue.

It's known that *Curvularia* species, together with other species of the genera *Cladosporium*, *Alternaria*, *Epicoccum* and *Nigrospora* are known to be considered as primary degrading organisms, which proliferate as the leaves aged. Its spores accumulate on the leaf surface and remain latent until the death of plant tissues. These species are generally colonizers of most senescent leaf tissues of old trees, shrubs, and grasses; action that largely depends on its enzymatic production (Hudson 1968). Valenzuela *et al.* (2001) also stated that about 80 % of the leaf litter degradation is due to the degrading activity of the extracellular enzymes secreted by these fungi. That is why the enzymes isolation from these microorganisms assurance a great degradation capacity on these type of substrates

Conclusions

C. kusanoi L7 laccases, both native and induced, presented high ligninolytic potential. They are able of modifying lignin structure and improve nutritional quality and *in vitro* digestibility of sugarcane bagasse. These novel results lead futures investigations to *in vivo* evaluation of fibrous diets treated with laccase for animal feed. Furthermore it is presented the first evaluation of these purified enzymes in this field where the modification of non-conventional feed sources can constituted a sustainable alternative to develop the animal production.

Acknowledgments

The authors thank the Department of Agrarian, Food and Forest Sciences of the Università degli Studi di Palermo, Sicily, Italy, for the personal and material support. The authors also wish to thank the Microbiology

mostraron marcadas diferencias respecto al control sin tratar. El estado de marchitez de las hojas, se observó casi inmediatamente después de la aspersión de la enzimas. Al cabo de las primeras 24 horas (figura 2) se encontró gran degradación de la superficie foliar y luego de las 72 horas de aplicación, se observó necrosis general del tejido y la caída de todas las hojas que se sometieron al tratamiento. Aunque las lacasas inducidas difieren de la enzima nativa, todos los tratamientos enzimáticos generaron en igual medida la despolimerización progresiva de la lignina y la consecuente degradación del tejido vegetal en corto tiempo.

Se conoce que las especies de *Curvularia*, de conjunto con otras especies de los géneros *Cladosporium*, *Alternaria*, *Epicoccum* y *Nigrospora* son organismos degradadores primarios, que proliferan en la medida que las hojas envejecen. Sus esporas se acumulan en la superficie foliar y permanecen latentes hasta la muerte de los tejidos vegetales. Por lo general, estas especies son colonizadoras de la mayoría de los tejidos foliares senescentes de árboles caducifolios, arbustos y hierbas; acción que depende en gran medida de su producción enzimática (Hudson 1968). Por su parte, Valenzuela *et al.* (2001) también plantearon que cerca del 80 % de la degradación de la hojarasca se debe a la actividad degradativa de las enzimas extracelulares de estos hongos. Es por ello que las enzimas aisladas a partir de estos microorganismos presentan gran potencial de degradación de estos sustratos.

Conclusiones

Las lacasas *C. kusanoi* L7, tanto nativas como inducidas, presentan gran potencial ligninolítico. Son capaces de modificar la estructura de la lignina y mejorar la calidad nutricional y la digestibilidad *in vitro* del bagazo de caña de azúcar. Estos resultados novedosos encaminan futuras investigaciones hacia la evaluación *in vivo* de dietas fibrosas pretratadas con lacasas para su empleo en

laboratory of the Institute of Animal Science, Cuba, for the maintenance of the strains.

la alimentación de especies monogástricas y ruminantes. A su vez, se presentan las primeras evaluaciones de esta enzima en la rama de la producción agropecuaria, donde la modificación de alimentos no convencionales puede constituir una alternativa sustentable para desarrollar la producción animal.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Departamento de Ciencias Agrarias, Alimentarias y Forestales de la Università degli Studi di Palermo, Sicilia, Italia, por el apoyo personal y material. Los autores también desean agradecer al laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencia Animal, Cuba, por el mantenimiento de las cepas.

References

- Alberto, M., Valiño, C.E., Ayala, M., Folch, J.L., Sánchez, R., Tapia, I. & Albelo, N. 2018. Manual de procesos para la obtención y purificación de la casa a partir del hongo *Curvularia kusanoi* L7. No. Registro 2137-07-2018, Oficina Cubana de la Propiedad Industrial, La Habana, Cuba
- AOAC (Official Method of Analysis: Association of Official Analytical Chemists). 1995. 16th Edition. Ed. AOAC International, Arlington, Virginia, USA, ISBN: 0935584544
- Aranda, E.M., Ruiz, P., Mendoza, G.D., Marcoff, C.F., Ramos, J.A. & Elías, A. 2004. "Changes in the digestion of three varieties of sugarcane and their fiber fractions". Cuban Journal of Agricultural Science, 38(2): 137-144, ISSN: 2079-3480
- 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 (1-2): 248-254, ISSN: 0003-2697, DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Castro, M. & Martínez, M. 2015. Pig feeding with nontraditional products: fifty years of research at the Instituto de Ciencia Animal. Cuban Journal of Agricultural Science, 49(2): 189-196, ISSN: 2079-3480
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2012. InfoStat version 2012 [Windows]. Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available: <http://www.infostat.com.ar>
- Duncan, D.B. 1955. "Multiple range and multiple F test". Biometrics, 11(1): 1-42, ISSN: 0006-341X, DOI: <https://doi.org/10.2307/3001478>
- FAO. 2019. El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo. Protegerse frente a la desaceleración y el debilitamiento de la economía. Ed. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma, Italy, ISBN: 978-92-5-131600-9
- Gado, H., Salem, A., Robinson, P. & Hassan, M. 2009. "Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in dairy cows". Animal Feed Science and Technology, 154(1-2): 36-46, ISSN: 0377-8401, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2009.07.006>
- Ghoul, M. & Chebil, L. 2012. Enzymatic Polymerization of Phenolic Compounds by Oxidoreductases. In: Enzymatic polymerization of phenolic compounds by oxidoreductases. SpringerBriefs in Molecular Science. Ed. Springer, Dordrecht, Holanda. ISBN: 978-94-007-3919-2, DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-007-3919-2_1
- Goering, H.K. & Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analyses: Apparatus, reagent, procedures and some applications. In: Agriculture Handbook No. 379. Ed. U.S.D.A. Agricultural Research Service, Department of Agriculture, United States of America, p. 20
- Hudson. H.J. 1968. "The ecology of fungi on plant remains above the soil". New Phytologist, 67(4): 837-874, ISSN: 1469-8137, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1968.tb06399.x>
- Ibarra, D., Del Río, J.C., Gutiérrez, A., Rodríguez, I.M., Romero, J., Martínez, M.J. & Martínez, A.T. 2004. "Isolation of high-purity residual lignins from eucalypt paper pulps by cellulase and proteinase treatments followed by solvent extraction". Enzyme and Microbial Technology, 35(2-3): 173-181, ISSN: 0141-0229, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmitec.2004.04.002>
- Kahar, P. 2013. Synergistic Effects of Pretreatment Process on Enzymatic Digestion of Rice Straw for Efficient Ethanol Fermentation. In: Environmental Biotechnology - New Approaches and Prospective Applications. Petre, M. (Ed.). Ed. IntechOpen Limited, London, United Kingdom, p. 65-87, ISBN: 978-953-51-5354-2, DOI: <https://doi.org/10.5772/54949>
- Lagos, E. & Castro, E. 2019. "Sugar cane and by-products of the sugar agro-industry in ruminant feeding: A review". Agronomía Mesoamericana, 30(3): 917-934, ISSN: 2215-3608, DOI: <https://doi.org/10.15517/am.v30i3.34668>
- Lillington, P., Leggieri, P., Heom, K. & O'Malley, M. 2020. "Nature's recyclers: anaerobic microbial communities drive crude biomass deconstruction". Current Opinion in Biotechnology, 62: 38-47, ISSN: 0958-1669, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.08.015>
- Liu, H., Wu, Z., Zeng, G., Huang, D., Shen, Y., He, X., Lai, M. & Yibin, Y. 2014. "Study on biodegradation process of lignin by FTIR and DSC". Environmental Science Pollution Research, 21: 14004-14013, ISSN: 0944-1344, DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3342-5>

- Llanes, D. 2012. Desarrollo técnico-económicamente viable de harinas forrajeras predigeridas y enriquecidas proteicamente a partir del bagazo de caña de azúcar. MSc. Thesis. Instituto Politécnico Nacional, Altamira, México, Available: <<http://repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/16125>>
- López, L.M., Pereda, I., Escobar, R., Pedraza, J. & Romero, O. 2018. "Efecto de la aplicación de métodos de pretratamientos en el proceso de digestión anaerobia de la biomasa lignocelulósica". *Tecnología Química*, 38(2): 324-334, ISSN: 2224-6185
- Marrero, A.I., Dihigo, L.E., Savón, L., Machín, L. & Orta, M. 1998. "Uso del contenido fecal del cerdo para determinar *in vitro* la digestión de la fibra dietética en pollos de ceba". *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 32(2): 177-181, ISBN: 959-16-037-9
- Mattinen, M.L., Kruus, K., Buchert, J., Nielsen, J.H., Andersen, H.J. & Steffensen, C.L. 2005. "Laccase-catalyzed polymerization of tyrosine-containing peptides". *The FEBS Journal*, 272(14): 3640–3650, ISSN: 1742-464X, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04786.x>
- Mehandiaa, S., Shailendra, S. & Arya, K. 2020. "Isolation and characterization of an alkali and thermostable laccase from a novel *Alcaligenes faecalis* and its application in decolorization of synthetic dyes". *Biotechnology Reports*, 25(e00413): 1-9, ISSN: 2215-017X, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00413>
- Mendoza, M.G.D. 2000. Uso de enzimas exógenas en la alimentación de rumiantes. In: *Memorias del VIII Congreso Internacional de Nutrición Animal*, Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, México, p.3-14.
- Munk L., Sitarz, A.K., Kalyani, D.C., Mikkelsen, J.D., Meyer, A.S. 2015 "Can laccases catalyze bond cleavage in lignin?" *Biotechnology Advances*, 33(1): 13-24, ISSN: 0734-9750, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.008>
- Mwaikambo, Y. & Ansell, P. 2011. "Chemical modification of hemp, sisal, jute, and kapok fibers by alkalization". *Journal of Applied Polymer Science*, 84(12): 2222-2234, ISSN: 1097-4628, DOI: <https://doi.org/10.1002/app.10460>
- Oliva, T., Moreno, A.D., Demuez, M., Ibarra, D., Pejó, E.T, González, C.F. & Ballesteros, M. 2015. "Unraveling the effects of laccase treatment on enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw". *Bioresour Technol*, 175: 209–215, ISSN: 0960-8524, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.086>
- Perna, V., Agger, J.W., Holck, J. & Meyre, A.S. 2018. "Multiple Reaction Monitoring for quantitative laccase kinetics by LC-MS". *Scientific Reports*, 8: 8114- 8122, ISSN: 2045-2322, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26523-0>
- Pinos, S., Rojas, C.A., Mesa, M., Londoño, L., Villavicencio, P., Montoya, J. & González, E. 2019. "Obtención de celulasas en Ecuador para la disminución de gastos en enzimas en la hidrólisis de bagazo". *Centro Azúcar*, 46(1): 18-28, ISSN: 2223-4861
- Sun, Y. & Cheng, J. 2002. "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review". *Bioresour Technol*, 83(1): 1–11, ISSN: 0960-8524, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Valenzuela, E., Leiva, S. & Godoy, R. 2001. "Seasonal variation and enzymatic potential of microfungi associated with the decomposition of *Nothofagus pumilio* leaf litter". *Revista Chilena de Historia Natural*, 74(4): 737-749, ISSN: 0717-6317, DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2001000400001>
- Vargas, Y.A. y Pérez, L.I. 2018. "Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente". *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 14(1): 59-72, ISSN: 2500-5316, DOI: <https://doi.org/10.18359/rfcb.3108>
- Wang, L.Y., Cheng, G.N & May, A.S. 2014. "Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production". *Biomass and Bioenergy*, 67: 319-338, ISSN: 0961-9534, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.013>
- Xu, F., Sun, J.X., Sun, R.C., Fowler, P. & Baird, M.S. 2006. "Comparative study of organosolv lignins from wheat straw". *Industrial Crops and Products*, 23(2): 180-193, ISSN: 0926-6690, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2005.05.008>
- Xu, Y. Miladinov, V. & Hanna, M.A. 2004. "Synthesis and Characterization of Starch Acetates with High Substitution". *Cereal Chemistry*, 81(6): 735-740, ISSN: 0009-0352, DOI: <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2004.81.6.735>
- Zhao, C., Xie, B., Zhao, R. & Fang, H. 2019. "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*, 130: 281-289, ISSN: 0960-1481, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.06.080>
- Zilio, C, Del Valle, A., Ghizzi, G, Takiya, S., Dias, S.S., Nunes, T., Silva, G. & Rennó, P. 2019. "Effects of exogenous fibrolytic and amylolytic enzymes on ruminal fermentation and performance of mid-lactation dairy cows". *Journal of Dairy Science*, 102(5): 4179-4189, ISSN: 0022-0302, DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2018-14949>

Received: January 15, 2020

Accepted: March 29, 2020