

Evaluación de la producción de lacasa por *Ganoderma parvulum* y *Lentinus crinitus* y su posible efecto en polímeros de Etilen-Vinil Alcohol (EVOH), mediante fermentación en estado sólido con residuos agroindustriales

Evaluation of laccase production by *Ganoderma parvulum* and *Lentinus crinitus*, and its possible effect in (Ethylene vinyl Alcohol) EVOH polymers using solid state fermentation with three agro-industrial waste

Paula Andrea Bautista Z. ⁺, Sergio David Briceño R. ⁺, Leidy Carolina Monroy G. ⁺,
Xiomara Lopez-Legarda. ^{*}

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Los residuos agroindustriales son una alternativa económica y amigable con el ambiente para el crecimiento de basidiomicetes que producen lacasa, la cual degrada plásticos como el EVOH (Etilen-Vinil-Alcohol). El propósito de proyecto fue determinar el mejor sustrato, hongo y tiempo para la producción de lacasa y EVOH, utilizando fermentación en estado sólido.

MATERIALES Y MÉTODOS

La fermentación en estado sólido se realizó con 60 g de sustrato, 80% de humedad y temperatura ambiente por siete semanas. A la cuarta y séptima semana se tomaron muestras para determinar la actividad enzimática de lacasa utilizando la técnica del 2,2'-Azino Bis-(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid (ABTS) como sustrato específico. Los resultados se analizaron por un ANOVA multifactorial y la prueba LSD (Least significant difference) para determinar diferencias estadísticas significativas.

RESULTADOS

Las actividades enzimáticas obtenidas por *G. parvulum* en cáscara de naranja fueron en promedio 9524,1 U/L y 3580,5 U/L, tamo de arroz 2393,3 U/L y 1644,2 U/L, tusa de maíz 5274,1 U/L y 3858,4 U/L, para la semana cuatro y siete respectivamente. En cuanto a *L. crinitus*, la actividad enzimática en cáscara de naranja fue 12816,2 U/L y 2970,9 U/L, en tamo fue de 3519,6 U/L y 3844,3 U/L, en tusa fue de 7017,5 U/L y 7151,2 U/L, para la semana cuatro y siete respectivamente. adquirieron una tonalidad amarilla y presencia de micelio

CONCLUSIÓN

La mayor actividad enzimática fue con *L. crinitus* en cáscara de naranja a la cuarta semana, seguido por *G. parvulum* las mismas condiciones.

PALABRAS CLAVE

Enzimas ligninolíticas, EVOH, fermentación en estado sólido, hongos basidiomicetes, lacasa, residuos agroindustriales.

⁺ Estudiantes microbiología industrial y ambiental, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia ^{*} Asesora de trabajo de grado, Microbióloga Industrial y Ambiental, Msc en Biotecnología, candidata PhD Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Investigadora y Docente, Universidad de Antioquia. Contacto xiomara.lopezl@udea.edu.co

ABSTRACT

INTRODUCTION

Agro-industrial waste is an eco-friendly alternative, used to grow basidiomycetes with the capability of ligninolytic enzyme production, which could degrade EVOH (Etilen-Vinil-Alcohol). The purpose of this work is to determine the best substrate, fungi and time that allows the best enzymatic activity of laccase and its possible application in EVOH biodegradation, using solid state fermentation.

MATERIALS AND METHODS

Solid state fermentation was performed with 60 g of substrate, 80% of humidity at room temperature for seven weeks. Samples were taken in the fourth and seventh week, to determine enzymatic activity of laccase using 2,2'-Azino Bis-(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid (ABTS) as a specific substrate. Results were analyzed with a multifactorial ANOVA and LSD (Least significant difference) test.

RESULTS

The enzymatic activities with *G. parvulum* in orange peel were 9524,1 U/L and 3580,5 U/L, in rice chaff 2393,3 U/L and 1644,2 U/L, in corn cob 5274,1 U/L and 3858,4 U/L for the fourth and seventh week, respectively. In the case of *L. crinitus* the enzymatic activities in orange peel were 12816,2 U/L and 2970,9 U/L, in rice chaff 3519,6 U/L and 3844,3 U/L and in corn cob 7017,5 U/L and 7151,2 U/L for the fourth and seventh week, respectively. At the end of the treatment, changes were observed in the morphology of the plastics such as rough surfaces, they acquired a yellow hue and the presence of mycelium adhered to the polymer.

CONCLUSIONS

The best enzymatic activity was obtained with *L. crinitus* in orange peel, at the fourth week, followed by *G. parvulum* in the same conditions. Morphological changes observed in the polymer with respect to the control, suggest that the mycelium and ligninolytic enzymes had an effect on the surface of the polymer.

KEY WORDS

Agroindustrial waste, basidiomycetes, EVOH, ligninolytic enzymes, laccase, solid state fermentation.

INTRODUCCIÓN

Los residuos agroindustriales son materiales líquidos o sólidos, que se generan después de la cosecha agrícola, los cuales pueden incluir frutos o productos que no cumplieron los estándares de calidad y residuos de las plantas que ya fueron cosechadas. Este tipo de residuos ha ido en aumento debido a que hay una mayor demanda de alimentos, por el aumento en la población [1]. La generación de estos residuos en Colombia es muy alta, especialmente a partir de productos como: café, arroz, plátano, maíz, aceite de palma, naranja y caña de azúcar, los cuales generan aproximadamente 71'943.813 t/año de residuos [2]. Además se estima que la producción de residuos lignocelulósicos es de 1 a 10 toneladas por hectárea de cultivo, y en Colombia el área cultivada era de aproximadamente 5'121.508 hectáreas en 2016 [3], lo que indica

que la cantidad de residuos lignocelulósicos generados a nivel nacional, podrían superar una cantidad de 51'215.080 toneladas por cosecha.

La cáscara de naranja, el tamo de arroz y la tusa de maíz componen gran parte del porcentaje de los residuos producidos en el país. En el año 2017 a nivel nacional hubo una producción de maíz de 1 '247.772 t, por lo que de tusa de maíz se habrían generado alrededor de 623.886 t [4][5]. Mientras que en el año 2014, la producción de maíz en el departamento de Antioquia fue de 49.203 toneladas al año, dando una generación aproximada de 13.298 toneladas de tusa al año [6][7]. Por otro lado, se ha estimado que para una producción de 2'530.000 t de arroz a nivel nacional para el año 2019, se generaron alrededor de 1'391.500 t/año de residuos de tamo [8][9]. También se ha estimado que, para una producción de 15 a 20 millones de naranjas, se generaron alrededor de 15 a 25 toneladas semanales de residuos de cáscara de naranja [10].

Aunque la mayoría de los residuos agrícolas se pueden reutilizar, muchos, como los residuos lignocelulósicos, no son aprovechados, desencadenando la acumulación de los mismos en los rellenos sanitarios. Entre las pocas alternativas disponibles para el manejo de estos residuos, está la quema de los mismos en la parcela donde se producen, generando gases de efecto invernadero y deterioro del suelo donde fueron incinerados [1] [11]. Cuando no son quemados, se suelen desechar en diferentes matrices ambientales, ocasionando contaminación del suelo, del aire y por escorrentía pueden causar la contaminación de las fuentes de agua [2].

La generación y acumulación de estos residuos induce a la necesidad de buscar alternativas para su aprovechamiento, entre las opciones para reutilizarlos y revalorizarlos, se encuentra usarlos como sustrato para el crecimiento de hongos ligninolíticos. Dentro de éstos, se encuentra un grupo de hongos basidiomicetes conocidos como hongos de la podredumbre blanca de la madera, los

cuales pueden utilizar como sustrato la lignina presente en este tipo de residuos, además de los carbohidratos que también contienen, como se puede observar en la tabla 1. En este grupo de hongos, podemos encontrar géneros como *Ganoderma* sp., y *Lentinus* sp., los cuales poseen enzimas que son capaces de degradar este tipo de materiales [15][16].

Tabla 1. Porcentaje de lignina y carbohidratos de los sustratos agroindustriales [12], [13], [14]

Sustrato	Componente	Porcentaje
Naranja	Carbohidratos	62,70%
	Lignina	7%
Tusa de maíz	Celulosa	10,50%
	Lignina	28%
Tamo de arroz	Celulosa	32,02%
	Lignina	35%

Estos hongos son capaces de producir enzimas ligninolíticas como manganoso peroxidasa (MnP) y lacasa, las cuales tienen una aplicación potencial en la industria del papel, principalmente en el proceso de deslignificación durante el blanqueo, así como también en la extracción de jugos, aromas, aceites y pigmentos en la industria alimentaria [17][18]. Adicionalmente, estas enzimas se pueden aprovechar en procesos de biorremediación de suelos y aguas,

así como también en la de degradación de colorantes debido a que tienen una baja especificidad del sustrato, permitiéndoles oxidar además de lignina, gran variedad de compuestos recalcitrantes y entre ellos, los plásticos [17][19]. Éstos han sido el centro de atención en las últimas tres décadas, debido a que el uso de los plásticos se ha diversificado e incrementado considerablemente por sus propiedades fisicoquímicas, las cuales permiten que sean fuertes, livianos, que perduren estables por largos periodos de tiempo, que tengan resistencia al agua y a la colonización de microorganismos, todo con un bajo costo de producción, dándoles ventaja de preferencia para consumidor sobre otros materiales [20].

Uno de los plásticos más utilizados como empaque de alimentos es el Etilen-Vinil-Alcohol (EVOH), el cual es un copolímero de polietileno (PE) y alcohol polivinílico (PVOH), y posee características que le permiten ser una barrera a los gases, ser resistente a la permeabilidad de los sabores, además de buenas propiedades mecánicas, generando un aumento en el tiempo de almacenamiento de los alimentos

empacados en este polímero por lo que en los últimos años su producción y consumo se ha visto aumentado considerablemente [21], con una producción en EEUU de 58.000 t/año en 2018 y de 45.000 t/año en otros países [22].

El incremento en la producción de EVOH también aumenta la acumulación de sus desechos, debido a que la degradación óptima del mismo requiere largos periodos de tiempo. Su acumulación en el suelo impide el paso de agua y aire, causando una disminución en la cantidad del agua subterránea y afectando también la microbiota del suelo, además su acumulación en ambientes terrestres y acuáticos ocasionando que los animales lo consuman, causando su muerte y generando problemas en la red trófica [23]. Una forma muy utilizada para controlar la cantidad acumulada de plástico, es por medio de la quema, produciendo gases de efecto invernadero, los cuales no solo incrementan el problema de calentamiento global, sino que pueden generar afecciones a la salud por la naturaleza tóxica de los mismos [24].

Debido a la preocupación global que hay sobre el control de los residuos de plástico, se han generado diversos estudios en donde se evalúa la capacidad de los hongos de la podredumbre blanca para degradar estos polímeros, debido a que su complejo enzimático permite la degradación de polímeros complejos, especialmente si se induce su producción con sustratos con presencia de lignina [25]. Además de esto el EVOH es un material conformado por Polivinilalcohol (PVOH) el cual es susceptible a ser degradado lo que permitirá continuar con la biodegradación del polímero [26]. Especies endógenas de la región andina colombiana como *Ganoderma parvulum* y *Lentinus crinitus*, presentan una opción interesante debido a que pertenecen a géneros reconocidos por su alta producción de enzimas ligninolíticas y adicionalmente al ser cepas aisladas del departamento de Antioquia, permite el aprovechamiento biotecnológico de todos los beneficios que la diversidad colombiana puede ofrecer. Sin embargo, en la actualidad aún hay carencias en la información sobre la biodiversidad fúngica colombiana y

sus metabolitos, ya que según el Sistema para la Investigación de Biodiversidad (SIB) en Colombia, hasta el momento sólo hay 3.333 especies de hongos reportadas [29] lo cual es una cifra pequeña para la cantidad de hongos que se estiman, teniendo en cuenta que Colombia es considerado el segundo país más biodiverso del mundo [30]. Por lo anterior, se hace necesario el estudio de la diversidad fúngica del país, aprovechándola a nivel biotecnológico, y de igual forma, que permita apreciar los recursos naturales y favorecer la conservación de las especies. El grupo de investigación Biopolimer de la Universidad de Antioquia ha tenido trayectoria en los últimos años en investigaciones con hongos endógenos de la región andina y sus metabolitos, los cuales indican que estos hongos son promisorios a nivel industrial y ambiental [26][27][28]]. Por lo anterior, y con el fin de utilizar hongos endógenos de Colombia, el propósito del proyecto fue determinar el mejor sustrato, hongo y tiempo para la producción de lacasa y sus posibles aplicaciones en la biodegradación de EVOH, utilizando fermentación en estado sólido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Experimental

Preparación del sustrato

Los residuos agroindustriales (cáscara de naranja, tusa de maíz y tamo de arroz) fueron suministrados por algunos establecimientos de la plaza minorista José María Villa en la ciudad de Medellín. La cáscara de naranja y la tusa de maíz se lavaron, se dejaron secar por 1 semana al sol y se trituraron y se pasaron por diferentes tamices para obtener un tamaño de partícula menor a 1 cm, con el fin de usar partículas con un tamaño que facilitara el intercambio de gases. El tamo de arroz se lavó, se secó en la estufa a $60 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas.

Adicionalmente, se realizó un ensayo preliminar de retención de agua por cada sustrato, y así tenerla en cuenta en el cálculo del porcentaje de la humedad.

Preparación de las películas de EVOH

Las películas de EVOH, se cortaron en cuadrados de 3x3 cm, se marcó el centro de cada película por lado y lado para reconocer los puntos de medición de calibre antes y después del montaje, se le asignó un número para diferenciarlas, se colocaron en estufa a $60 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas para retirar la humedad, posterior a esto se realizó la medición del calibre y peso inicial. Finalmente, se expusieron las películas a la luz UV por 45 min por lado y lado como pretratamiento físico para esterilizar y generar debilitamiento en la superficie del polímero.

Preparación del inóculo

Se usaron los hongos *G. parvulum* HUA-191249 y *L. crinitus* HUA-19121, depositados en el herbario de la Universidad de Antioquia y pertenecientes al cepario del grupo de investigación BIOPOLIMER, de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias de la Universidad de Antioquia. Éstas fueron producto de un trabajo de bioprospección realizado

previamente por el mismo grupo de investigación en el departamento de Antioquia, gracias al “Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados número 235” otorgado por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible a la Universidad de Antioquia. Las cepas de los hongos se inocularon en agar Kirk y se dejaron crecer a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, en oscuridad por 7 días.

Fermentación en estado sólido

La implementación de sustratos como los residuos lignocelulósicos, en un medio de cultivo sólido, permite mayor colonización del hongo que otro tipo de fermentación, como la fermentación sumergida, además favorece la producción de enzimas, de igual forma se ha reportado que el uso de medios sólidos permite mayor producción de metabolitos secundarios, como las enzimas. Adicionalmente este tipo de fermentación permite un acercamiento realista a la degradación de residuos sólidos como los plásticos [31][32][33], por ello se decidió utilizar esta forma de cultivo, para garantizar la mayor producción de enzimas.

Las fermentaciones en estado sólido (FES) se llevaron a cabo en frascos de vidrio con una boca ancha y una tapa rosca de plástico, a la cual se le abrió un orificio circular de 3 cm^2 , el cual estaba sellado con gaza y micropore para facilitar la transferencia de gases sin comprometer la esterilidad del medio.

Se pesaron 60 g del residuo agroindustrial y se traspasaron al frasco de vidrio. A estos se les adicionó el agua necesaria para alcanzar una humedad del 80% y se realizó una marca en el recipiente para mantener el nivel de agua constante durante todo el tiempo de la FES. Luego se esterizaron en autoclave por 15 minutos, a 121°C y 15 libras de presión. Se adicionaron 4 películas de EVOH por cada tratamiento, asegurando que éstas quedarán distribuidas por todo el medio. Los tratamientos se inocularon con 4 plugs de 5 mm de diámetro del hongo sembrado previamente en agar Kirk y se depositaron sobre el sustrato, manteniendo las condiciones asépticas. El tiempo de fermentación

se llevó a cabo en un periodo de 7 semanas a temperatura ambiente.

Cada uno de los hongos con cada uno de los sustratos conformó un tratamiento que se realizó por triplicado. Adicionalmente se emplearon controles negativos que corresponden al sustrato sin inocular y películas de plástico, además de un control positivo que correspondía al hongo con el sustrato sin películas de plástico.

Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática de lacasa de cada tratamiento, se determinó tomando muestras de 1 mL en la cuarta y séptima semana, se centrifugaron a 4.000 rpm por 10 minutos. En este caso se utilizó como sustrato el 2, 2'-Azinobis-3-etil-benzo-tiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS), leyendo la actividad enzimática a 420 nm, siguiendo el método reportado por Paszczyński & Crawford [34], considerando un aumento en la pendiente del perfil enzimático como resultado positivo.

Determinación cualitativa y cuantitativa de los cambios físicos de las películas de EVOH

Al terminar el tiempo de fermentación, se retiraron los plásticos, se lavaron con ayuda de agua desionizada para retirar restos del sustrato y micelio. Luego se colocaron en una solución de agua tipo I y SDS (dodecil sulfato sódico) al 2%, con agitación a 120 rpm en un shaker por 12 horas, una vez cumplido este tiempo, se trasladaron a agua desionizada y se dejaron en las mismas condiciones anteriormente descritas. Finalmente se colocaron en la estufa a $60 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta peso constante. Posterior al secado, se procedió a la determinación del peso y calibre finales, para poder determinar si hubo pérdida de peso o disminución del calibre por diferencia con los datos iniciales. Adicionalmente se observaron los cambios físicos en las películas.

Para determinar cualitativamente los cambios físicos observados en las películas, se utilizó una escala, que clasifica en niveles la intensidad de color amarillo tomada por las mismas,

que va de 0 a 3, siendo el primero sin color y el último con un color muy amarillento. De igual forma, para la textura rugosa, se estableció otra escala, que clasificaba los plásticos en normal, arrugado y muy arrugado. Adicionalmente se determinó si en las películas había presencia de micelio, un ejemplo de cada una de las escalas se muestra en la tabla 2.










Diseño experimental y estadístico

Para determinar la actividad enzimática, se realizó un diseño factorial, el cual tenía 3 factores, los cuales eran el tipo de hongo, tipo de sustrato y la semana a evaluar, cada

uno con dos niveles a excepción del tipo de sustrato que tenía tres niveles.

Los resultados obtenidos de la FES después de la cuarta y séptima semana para cada tratamiento, se compararon por medio de un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial con un alfa del 0,05. Adicionalmente, se evaluó si las interacciones entre los factores tuvieron significancia. Los análisis se hicieron por triplicado y también se realizaron pruebas de normalidad, independencia y varianza constante para garantizar que los datos tuvieran una correcta distribución del error.

Tabla 2. Escala de las características elegidas para evaluar los cambios cualitativos en las películas de EVOH.

Característica	Niveles			
	0	1	2	3
Color				
Micelio	Sí		No	
				
Textura	Normal	Arrugada	Muy arrugada	
				

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento de los hongos durante FES

Al realizar el seguimiento a los cultivos fúngicos, se logró destacar diferentes

etapas y cambios importantes. Se pudo observar que al inicio del cultivo, los hongos comenzaron a desarrollar su micelio blanco y algodonoso característico [35] (Fig. 1 a,c), tomando este inicio como referencia para realizar las comparaciones

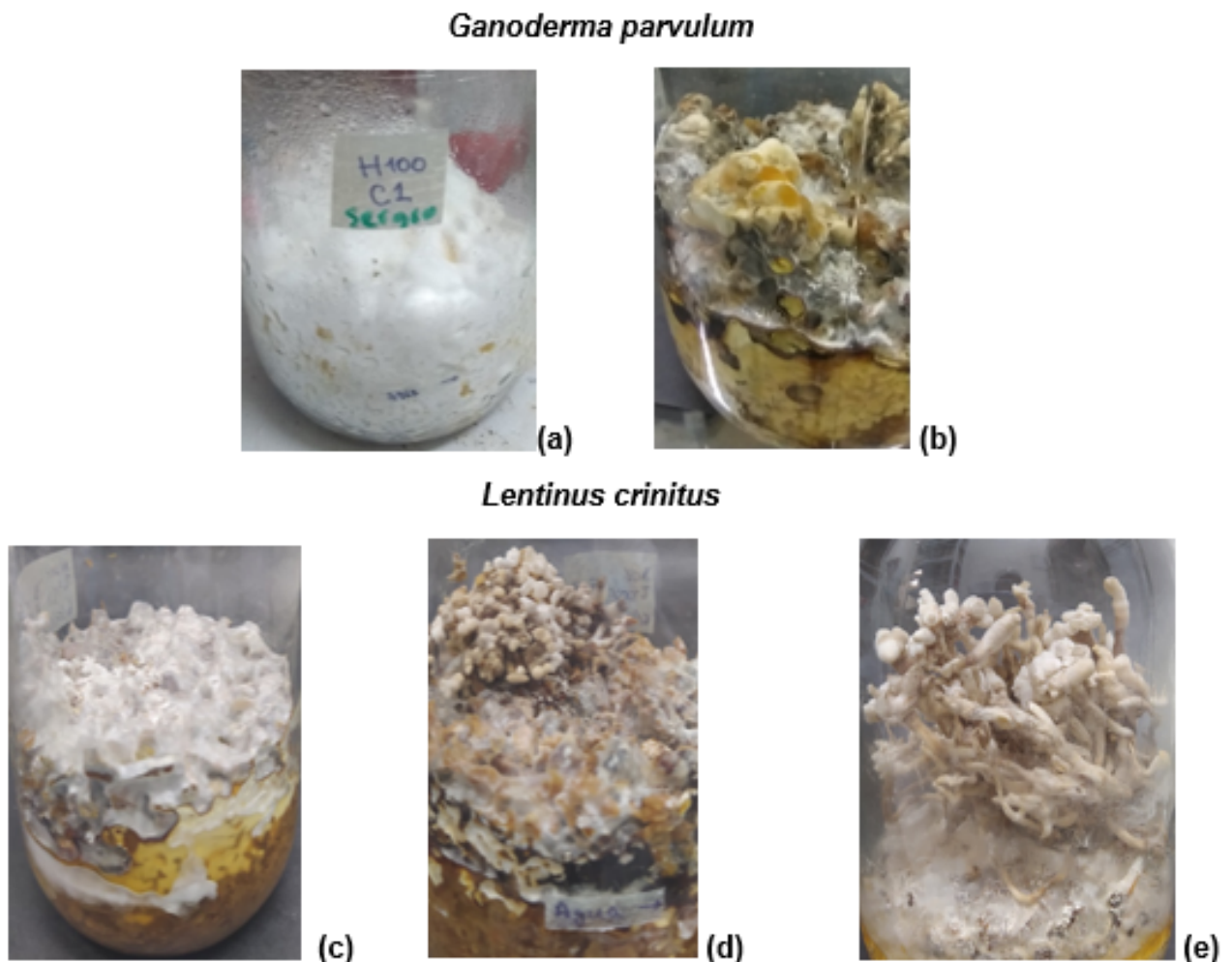


Figura 1. Crecimiento de los hongos durante el tiempo de cultivo. (a) Crecimiento blanco y algodonoso de *G. parvulum* durante la primera semana, en cáscara de naranja (b) Coloración amarillenta tomada por *G. parvulum* a partir de la tercera semana, en cáscara de naranja (c) Crecimiento blanco y algodonoso de *L. crinitus* en cáscara de naranja (d) aparición de los primordios de *L. crinitus* a partir de la semana 4, en cáscara de naranja (e) Basidiocarpio desarrollado por *L. crinitus* al finalizar el montaje, en cáscara de naranja

observadas en las semanas siguientes a la inoculación.

Por otro lado, entre la cuarta y quinta semana, en los tratamientos con naranja y *L. crinitus*, se evidenció la aparición de primordios (Fig. 1 d). A la séptima semana, el basidiocarpo ya se encontraba mucho más desarrollado (Fig. 1 e). Sin embargo, en los tratamientos con los otros sustratos, no se evidenció la formación de basidiocarpo o primordios, durante las 7 semanas.

En cuanto a *G. parvulum*, no se evidenció el desarrollo de basidiocarpo, sólo el crecimiento del micelio blanquecino y color amarilloso a partir de la tercera semana (Fig 1 b), durante las 7 semanas que duró el tratamiento.

Es importante resaltar que, para ambos hongos, se evidenció un cambio en los líquidos exudados, teniendo mayor coloración y presencia de partículas suspendidas a medida que pasaba el tiempo. Esto puede ser un indicador de la producción de metabolitos secundarios, debido a que se ha reportado que la acumulación de

los mismos puede aumentar la viscosidad del medio y que este aumento no solo se da por el aumento en el micelio de los hongos [36].

Actividad enzimática de lacasa

Para analizar la actividad enzimática, se tomaron dos puntos durante el crecimiento del hongo, uno en la semana donde se evidenció la aparición de primordios, es decir la cuarta, y al finalizar el tratamiento, debido a que se ha reportado que la producción de enzimas ligninolíticas podría disminuir una vez comienza la formación del basidiocarpo [37]. Adicionalmente, se decidió tomar estos dos puntos en el tiempo, debido a que la mayoría de estudios reportados tienen un tiempo máximo de 4 semanas y por estudios previos realizados, se había determinado que alrededor de este tiempo se podía evidenciar el pico máximo de producción de lacasa. Se realizó un ANOVA multifactorial, con el tiempo, sustrato y hongos como factores y un $\alpha < 0,05$, para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos, por lo que se pudo determinar que hubo diferencias entre

los sustratos ($p = 0,00002$), el tiempo ($p = 0,0145$) y los hongos ($p = 0,0109$).

Por medio de la prueba LSD de Fisher, se analizaron los tres factores, donde se evidenciaron diferencias significativas, con un intervalo de confianza del 95 %, los resultados obtenidos muestran que el hongo que produjo mayor actividad enzimática fue *L. crinitus*, que el mejor sustrato para cada hongo fue cáscara de naranja, seguida por tusa de maíz y tamo de arroz y que la semana 4 fue donde se obtuvo mayor actividad enzimática en el caso de *G. parvulum* en todos los sustratos, mientras que para *L. crinitus* solo en naranja, se obtuvo mayor actividad enzimática, mientras que para tusa y tamo, la mejor actividad se obtuvo en la semana 7.

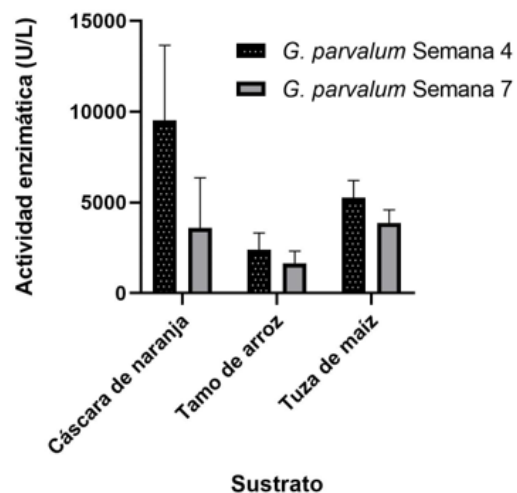
En los análisis de ANOVA se pueden evidenciar también en la gráfica 1 y tabla 3, donde se observó que el mayor pico de actividad enzimática se obtuvo en la semana 4 por *L. crinitus* con la cáscara de naranja como sustrato, seguido por *G. parvulum* en el mismo tiempo y sustrato. Por otro lado, para *G. parvulum*, el segundo sustrato con el que se obtuvo mayor

actividad enzimática fue la tusa de maíz en la semana 4 y finalmente tamo de arroz en la misma semana, mientras que *L. crinitus*, tuvo mayor actividad enzimática en tusa de maíz y tamo de arroz en la semana 7.

Tabla 3. Promedio de las actividades enzimáticas por cada hongo, en las semanas 4 y 7

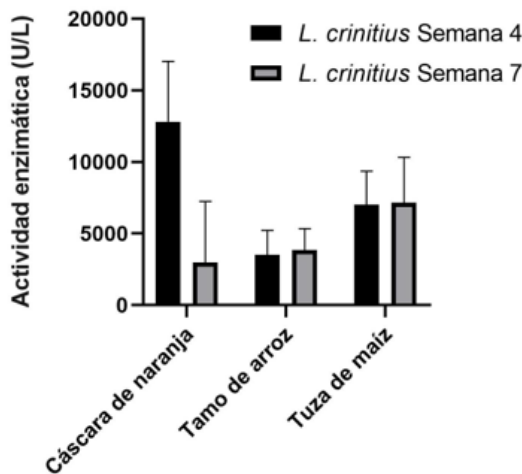
Hongo	Sustrato	Promedio actividad enzimática (U/L)	
		Semana 4	Semana 7
<i>G. parvulum</i>	Cáscara de naranja	9524,1	3580,5
	Tamo de arroz	2393,3	1644,2
	Tusa de maíz	5274,1	3858,4
<i>L. crinitus</i>	Cáscara de naranja	12816,2	2970,9
	Tamo de arroz	3519,6	3844,3
	Tusa de maíz	7017,5	7151,2

Actividades enzimáticas de *G. parvulum* en las semanas 4 y 7



Gráfica 1. Actividad enzimática de lacasa producida por *G. parvulum* en la semana 4 y 7

Actividades enzimáticas de *L. crinitus* en las semanas 4 y 7



Gráfica 2. Actividad enzimática de lacasa producida por *L. crinitus* en la semana 4 y 7

Al analizar las interacciones entre los factores, se determinó que la interacción entre el tiempo y el sustrato es significativa ($p=0,0208$), indicando que los resultados obtenidos para los sustratos varían en el tiempo.

Sin embargo, es importante resaltar que la disminución de actividad enzimática para ambos hongos entre las semanas, fue mayor con la cáscara de naranja como sustrato, a diferencia del tamo de arroz y tusa de maíz, donde la actividad enzimática tuvo menor variación con respecto al tiempo, permitiendo observar la interacción entre las semanas y el

sustrato, debido a que en la semana 7; el mejor sustrato fue la tusa maíz.

La actividad enzimática obtenida en la cáscara de naranja, se puede relacionar con los resultados del crecimiento del hongo, dado que en ella el crecimiento de los hongos fue más rápido que en los otros sustratos. Esto se puede deber a que, la cáscara de naranja contiene un mayor porcentaje de carbohidratos (tabla 1), por ende, una mayor cantidad de nutrientes con menor complejidad y con facilidad para su uso, lo que permite que su desarrollo hasta la fase estacionaria sea acelerado. Una vez en esta, el hongo puede desarrollar su metabolismo secundario, donde la producción de enzimas ligninolíticas es mayor [38]. Este comportamiento, puede no haberse evidenciado con los otros sustratos, debido a que el porcentaje de carbohidratos en su composición es menor y además estos se encuentran principalmente como celulosa (tabla 1), que al ser un polímero más complejo, hace que el hongo no lo pueda utilizar tan fácilmente, ocasionando que su crecimiento sea más lento hasta fase estacionaria, esto también se puede

evidenciar en el aumento de la actividad enzimática en *L. crinitus* en la semana 7, que en este punto está entrando en fase estacionaria.

Por otro lado, es importante resaltar que desde un inicio se ve la producción de enzimas ligninolíticas, aunque sean parte del metabolismo secundario; esto puede darse en la fase exponencial, gracias a que los hongos las producen para degradar la lignina en la parte exterior de la corteza de los árboles y poder acceder a la celulosa y hemicelulosa de la parte interior como fuente de carbono, pero no es una producción tan abundante como se puede observar en la fase estacionaria [39][40].

En cuanto al tiempo, una razón por la que se evidenció mayor actividad en la semana 4, puede deberse a que en la semana 7 la cantidad de sustrato disponible había disminuido, debido a que este ya había sido colonizado por completo (Fig. 1 a,d), haciendo que la producción de metabolitos secundarios haya disminuido [39].

L. crinitus desarrolló una mayor actividad enzimática que *G. parvulum*,

esto puede relacionarse con que este tuvo un crecimiento más acelerado, dado que colonizó el sustrato en menor tiempo, permitiéndole consumir una mayor cantidad nutrientes, agotándolos en el medio y permitiendo que entre a fase estacionaria más rápidamente. En la literatura se ha reportado que los organismos pertenecientes a este género, no suelen producir altas actividades enzimáticas, teniendo valores de 7 y 14 U/L [41]. Sin embargo, también hay reportes donde las actividades enzimáticas superan 40.000 y 32.000 U/L en solo 11 días [42], indicando que las cepas relacionadas con este género, pueden tener comportamientos diversos. En este caso específico, la cepa utilizada puede llegar a tener altas actividades enzimáticas.

Por otro lado, para hacer una comparación de la actividad enzimática máxima obtenida con los resultados reportados en la literatura, se tuvieron en cuenta los resultados de la cáscara de naranja por cada hongo, en la semana 4 (tabla 3), ya que estos son los mayores resultados obtenidos. Los estudios seleccionados

son aquellos que usan sustratos, método de fermentación y tiempo similares a los usados en el presente estudio.

En el caso reportado por Wang F. y colaboradores [43], utilizaron salvado de arroz y *Ganoderma applanatum* por 14 días, obteniendo una actividad enzimática de 4.000 U/L, siendo el resultado un 50% menor que el nuestro. Mientras que Villareal Gomez C y colaboradores [41], utilizaron cascarilla de arroz y bagazo de caña con *Ganoderma lucidum* por 26 días, obteniendo actividades de 661 U/L y 1,583 U/L respectivamente, mientras que en nuestros resultados la actividad fue 14 y 6 veces más alta respectivamente. Por otra parte, en el mismo estudio, para *Lentinus* sp., obtuvieron actividades de 7 U/L y 14 U/L, mientras que en este trabajo la actividad enzimática fue más de 1,000 veces mayor en ambos casos, por lo que se puede ver que la cáscara de naranja puede ser un sustrato ideal, debido a que permite una mayor actividad enzimática de lacasa.

Finalmente, al observar el comportamiento de la actividad

enzimática en el tiempo con los sustratos, se sugiere un estudio posterior en donde se mezcle la cáscara de naranja y la tusa de maíz, debido a que la primera permite un desarrollo más rápido del hongo y la segunda permite que la actividad enzimática se prolongue en el tiempo.

Determinación cuantitativa de los cambios físicos en las películas de plástico

Tabla 4. Resultados del análisis cualitativo de las películas de plástico

Tratamiento	Sustrato	Textura	Color	Micelio
<i>Ganoderma parvulum</i>	Cáscara de naranja	Arrugado	3	Si
		Arrugado	3	Si
		Arrugado	3	Si
	Tamo de arroz	Normal	2	Si
		Arrugado	2	Si
		Arrugado	2	Si
		Normal	2	No
	Tusa de maíz	Arrugado	0	Si
		Arrugado	3	Si
	<i>Lentinus crinitus</i>	Cáscara de naranja	Muy arrugado	1
Arrugado			2	Si
Muy arrugado			3	Si
Tamo de arroz		Arrugado	1	No
		Muy arrugado	0	No
		Muy arrugado	1	Si
		Arrugado	0	No
Tusa de maíz		Arrugado	2	No
		Arrugado	2	No
		Arrugado	2	No
Control	Cáscara de naranja	Normal	0	No
	Tamo de arroz	Arrugado	1	No
	Tusa de maíz	Arrugado	1	No

Al finalizar la FES, se retiraron las películas de plástico y se procedió a realizar el procedimiento de lavado de los polímeros, sin embargo, no fue posible retirar por completo el micelio que se encontraba en las películas sin deteriorar el estado físico de las mismas, debido a que en otros procedimientos de lavado descritos, se incluían el uso de agentes corrosivos como ácidos o el uso de compuestos de difícil acceso como los descritos por Ponce Andrade G.I y colaboradores [44].

Al no retirarse por completo el micelio presente en las películas de plástico, como se puede observar en la tabla 2, la determinación del peso y calibre final no fueron posibles, debido a que en algunos casos las películas llegaban a tener un peso y calibre mayor al inicial; impidiendo que, con los métodos disponibles, se pudiera determinar los cambios reales del plástico, evitando que se pudiera cuantificar si la enzima ligninolítica había generado algún cambio físico en las películas.

Para poder cuantificar si hubo cambios en la estructura del plástico, se podría realizar un estudio adicional, utilizando metodologías como microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar posibles variaciones en la superficie [44]. Otro análisis que se podría realizar es la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para determinar cambios en los enlaces químicos que componen la estructura del polímero, como ha reportado en Molin. N. [45]

Determinación cualitativa de los cambios físicos en las películas de plástico

Para realizar el análisis cualitativo, que permitiera hacer una estimación de los posibles efectos que tuvo la enzima sobre el polímero, se tuvieron en cuenta la clasificación de color, textura y presencia o ausencia de micelio, los cuales se presentan en la tabla 2. Es importante mencionar, que el análisis cualitativo será el que se tendrá en cuenta, debido a las dificultades presentadas en el análisis cuantitativo.

El análisis de la aparición de un color amarillento en las películas de plástico, es una característica que puede indicar la posible degradación del polímero, debido a que se ha reportado que la oxidación por enzimas ligninolíticas puede causar la aparición de este tipo de coloración. Al observar la tabla 4, se puede observar que en las películas si hubo cambios de color, en los tratamientos con ambos hongos.

En el caso de *G. parvulum*. todas las películas de los tratamientos con naranja y tamo presentaron una coloración con nivel 3, mientras que los resultados en tusa presentaron más variabilidad, yendo desde el nivel 0 al nivel 3. Teniendo en cuenta los resultados mostrados en la tabla 4 y el ANOVA realizado a las actividades enzimáticas, se esperaría que en naranja hubiera mayor aparición de color, debido a que fue el sustrato en donde se reportó mayor actividad enzimática de lacasa, mientras que en tusa y tamo no debería observarse un gran cambio de coloración. Sin embargo, los resultados obtenidos no mostraron esta tendencia, debido a

que con tamo, se observó el mismo comportamiento que en naranja, indicando que para este caso, la aparición de color puede no estar relacionada con el efecto que tiene la enzima sobre el polímero.

Por otro lado, en los tratamientos con *L. crinitus* la mayoría de los plásticos que estaban con tusa y tamo llegaron a nivel 2, mientras que en naranja los resultados fueron más variados, yendo desde el nivel 1 al 3, como se puede observar en la tabla 4. Al igual que en el caso anterior, se esperaría que en los tratamientos con naranja hubiera mayor coloración, debido a que había mayor actividad enzimática, sin embargo, estos resultados no siguieron esta tendencia, debido a que en tusa y tamo hay mayor frecuencia en la coloración 2, mostrando otra vez que puede no haber una relación directa entre la actividad enzimática y la aparición de color amarillo.

Otras posibles razones por las que se pudo dar la coloración de las películas de plástico, puede ser la presencia de pigmentos en el sustrato utilizado, aunque en el control de naranja, tamo y tusa, la película de plástico presentó

un nivel 0, 1 y 1 de coloración respectivamente (Tabla 4).

Otra posibilidad puede ser que durante el crecimiento del hongo, se liberen los pigmentos que se encuentran en el interior del sustrato, esto se pudo evidenciar principalmente en naranja, debido a que, el medio de cultivo iba tomando una coloración café amarillenta, cada vez más intensa. Sin embargo, en los tratamientos con *L. crinitus* las películas de plástico en naranja fueron las más variables a comparación de las películas con *G. parvulum* y naranja, indicando que la coloración de las películas, puede no ser atribuida a la coloración del medio.

Por otro lado, se evidenció que las películas expuestas a *G. parvulum*., fueron las que tuvieron mayor coloración, esto se puede deber a que *G. parvulum*., en ensayos realizados anteriormente donde crecía en medio mineral, presentó una coloración amarillenta en el micelio durante su crecimiento, por lo que esto puede estar relacionado a la coloración de las películas.

En cuanto a la textura de las películas expuestas a *G. parvulum*, se puede evidenciar que en naranja todas las películas resultaron arrugadas, mientras que en los otros sustratos las películas estaban entre normales y arrugadas. Al igual que en el caso anterior, se esperaba que presentarían una textura más rugosa en la cáscara de naranja, aunque los resultados tampoco siguieron esta tendencia.

En el caso de *L. crinitus* la mayoría de películas terminaron muy arrugadas, pero tampoco se pudo evidenciar mayor cambio en los tratamientos con naranja, como se esperaba.

Los cambios en la textura pueden no ser causados solamente por la actividad enzimática, otros factores que pueden influir son la textura de los sustratos o el efecto que el agua tuvo sobre la película, cuando ésta se agregaba para mantener la humedad.

También se puede evidenciar, que las películas que fueron expuestas a *L. crinitus* tenían una textura más rugosa que las expuestas a *G. parvulum*., lo que puede inferir que algún metabolito

secundario producido por *L. crinitus*, que no está presente en *G. parvulum*, causa este comportamiento, por lo que se requeriría un estudio adicional que permitiera confirmar e identificar los compuestos que causan este fenómeno.

Finalmente, en cuanto a la presencia de micelio, se puede observar que los plásticos expuestos a *G. parvulum*, en su mayoría, tenían presencia de micelio después del proceso de lavado. En cuanto a las películas expuestas a *L. crinitus*, se evidenció que en naranja y tamo había presencia de micelio, mientras que en tusa,

ninguno de los plásticos presentaron micelio.

Las películas que tenían presencia de micelio, se observaron al microscopio con un aumento de 40X y ayuda de azul metileno, al hacer estas observaciones se pudo visualizar como el micelio de ambos hongos se había desarrollado en la superficie del polímero (Fig 3 c,d). Al comparar estas imágenes con el plástico adicionado a control (Fig 3 b), no se pudo evidenciar alguna diferencia adicional en la superficie, además de la presencia de micelio.

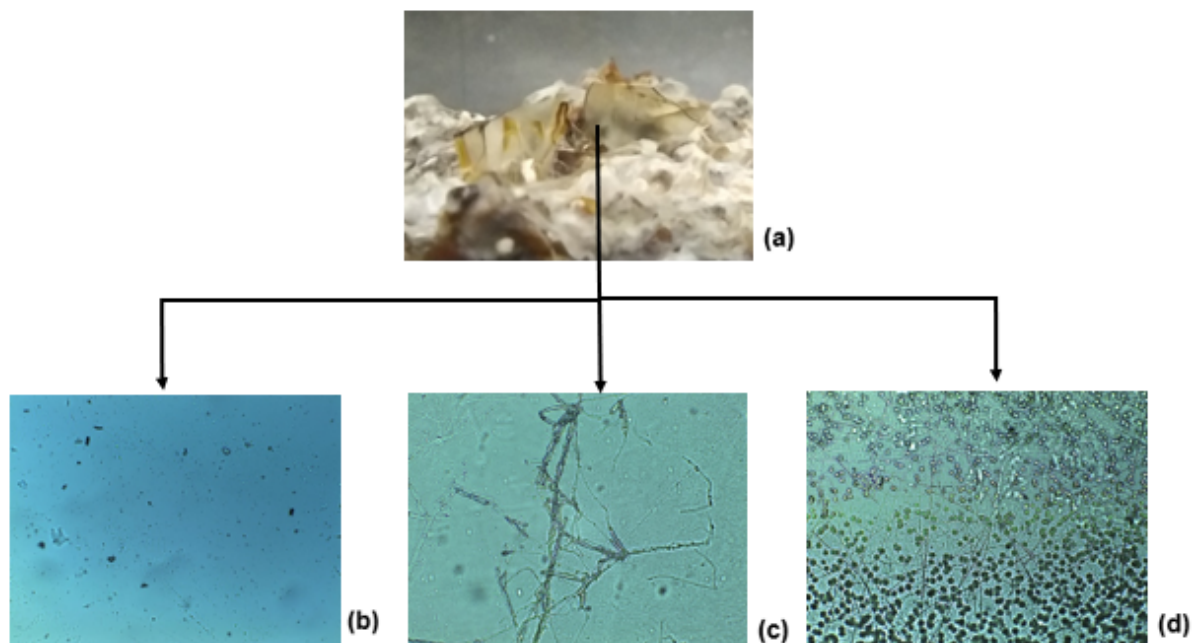


Figura 3. Imágenes de EVOH después del tiempo de inoculación. (a) El plástico antes de ser retirado del sustrato en la semana 7 (b) Vista al microscopio del a película de EVOH del control, con azul de metileno en 40X (c) Vista al microscopio de una película de EVOH con micelio de *L. crinitus* adherido, con azul de metileno en 40X (d) Vista al microscopio de una película de EVOH con micelio de *G. parvulum* adherido, con azul de metileno en 40X.

Sin embargo, la presencia de micelio que no se puede retirar fácilmente de las películas, puede ser un buen indicio de las capacidades del hongo para colonizar el plástico y degradarlo o transformarlo, por lo que se necesitarían estudios adicionales para confirmar si el micelio se encuentra en el interior de la estructura del plástico y adicionalmente si se está causando alguna perturbación al mismo.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se pudo determinar que la mayor actividad enzimática obtenida fue de *L. crinitus*, con cáscara de naranja en la semana 4, seguido por *G. parvulum* en las mismas condiciones, estos resultados se pudieron deber gracias a las características del sustrato y la cepa de *L. crinitus* utilizada, siendo esta combinación interesante para la producción de lacasa a partir de residuos agroindustriales. De igual forma se sugiere continuar estudios mezclando la cáscara de naranja y tusa para explorar el aumento de la actividad enzimática obtenida.

Por otra parte, en cuanto a los plásticos es necesario hacer estudios adicionales que permitan evidenciar si hubo efecto de las enzimas y los hongos sobre los mismos, debido a que los estudios cualitativos sólo permiten observar ciertos cambios físicos y la presencia de micelio, pero no permiten concluir si esto significa un cambio físico o químico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gestión de Calidad. Residuos agrícolas. 2016; Available from: <http://gestion-calidad.com/residuos-agricolas#:~:text=Los residuos agrarios%2C son los,o el propio producto agrícola>.
2. Molina Contreras SP, Urquijo Vela KD. Uso de residuos agroindustriales en alimentación de rumiantes y métodos para mejorar su eficiencia de uso. Universidad Santo Tomás Tunja; 2021.
3. Portafolio. Más de 47 millones de hectáreas tienen uso productivo: 2016; Available from: <http://www.portafolio.co/economia/area-cultivada-en-colombia-durante-el-2016-508508>
4. Sierra RCM. Elaboración de ensilaje a base de residuos tusa y hojas de maíz tierno con

- adición de melaza como sustrato en el proceso de fermentación para su optimización. 2020;3(1):1–8.
5. Unidad de Gestión de Riesgos Agropecuarios -UGRA. Ficha de inteligencia: Maíz Tecnificado. 2018.
 6. CIAT, CIMMYT. (2019). Maíz para Colombia visión 2030. Retrieved from <https://www.fenalce.org/archivos/maiz2030.pdf>
 7. Ministerio de agricultura y desarrollo rural. (2014). Evaluaciones agropecuarias municipales. Retrieved from <https://www.agronet.gov.co/Documents/Cultivos.pdf>
 8. Unidad de Gestión de Riesgos Agropecuarios-UGRA. Ficha de inteligencia: Cultivo de arroz. 2020.
 9. Cruz C, Gomez L, Uribe D. Manejo biológico del tamo de arroz bajo diferentes relaciones C : N empleando co- inóculos microbianos y promotores de crecimiento vegetal Bio-based management of rice straw under different C : N ratios using microbial co-inocula and plant growth promoter. Rev Colomb Biotecnol [Internet]. 2017;19:47–62.
 10. Alvarado Dávila L, Hernández Sierra AT. Revisión de alternativas sostenibles para el aprovechamiento del orujo de naranja. Rev Colomb Investig Agroindustriales. 2018;5(2):9–32.
 11. Castro-Garzon H, Contreras E, Rodriguez JP. Análisis ambiental: impactos generados por los residuos agrícolas en el municipio de El Dorado (Meta, Colombia). Rev Espac [Internet]. 2020;41(38):42–50. Available from: <https://www.revistaespacios.com/a20v41n38/a20v41n38p05.pdf>[LC1]
 12. Arroyo Gamez RO, León La Rosa RA. Densidad de carga y método de extracción en el rendimiento y calidad de aceite esencial de los flaveados de dos variedades de naranja (citrus sinensis. 2014)
 13. Díaz GAA. Determinación del sustrato de mayor eficiencia para el cultivo de Shiitake (Lentinula edodes) a partir de residuos agrícolas a escala de laboratorio. Photosynthetica [Internet]. 2018;2(1):1–13.
 14. Vargas Corredor YA, Pérez Pérez LI. Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. Rev Fac Ciencias Básicas. 2018;V(1):59–72
 15. Mir-Tutusaus, J. A., Baccar, R., Caminal, G., & Sarrà, M. (2018). Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. In Water Research (Vol. 138, pp. 137–151). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.056>

16. Bhardwaj, H., Gupta, R., & Tiwari, A. (2013). Communities of Microbial Enzymes Associated with Biodegradation of Plastics. In *Journal of Polymers and the Environment* (Vol. 21, Issue 2, pp. 575–579). <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0456-z>
17. Valdés Díaz S. Aislamiento y purificación parcial de enzimas microbianas de tipo lacasa, para la degradación de desechos de piña, banano y caña. 2018;
18. Hernández C. Estudio de la producción de enzimas lignocelulolíticas por el hongo *pleurotus ostreatus* en un biorreactor usando residuos de fruta como sustrato. 2019;
19. Quintero JC, Feijoo G, Lema JM. Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae, Rev la Fac Química Farm.* 2006;13(53):61–7.
20. Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnol Adv.* 2008;26(3):246–65.
21. Kuraray America Inc. EVAL: Incremento De La Capacidad De Producción En La Planta Europea de Kuraray [Internet]. Available from <http://www.evalevoh.com/es/company/news/150206-kuraray-re> fuerza-la-capacidad-de-producción-de-eval™-en-europa.aspx
22. KURARAY. EVAL™ EVOH de Kuraray [Internet]. 2018. p. 1. Available from: <http://www.evalevoh.com/es/company/eval™-evoh-by-kuraray.aspx>
23. Medio ambiente y Salud Pública (MASP). Situación actual de Colombia y su impacto en el medio ambiente. Green Peace [Internet]. 2019;14. Available from: http://greenpeace.co/pdf/2019/gp_informe_plasticos_colombia_02.pdf
24. Kale SK, Deshmukh AG, Dudhare MS, Patil VB. Microbial degradation of plastic : a review. 2015;6(May):952–61.
25. Roldán-Carrillo, T., Rodríguez-Vázquez, R., Díaz-Cervantes, D., Vázquez-Torres, H., Manzur-Guzmán, A., & Torres-Domínguez, A. (2003). Starch-based plastic polymer degradation by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse pith: Enzyme production. *Bioresource Technology*, 86(1), 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00142-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00142-6)
26. Arboleda, C., Segura Sánchez, F., & Mejía, A. (2007). Enzymatic Transformation Of Crystalline Structure Of Copolymer Poly (Ethylene-co-vinyl Alcohol)

- (EVOH). Vitae (Colombia) Num.1 Vol.14 (Vol. 14).
27. López-Legarda X, Arboleda-Echavarría C, Parra-Saldívar R, Rostro-Alanis M, Alzate JF, Villa-Pulgarín JA, et al. Biotechnological production, characterization and in vitro antitumor activity of polysaccharides from a native strain of *Lentinus crinitus*. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2020;164:3133–44. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020342884>
 28. López Legarda X, Arboleda Echavarría C, Segura Sanchez F. Producción de polisacáridos a partir de *Ganoderma* sp., aislado en la región andina. *Rev Colomb Biotecnol*. 2015;17(2):44–54.
 29. Biodiversidad.co. Biodiversidad en Cifras [Internet]. 2020. p. 1. Available from: <https://cifras.biodiversidad.co/>
 30. Ministerio De Ambiente y Desarrollo Sostenible. Colombia, el segundo país más biodiverso del mundo, celebra el Día Mundial de la Biodiversidad [Internet]. 2021. Available from: <https://www.minambiente.gov.co/index.php/noticias/4317-colombia-el-segundo-país-más-biodiverso-del-mundo-celebra-el-día-mundial-de-la-biodiversidad>
 31. Quintero, J. C., Feijoo, G., & Lema, J. M. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae, Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*, 13(53), 61–67.
 32. Robinson T, Singh D, Nigam P. Fermentación en estado sólido: Una tecnología microbiana promisorio para la producción de metabolitos secundarios. *Vitae, Rev La Fac Química Farm* [Internet]. 2002;9(2):27–36. Available from: <http://www.redalyc.org/pdf/1698/169818107003.pdf>
 33. Arboleda E., Carolina, Segura S., Freimar, Castrillón O., Carla C., Giraldo A., Newar Andrés, Mejía G., Amanda I., Obtención De La Enzima Ligninoperoxidasa Por Fermentación En Estado Sólido Del *Phanerochaete Chrysosporium* Sobre Capacho Y Tusa De Maíz. *Vitae* [Internet]. 2003;10(1):25-33. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169818031004>
 34. Prosser JI, Tough AJ. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. *Crit Rev Biotechnol*. 1991;10(4):253–74.
 35. Abdel-Hamid, A. M., Solbiati, J. O., & Cann, I. K. O. (2013). Chapter One - Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. In S. Sariaslani & G. M. B. T.-A.

- in A. M. Gadd (Eds.) (Vol. 82, pp. 1–28). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00001-6>
36. Robinson, .T., Singh, .D. & Nigam, .P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Appl Microbiol Biotechnol* 55, 284–289 (2001). <https://doi.org/10.1007/s00253000565>
 37. Manjarrés K, Castro A, Sandoval ER. Producción de lacasa utilizando *Pleurotus ostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña. 2010;7(2):9–15.
 38. Cepeda D. Determinación De Metabolitos Secundarios A Partir De La Cepa Nativa Cv15nd Aislada Del Páramo Cruz Verde, Departamento de Cundinamarca. Thesis. 2010;(May):1–29.
 39. Rojas Verde MG. Producción de enzimas ligninolíticas por hongos de pudrición blanca aislados en Nuevo León. 2010;222. Available from:<http://cdigital.dgb.uanl.mx/file/1080190928.PDF>
 40. Montoya S. Obtención de enzimas lignocelulolíticas y polisacáridos a partir de residuos lignocelulósicos del departamento de Caldas empleando Macromicetos de pudrición blanca por fermentación sumergida y fermentación en estado sólido. 2012; 202.[LC1]
 41. Villareal-Gomez C. Evaluación De La Actividad Lacasa De Co-Cultivos De Hongos Lignícolas Para La Deslignificación De Cascarilla De Arroz Y Bagazo De Caña. Africa's potential Ecol Intensif Agric. 2019;53(9):1689–99.
 42. Almeida PH, de Oliveira ACC, de Souza GPN, Friedrich JC, Linde GA, Colauto NB, et al. Decolorization of remazol brilliant blue R with laccase from *lentinus crinitus* grown in agro-industrial by-products. *An Acad Bras Cienc.* 2018;90(4):3463–73.
 43. Wang F, Terry N, Xu L, Zhao L, Ding Z, Ma H. Fungal laccase production from lignocellulosic agricultural wastes by solid-state fermentation: A review. *Microorganisms.* 2019;7(12).
 44. Vázquez. R, Andrade. G,I, Duhalt RV, Álvarez JAL, Ramirez IEM, 1, et al. Evidencia De La Biodegradación De Resinas Fenólicas Con Hongos Ligninolíticos Por Microscopía Electrónica De Barrido. 2012;28(2):167–81.
 45. Molina, N. Revisión Bibliográfica Sobre Los Microorganismos Biodegradadores De Polietileno De Baja Densidad Y Sus Efectos En El Material. 2017;11(1):92–105.