



Evaluación medios de cultivo no convencionales empleando residuos del sector floricultor y papicultor para la producción de enzimas con potencial ambiental e industrial a partir de hongos nativos del Oriente Antioqueño

Juliana Soto Cardona

Informe de práctica para optar al título de Ingeniera Bioquímica

Asesor

Carlos Andrés Caicedo Montoya, MSc en Ingeniería Química

Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería
Ingeniería Bioquímica
El Carmen de Viboral, Antioquia, Colombia

2023

Cita	(Soto Cardona, 2023)
Referencia	Soto Cardona, J. (2023). <i>Evaluación de un medio de cultivo no convencional empleando residuos del sector floricultor para la producción de enzimas con potencial ambiental e industrial a partir de hongos nativos del Oriente Antioqueño</i> . [Trabajo de grado profesional]. Universidad de Antioquia, El Carmen de Viboral, Colombia.
Estilo APA 7 (2020)	



Universidad de Antioquia, Comité para el desarrollo de la investigación (CODI), Proyecto: REG2019-28500
 Servicio Nacional de Aprendizaje -SENA -Tecnoparque Línea de biotecnología (sede Guarne)
 Grupo de Investigación: Bioprocesos
 Investigadora principal proyecto: Juliana Osorio Echavarría
 Asesor de práctica, coinvestigador: Carlos Andrés Caicedo Montoya



Centro de Documentación Ingeniería (CENDOI)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes.

Decano/Director: Julio César Saldarriaga Molina.

Jefe departamento: Lina María Gonzáles Rodríguez.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

A mis padres, Beatriz Cardona Valencia y Jorge Soto Giraldo, por su apoyo incondicional en cada etapa de mi proceso formativo, por brindarme amor, bienestar y creer en mí.

Agradecimientos

Un profundo agradecimiento para Juliana Osorio Echavarría; investigadora principal del proyecto, y Carlos Andrés Caicedo Montoya; coinvestigador y asesor, me guiaron y brindaron la oportunidad de crecer en el campo de la investigación, aprendí muchísimo de ambos. También agradezco especialmente a las auxiliares del laboratorio de la Universidad de Antioquia - Seccional Oriente, quienes me apoyaron y facilitaron el espacio para el desarrollo experimental del proyecto.

Tabla de Contenido

Resumen.....	10
Abstract.....	11
Introducción	12
1 Objetivos	15
1.1 Objetivo General.....	15
1.2 Objetivos Específicos.....	15
2 Marco Teórico.....	16
2.1 Lignina y Enzimas Ligninolíticas	16
2.1.1 Enzima Lacasa.....	16
2.2 Celulosa y Enzimas Celulasas	18
2.2.1 Enzimas Celulasas	18
2.3 Almidón y Enzimas Amilasas.....	19
2.3.1 Enzimas Amilasas	19
2.4 Producción de Enzimas de Interés Ambiental e Industrial	20
2.5 Purificación y Concentración de Enzimas	20
3 Metodología	22
3.1 Selección de Cepas	22
3.2 Medio de Cultivo de Mantenimiento	22
3.3 Preinóculo	23
3.4 Acondicionamiento del Substrato.....	23
3.4.1 Acondicionamiento Tallos de Crisantemo	23
3.4.2 Extracción de Almidón de Papa	23
3.5 Montaje Unidades Experimentales	24
3.5.1 Composición Medio de Cultivo Lacasa	24

3.5.2. Composición Medio de Cultivo Amilasa	24
3.5.3 Composición Medio de Cultivo para Celulasa	24
3.6 Seguimiento Crecimiento Microbiano	24
3.7 Actividad Enzimática.....	25
3.7.1 Actividad Enzimática Lacasa	25
3.7.2 Actividad Enzimática Amilasa	25
3.7.3 Actividad Enzimática Celulasa.....	26
3.8 Azúcares Reductores.....	27
3.9 Purificación y Concentración de Enzima.....	27
3.9.1 Método de Ultrafiltración	27
3.9.2 Método Precipitación con Sulfato de Amonio	28
3.10 Aplicación Decoloración de Colorantes	28
3.10.1 Estructura de los Colorantes Evaluados	29
4 Resultados	32
4.1 Cinéticas.....	32
4.1.1 Cinéticas Lacasa	32
4.1.2 Cinéticas Celulasa	35
4.1.3 Cinéticas Amilasa.....	36
4.2 Productividad y Rendimiento de las Enzimas	37
4.3 Purificación y Concentración de Enzima.....	39
4.4 Aplicación Decoloración de Colorantes	40
4.5 Caracterización de Residuos - Substratos	41
5 Análisis y Discusión de Resultados	43
5.1 Producción de Enzima Lacasa	43
5.2 Producción de Enzima Celulasa.....	46

5.3 Producción de Enzima Amilasa	47
5.4 Concentración Enzima Lacasa	48
5.5 Degradación de Colorantes por Enzima Lacasa	48
6 Conclusiones	51
Referencias.....	53

Lista de Tablas

Tabla 1 <i>Cepas de Trabajo</i>	22
Tabla 2 <i>Productividad y Rendimiento</i>	38
Tabla 3 <i>Concentración Enzima Lacasa</i>	39
Tabla 4 <i>Degradación de Colorantes por Enzima Lacasa</i>	40
Tabla 5 <i>Análisis Residuos de Crisantemo</i>	42
Tabla 6 <i>Caracterización de los Residuos</i>	42

Lista de Figuras

Figura 1 <i>Rojo Efdacron - Colorante Azoico</i>	29
Figura 2 <i>Amarillo Elianamida - Colorante Azoico</i>	29
Figura 3 <i>Amarillo Oro Efdacron – Colorante Aromático Policíclico</i>	30
Figura 4 <i>Marino Efdacron - Colorante Carbohidrazina</i>	30
Figura 5 <i>Azul Oscuro Directo - Colorante Azoico</i>	31
Figura 6 <i>Azul Oscuro (Iris) - Colorante Antraquinona</i>	31
Figura 7 <i>Actividad Enzimática Lacasa</i>	33
Figura 8 <i>Azúcares Reductores Liberados Medio para Lacasa</i>	34
Figura 9 <i>Generación de Biomasa Medio para Lacasa</i>	35
Figura 10 <i>Actividad Enzimática, Azúcares Reductores Liberados, Generación Biomasa - Celulasa</i>	36
Figura 11 <i>Actividad Enzimática, Azúcares Reductores Liberados, Generación Biomasa - Amilasa</i>	37
Figura 12 <i>Espectro de Absorción Colorantes</i>	41

Siglas, acrónimos y abreviaturas

PDA	Medio de cultivo: Papa-Agar-Dextrosa
rpm	Revoluciones por minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetros
W	Vatios
ABTS	Acido2, 2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfonico
μL	Microlitro
mM	Milimolar
ε	Coefficiente de extinción molar
nm	Nanómetros
mmol	Milimol
DNS	Ácido 3,5-dinitrobenzoico
S	Azúcares reductores liberados
X	Generación de biomasa
AE	Actividad enzimática

Resumen

Este proyecto pretende aportar conocimiento acerca de la capacidad de producción de enzimas lacasa, celulasa y amilasa, por parte de seis cepas fúngicas nativas del Oriente Antioqueño, pertenecientes a los géneros *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. y *Penicillium* sp. En este trabajo se desarrollan los montajes experimentales, en torno a la formulación y condiciones del medio de cultivo, donde las fuentes de carbono empleadas son: Tallos provenientes de los residuos generados en los cultivos de *Chrysanthemum* (crisantemo), y almidón que se obtiene de la papa de rechazo. Se construyen las cinéticas a partir de las mediciones correspondientes a azúcares reductores liberados, generación de biomasa y actividad enzimática. Los mejores resultados se presentaron para las cepas del género *Trichoderma* sp., que produjeron la enzima lacasa; se destacan las cepas MF1 (1362.30 UL⁻¹), HF1 (1226.27 UL⁻¹) y HF4 (1174.52 UL⁻¹). Adicionalmente, MF1 se evaluó para la producción de celulasa y amilasa reportando actividades de 0.13 FPU mL⁻¹ y 3.11 U mL⁻¹, respectivamente. El método de ultrafiltración presentó el mejor resultado para la concentración de lacasa (1281.31 UL⁻¹) frente al método de saturación por sulfato de amonio. Con la enzima concentrada, se evaluó la decoloración de seis colorantes, alcanzando un porcentaje máximo de decoloración de 80.43 % del colorante azul oscuro iris. Se concluye que las cepas *Trichoderma* sp. presentan una capacidad promisoriosa en la producción de lacasa, usando residuos de crisantemo como substrato en el medio de cultivo. Esta enzima podría usarse para degradar compuestos contaminantes como colorantes en aguas residuales.

Palabras clave: Tallos de flores, almidón de papa, residuos agroindustriales, enzima lacasa, enzima celulasa, enzima amilasa, hongos.

Abstract

This project aims to provide knowledge about the production capacity of laccase, cellulase and amylase enzymes, by six fungal strains native to eastern Antioquia, belonging to the genera *Aspergillus* sp. , *Trichoderma* sp. and *Penicillium* sp. In this work, the experimental assemblies are developed, around the formulation and conditions of the culture medium, where the carbon sources used are: Stems from the residues generated in the crops of *Chrysanthemum* (crisantemo), and starch that is obtained from potato waste. Kinetics are constructed from measurements corresponding to released reducing sugars, biomass generation and enzyme activity. The best results were showed for strains of the genus *Trichoderma* sp. , which produced the lacase enzyme, where the strains MF1 (1362.30 U L⁻¹), HF1 (1226.27 U L⁻¹) and HF4 (1174.52 U L⁻¹) stand out. In addition, MF1 was evaluated for cellulase and amylase production reporting activities of 0.13 FPU mL⁻¹ and 3.11 U mL⁻¹, respectively. The ultrafiltration method presented the best result for laccase concentration (1281.31 U L⁻¹) versus ammonium sulfate precipitation method. With the concentrated enzyme, the decolorization of six dyes was evaluated, reaching a maximum decolorization percentage of 80.43 % of the dark blue iris. It is concluded that the strains *Trichoderma* sp. have a promising capacity in the production of the lacase, using chrysanthemum residues as a substrate in the culture medium. This enzyme could be used to degrade pollutant compounds as dyes in wastewater.

Keywords: Flower stems, potato starch, agroindustrial residues, laccase enzyme, cellulase enzyme, amylase enzyme, fungi.

Introducción

Las aguas residuales generadas en industrias textiles, agrícola y también en los vertimientos hospitalarios, representan una problemática de contaminación ambiental en suelos y cuerpos de agua, por la presencia de compuestos como colorantes, pesticidas y antibióticos (T. Wang et al., 2018; Yaseen & Scholz, 2019).

Esta problemática alrededor del manejo de aguas residuales, se presenta en el Oriente Antioqueño, debido al uso de este recurso que cobra gran importancia, ya que el agua se emplea a nivel doméstico, industrial, comercial, y también para la generación de energía, esto de acuerdo con el Fondo Mundial para la Naturaleza - Colombia (WWF); allí se plantea que en los ecosistemas asociados a la cuenca y al recurso hídrico, se desencadenan una serie de riesgos, como lo son escasez, contaminación y sobre explotación del recurso. Otro de los usos fundamentales del agua en la región, es para el desarrollo de la agricultura, actividad que representa la principal fuente de alimentos, siendo cultivos de gran importancia el de frutas, hortalizas y tubérculos; como el frijol, arveja, maíz y papa (Marulanda & Silva, 2021).

Las aguas residuales que se generan en el sector agrícola, implican la transformación y también pérdida de servicios a nivel ecosistémicos, dada la dispersión de fertilizantes y agroquímicos en cantidades contaminantes sobre suelos y cuerpos de agua (Zapata et al., 2017).

Partiendo de la importancia de la actividad agrícola en la región del Oriente Antioqueño, como se menciona previamente, otro aspecto que toma fuerza, es la alta generación de residuos agroindustriales, en donde los residuos que no pueden aprovecharse se llevan a rellenos sanitarios, y también estos se exponen al aire libre, representando una fuente de contaminación (Marulanda Giraldo & Silva Duque, 2021). Un ejemplo de lo anterior se da en cultivos como el de papa, entre los residuos que se generan, se encuentra la papa de descarte y/o rechazo, pues esta no cumple con las especificaciones de calidad para salir al mercado. La papa es un cultivo de importancia en el departamento de Antioquia, puesto que en el año 2020 la producción fue de 143815 toneladas de 6745 hectáreas sembradas; los municipios del Oriente Antioqueño donde se cultiva, son: Abejorral, El Carmen de Viboral, El Santuario, La Unión, San Vicente y Guarne (Fedepapa & FNFP, 2021).

Entre otras actividades productivas que generan una gran cantidad de residuos, se encuentra la floricultura, de acuerdo con lo reportado en la revista Metroflor para el 2019, en Colombia, de

7600 hectáreas sembradas con especies ornamentales, el 33 % se centra en el Oriente Antioqueño, flores como el crisantemo, hortensia y aster, hacen parte de los cultivos predominantes (Pardo, 2019).

Según el inventario de residuos agrícolas por zona, de las 206752.63 Toneladas anuales generadas en el Valle de San Nicolás, 371.7 Ton/año corresponden a los residuos de los cultivos de crisantemo y 8549.60 Ton/año se asocian al cultivo de papa (Marulanda Giraldo & Silva Duque, 2021).

Como alternativa a esta problemática, se plantea la exploración del potencial de hongos nativos del Oriente Antioqueño, debido a su diversidad genética y metabólica, para producir enzimas que degradan los contaminantes mencionados previamente, siendo importantes agentes en el tratamiento de aguas residuales y en la recuperación de suelos. Enzimas como las lacasas pueden oxidar diversos compuestos aromáticos, como fenoles y anilinas (Debnath & Saha, 2020), incluso esta enzima cuenta con la capacidad de oxidar sustratos que presentan un nivel de complejidad mayor, a partir del uso de mediadores. Estas enzimas se han empleado con propósitos diversos, en industrias como la del papel, pulpa, textil, petroquímica y alimentos (Upadhyay et al., 2016).

Por otro lado, las enzimas que descomponen polímeros vegetales complejos, en azúcares simples, son de gran interés a nivel industrial, entre estas se encuentran las celulasas, que degradan celulosa en glucosa (Müller et al., 2021). Según diferentes revisiones bibliográficas, existe un espectro amplio de aplicaciones biotecnológicas, dado que la enzima celulasa, hace parte de procesos en industrias de papel y pulpa, allí se utiliza para bioblanqueo, biopulpado, eliminación de tinta, entre otros. Además, es usada en el sector textil para biopulido, ablandamiento de fibras, decoloración de mezclilla; adicional a ello, tiene aplicaciones en la generación de bioetanol, ya que participa en el proceso de hidrólisis de biomasa (Acharya & Chaudhary, 2012; Behera et al., 2017; Chandel et al., 2012; A. Singh et al., 2021; Srivastava et al., 2018).

De la misma manera que presentan un interés industrial enzimas como lacasa y celulasa, anteriormente mencionadas, se encuentra la enzima amilasa, debido a que hidroliza las moléculas de almidón en polímeros compuestos por unidades de glucosa, y por lo tanto se usa en muchos procesos que involucran a la industria alimentaria y farmacéutica (de Souza & e Magalhães, 2010); entre las aplicaciones se destaca la hidrólisis de almidón, ya que a partir de ello se obtienen diversos

productos como lo son jarabe de glucosa, maltosa y fructuosa, ciclodextrinas, y también sustancias que se emplean como sustitutos de grasas (Abdel-Azeem et al., 2022).

Así pues, al exponer el potencial industrial y ambiental de las enzimas lacasa, celulasa y amilasa, la presente investigación se centra en evaluar la producción de estas enzimas, a partir de seis cepas fúngicas nativas del Oriente Antioqueño, pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, y *Penicillium*; para ello se establecen medios de cultivo no convencionales, donde se usan como fuente de carbono para la producción de lacasa y celulasa, residuos del sector floricultor, los cuales corresponden a tallos de crisantemo; y para la obtención de amilasa, se usa almidón, proveniente de la papa de descarte.

La adición de estos substratos al medio de cultivo, representa un valor agregado para los residuos agroindustriales, hecho que toma importancia a escala industrial, dado que es una alternativa para disminuir costos en torno a la formulación de medios, en búsqueda de maximizar la producción de enzimas, donde estas cuenten con estabilidad y una alta actividad enzimática (Rai & Kövics, 2010).

1 Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar la producción de enzimas lacasa, amilasa y celulasa, a escala de matraz en un medio de cultivo no convencional, y obtener extractos enzimáticos para su posterior aplicación en la degradación de compuestos contaminantes.

1.2 Objetivos Específicos

- Formular medios no convencionales para la producción de enzimas lacasa, amilasa y celulasa.
- Caracterizar el material residual correspondiente a tallos de crisantemo y almidón de papa; en cuanto a porcentaje de lignina, celulosa, hemicelulosa y almidón.
- Establecer los protocolos de medición de actividad enzimática para las enzimas lacasa, amilasa y celulasa.
- Establecer metodología para la extracción, recuperación y aplicación de extractos enzimáticos sobre colorantes azoicos y antraquinonas, con el propósito de evaluar la degradación de estos componentes.

2 Marco Teórico

2.1 Lignina y Enzimas Ligninolíticas

La lignina es considerada como el segundo biopolímero con mayor presencia en el planeta, siendo uno de los componentes principales de la pared celular vegetal, además de la celulosa y hemicelulosa (Saini & Sharma, 2021). Comprende entre el 15 y 40 % de la biomasa vegetal (Zhu et al., 2020). Organismos como los hongos tienen la capacidad de oxidar y utilizar la lignina como fuente de carbono para su supervivencia y metabolismo celular (Debnath & Saha, 2020). De acuerdo con la bibliografía, la degradación biológica de la lignina se da por acción de enzimas ligninolíticas extracelulares (Torres et al., 2003), enzimas que se producen por hongos, estas pueden degradar la lignina o modificarla. La capacidad de dichas enzimas oxidativas, consiste en emplear diferentes componentes fenólicos y no fenólicos de la lignina como sustrato; las reacciones enzimáticas derivadas, también son de gran interés para diversas aplicaciones biotecnológicas, debido a que los grupos de enzimas ligninolíticas participan en la deconstrucción y conversión de la lignina, siendo así de gran interés en los procesos donde se busca liberar azúcares de la biomasa, ya que las fibras de celulosa están embebidas entre la lignina, por eso se hace necesario degradarla; con el fin de acceder a los azúcares presentes en la celulosa y llevarlos a fermentación, para obtener biocombustibles y bioproductos (Mäkelä et al., 2017). Este sistema enzimático se usa también en agricultura, desarrollo de productos farmacéuticos y cosméticos, producción de cerveza y vino (Saini & Sharma, 2021). Entre las enzimas ligninolíticas de interés se encuentran: Lacasa, lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y peroxidasa versátil (Kumar & Chandra, 2020). Para este estudio la enzima lacasa es de gran importancia, por ello se describe a continuación:

2.1.1 Enzima Lacasa

Es una enzima ligninolítica que degrada polímeros de lignina recalcitrantes complejos, tiene cuatro moléculas de cobre en su sitio activo (Debnath & Saha, 2020). Las lacasas de origen fúngico son polifenol oxidasas multicobres glicosiladas, las cuales catalizan la degradación del polímero de lignina a través de la reducción de la molécula de oxígeno en agua y la oxidación simultánea de las unidades aromáticas y no aromáticas (Saini & Sharma, 2021; Sharma & Kuhad, 2008). De manera que las propiedades catalíticas de oxidación con las que cuenta lacasa, se asocian al amplio uso de esta enzima en diversas aplicaciones a nivel industrial. Estas enzimas se

emplean en la industria de alimentos, para procesamiento de jugos de frutas, estabilización de vinos y cocción; en la industria del papel y la pulpa, para la deslignificación y destintado; en la industria textil, para la transformación de colorantes textiles; también sus aplicaciones comprenden la remoción de disruptores endocrinos y biodegradación de contaminantes fenólicos, presentes en suelos y aguas residuales industriales (Rodríguez Couto & Toca Herrera, 2006; Tanaka et al., 2001).

Otra de las aplicaciones relevantes de la enzima lacasa se presenta en el campo de la biorremediación, pues el tratamiento enzimático, de acuerdo con revisiones, es considerado un método alternativo y eficaz para la eliminación de compuestos xenobióticos tóxicos, presentes en el medio ambiente. Esta enzima dada su amplia especificidad de sustrato, puede oxidar hidrocarburos aromáticos policíclicos, fenoles, tintes industriales y pesticidas (Pointing, 2001; Pozdnyakova et al., 2004; Torres et al., 2003).

Las aplicaciones en cuanto a biorremediación por parte de esta enzima, están enlazadas con la búsqueda de tecnologías de oxidación eficientes y ecológicas que permitan reemplazar métodos convencionales, los cuales no son sostenibles y presentan impactos negativos sobre el medio ambiente. Así que lacasa se considera una enzima prometedora en el desarrollo de tecnologías de oxidación que involucran enzimas, debido a su versatilidad y también al que para desencadenar su acción catalítica solo necesita oxígeno molecular (Rodríguez-Couto, 2019). Una de las aplicaciones importantes en el área de biorremediación es la degradación de contaminantes, como lo son los tintes sintéticos; la problemática inicia en los procesos de teñido de industrias como la textil, donde entre 2 y 60 % de los tintes empleados no se unen al tejido, estos van directamente a efluentes, generando cantidades considerables de aguas residuales, las cuales deben ser tratadas, pues los colorantes presentes en estas, han sido reportados como mutagénicos y cancerígenos (Vanhulle et al., 2008). Diferentes estudios indican que el uso de lacasa fúngica contribuye a la remoción y/o degradación de colorantes en los efluentes industriales de una manera eficiente (Bankeeree et al., 2016; Chmelová & Ondrejovič, 2016).

2.2 Celulosa y Enzimas Celulasas

La celulosa es un polisacárido de unidades de glucosa que constituye la parte principal de las paredes celulares de las plantas, se puede encontrar naturalmente en productos fibrosos como lo son el algodón y la ceiba (Gooch, 2011). Representa una fuente de carbono renovable, siendo un biopolímero natural que es abundante, está presente en los residuos tanto agrícolas, como forestales. Una amplia variedad de microorganismos procariotas y eucariotas producen enzimas que degradan la celulosa. La hidrólisis de la celulosa se lleva a cabo por la acción sinérgica de enzimas denominadas celulasas, estas actúan rompiendo enlaces glucosídicos β -1,4 en polisacáridos y oligosacáridos (Dadwal et al., 2019).

2.2.1 Enzimas Celulasas

La acción de las enzimas celulasas se desarrolla debido a tres enzimas principales que actúan de manera conjunta, estas son: Endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasa.

Las celulasas son importantes enzimas industriales sintetizadas por microorganismos como hongos y bacterias que utilizan materiales celulósicos (Silano et al., 2019; Siva et al., 2022). Tras la acción de hidrolisis enzimática, se liberan del polímero de celulosa pequeñas cadenas de celobiosa y moléculas de glucosa (Taherzadeh & Karimi, 2007).

Los hongos filamentosos presentan un nivel mayor de producción de enzimas celulasas frente a lo reportado para levaduras y bacterias (Siva et al., 2022). Las celulasas de origen fúngico presentan aplicaciones que destacan en la industria textil, papel y pulpa, alimentos, detergentes, vino y cervecería, también en la síntesis de aminoácidos y alimentación animal (Fang & Qu, 2018; Ghosh et al., 2021).

La investigación sobre enzimas celulasas ha incrementado, debido a la gran producción de glucosa que se puede alcanzar a gran escala, la cual puede fermentarse en etanol, producto que presenta una gama amplia en cuanto aplicaciones, especialmente en el sector de biocombustibles (Agarwal et al., 2018; Ghosh et al., 2021).

2.3 Almidón y Enzimas Amilasas

El almidón es un polisacárido, siendo el segundo material de biomasa más abundante en la naturaleza se presenta naturalmente como gránulos semicristalinos insolubles, formados por dos polímeros de amilosa esencialmente no ramificada, y la amilopectina altamente ramificada (Chen et al., 2019). El almidón se encuentra en las semillas, raíces y tubérculos de las plantas superiores. Las plantas sintetizan almidón como resultado del proceso de fotosíntesis, este se sintetiza en plástidos; ya que es un compuesto de almacenamiento para la respiración, durante los períodos de oscuridad. También se sintetiza en amiloplastos que se encuentran en tubérculos, semillas y raíces, como un compuesto de almacenamiento a largo plazo. En los orgánulos mencionados se acumulan grandes cantidades de almidón en forma de gránulos que son insolubles en agua (El-Fallal et al., 2012).

El almidón se cosecha y se procesa química o enzimáticamente con el fin de obtener una variedad de productos diferentes, como hidrolizados de almidón, jarabes de glucosa, fructosa, derivados de almidón o maltodextrina. Las principales fuentes de almidón a nivel industriales son el maíz, la tapioca, la patata y el trigo (El-Fallal et al., 2012).

2.3.1 Enzimas Amilasas

Las amilasas son un grupo de enzimas hidrolasas, pueden escindir específicamente el enlace α -glucosídico en el almidón (Anto et al., 2006; Saleem & Ebrahim, 2014). Son la clase más importante de enzimas para degradar el almidón y se subdividen en tres subclases: α -, β - y γ -glucoamilasas, en función de su especificidad de reacción y perfiles de productos (Roth et al., 2019).

La obtención de amilasas de origen fúngico es relevante debido al potencial para la producción a granel y la facilidad de manipulación, lo que representa beneficios económicos a nivel industrial (Saleem & Ebrahim, 2014).

Las amilasas son empleadas para la sacarificación del almidón, lo cual permite obtener jarabes de maltosa o glucosa como edulcorantes, para la industria alimentaria y para la producción de etanol derivado de procesos de fermentación (Cardona & Sánchez, 2007; Mitidieri et al., 2006).

La hidrólisis del almidón por métodos enzimáticos tiene ventajas, ya que las enzimas cuentan con especificidad de sustrato, lo que contribuye en que no se presente la formación de subproductos indeseables (Aguero de Oliveira et al., 2015; de Souza & Magalhães, 2010).

2.4 Producción de Enzimas de Interés Ambiental e Industrial

De acuerdo con los autores R. Debnath, y T. Saha, emplear sustratos que representan un bajo costo en medios que buscan la producción de enzimas en grandes cantidades, y que estas cuenten con mayor estabilidad y una alta actividad, es una demanda cada vez mayor para usos industriales (Debnath & Saha, 2020). Por ejemplo, en el sector textil la sustitución de productos químicos por enzimas es de gran importancia, ya que las amilasas hacen parte del proceso de desencolado; las celulasas participan en la mercerización y el biopulido; las lacasas en el blanqueo, entre otros. Se integran a estos procesos las enzimas, con el fin de mejorar la calidad, la resistencia, la textura del tejido, y que sea más rentable la producción (Madhu & Chakraborty, 2017).

Varios autores coinciden en que la fuente y relación carbono/nitrógeno, las condiciones de fermentación, y parámetros como los niveles de pH, la temperatura de incubación y la agitación del medio, se relacionan con una mejor producción enzimática y también se propone la adición de inductores al cultivo (Arora & Sandhu, 1984; Debnath & Saha, 2020; Froehner & Eriksson, 1974; Kantelinen et al., 1989; Zerva et al., 2021).

Hongos pertenecientes al género *Penicillium*, representan una opción rentable para la producción de celulasas a escala industrial, además de la producción de β -glucosidasas con alta actividad (Vaishnav et al., 2018). Investigaciones recientes han evaluado la producción de la enzima lacasa en cepas del género *Aspergillus* sp. a partir de residuos agrícolas como cáscara de naranja, cáscara de maní, mazorca de maíz, cáscara de arroz, aserrín y cáscara de mango; estos se emplearon como sustitutos de la fuente de carbono en el medio de cultivo. Como resultados el medio que contenía cascara de maní, fue quien obtuvo mayor reporte de actividad enzimática (Omeje et al., 2020).

2.5 Purificación y Concentración de Enzimas

En búsqueda de un menor costo de producción de enzimas, al igual que mantener la actividad y estabilidad de estas, es necesario integrar procesos de concentración adecuados, que permitan darle aplicaciones a las enzimas que se producen (Zaccaria et al., 2019).

Respecto a la purificación y concentración de la enzima lacasa, se plantea el método de precipitación usando sulfato de amonio, este se disuelve en una solución del extracto de enzima crudo, la solución pasa por un proceso de centrifugación y el sobrenadante se lleva a una saturación de nuevo con sulfato de amonio, se da un segundo ciclo en la centrifuga. El precipitado se dializa

frente a buffer el cual mantiene la estabilidad de la enzima, allí se selecciona la membrana de diálisis según el tamaño de la enzima; como último paso de purificación, la enzima concentrada se lleva a una columna de cromatografía en gel para separar y recuperar la enzima en función de su peso molecular (Omeje et al., 2020).

Otro de los métodos comprendidos en la bibliografía para concentrar lacasa, son los sistemas de filtración por membrana, como la ultrafiltración, estos procesos de filtración se realizan bajo condiciones de presión, que permitan recolectar el permeado, mientras el flujo de concentrado es recirculado a un tanque de alimentación (Zaccaria et al., 2019).

En cuanto a la enzima amilasa, se ha propuesto la purificación parcial por el método de precipitación fraccionada usando etanol (50% y 70%), las fracciones que contienen gránulos de proteína se disuelven en tampón de fosfato; a continuación, se estima el peso molecular de la proteína empleando electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE 8%) (F. A. Santos et al., 2021). En otras investigaciones, se lleva a cabo un proceso completo de purificación de amilasa, en donde se sigue una metodología de la que hace parte la concentración de la proteína por el método de liofilización, posteriormente se ultrafiltra el extracto, también involucran precipitación con sulfato de amonio y acetona, finalmente se lleva el extracto concentrado a un proceso de cromatografía de intercambio iónico (Kohli et al., 2020).

Autores han trabajado en la purificación de enzima celulasa, empleando un método de precipitación con sulfato de amonio al 80 %, como se plantea para la enzima lacasa, junto con cromatografía de intercambio iónico en columna Sephadex G-200. Tras la precipitación se determina la actividad celulasa y el contenido de proteína.

Respecto a la purificación de enzimas celulasas, también se ha reportado el estudio de membranas de microfiltración cerámicas de bajo costo con una capa de separación de nanofibras de atapulgita, se utiliza con el objetivo de clarificar el fluido de fermentación para mejorar la calidad de los productos de celulasa (Yang et al., 2017).

3 Metodología

3.1 Selección de Cepas

La selección se realizó a partir de las cepas que hacen parte de la investigación: ‘Aislamiento y caracterización de hongos filamentosos de muestras de madera y suelos de la reserva natural “La Lorena” de Sonsón, Antioquia (Colombia)’ (Montoya-Castrillón et al., 2021).

Se establece un criterio de búsqueda bibliográfica en la plataforma/base de datos NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica), para identificar cuáles de las cepas disponibles para el desarrollo del proyecto, presentaban en su genoma genes que codifican para las enzimas lacasa, celulasa y amilasa.

En la **Tabla 1** se presentan las cepas que hacen parte de este trabajo.

Tabla 1

Cepas de Trabajo

Nomenclatura establecida	Genero Fúngico
HF1	<i>Trichoderma</i> sp.
HF2	<i>Trichoderma</i> sp.
HF3	<i>Penicillium</i> sp.
HF4	<i>Trichoderma</i> sp.
MF1	<i>Trichoderma</i> sp.
SF1	<i>Aspergillus</i> sp.

3.2 Medio de Cultivo de Mantenimiento

A partir del stock disponible, en donde las cepas se encontraban en condiciones de criopreservación, almacenadas a temperatura de -20 °C (agente crioprotector: glicerol 7 %), se realiza una activación y repique para cada una de las seis cepas de trabajo (**Tabla 1**), en cajas petri de 8 mL con medio PDA, compuesto por: 4 g L⁻¹ extracto de papa, 20 g L⁻¹ dextrosa, 15 g L⁻¹ agar. Incubación 30 °C, por 8 días.

3.3 Preinóculo

A partir del cultivo en sólido se generan los respectivos inóculos empleando para su crecimiento caldo de cultivo, compuesto por: 1 g L⁻¹ almidón, 3 g L⁻¹ sulfato de amonio y 20 g L⁻¹ de glucosa. En matraz de 1000 mL, se adicionaron 120 mL de medio y se inocula con 5 trozos de agar colonizado. Incubación 30 °C, tiempo: 8 días, agitación: 100 rpm. Finalmente se homogeniza el preinóculo correspondiente a cada cepa para su posterior uso.

3.4 Acondicionamiento del Substrato

3.4.1 Acondicionamiento Tallos de Crisantemo

Los residuos de tallos de crisantemo se obtuvieron en la vereda “La Laja” del municipio de Rionegro (Antioquia). Los tallos se sometieron a un proceso de molienda, pasando el material por un molino de cuchillas, para obtener un tamaño de partícula de 2 mm y posteriormente se llevó a tamizar, se empleó un tamiz número 35, apertura de 500 micras, potencia: 5 W, ciclos: 5, tiempo: 10 minutos. Finalmente se seca el material, llevándolo a estufa con una temperatura de 100 °C durante 15 minutos. Como resultado del proceso, el material tiene una textura semejante a harina.

La caracterización de los tallos de crisantemo, tiene lugar después del acondicionamiento del material. Se realizan tres análisis, estos son: Cenizas, Fibra en detergente ácido, Fibra en detergente neutro y Humedad. Para estimar la composición del material en términos de lignina, celulosa y hemicelulosa se sigue el método para fibra dietaria de Van Soest *et al* (Van Soest et al., 1991).

3.4.2 Extracción de Almidón de Papa

La papa capira de descarte se obtiene en el municipio de El Carmen de Viboral (Antioquia). La cual se somete a una molienda húmeda, en una licuadora donde se mezclan papas y agua, se filtra la mezcla obtenida y se adicionan 250 mL de agua, la muestra se decanta por 4 horas a temperatura ambiente, hasta observar la formación de una capa de precipitado, lo que corresponde a almidón. Luego se retira el sobrenadante, y posteriormente se agregan 1000 mL de agua con el fin obtener un sobrenadante claro y garantizar el lavado del precipitado. Finalmente se retira el sobrenadante y el precipitado se seca a temperatura ambiente.

El porcentaje de almidón se determina a partir del peso específico de almidón, siguiendo el método propuesto por Simmonds (Simmonds, 1977).

3.5 Montaje Unidades Experimentales

Los montajes se realizaron por triplicado para la evaluación de la producción de las tres enzimas, empleando matraces de 500 mL, con 198 mL de medio de cultivo y 2 mL de inóculo, previamente homogenizado. Seguimiento durante 15 días, incubación 30 °C, agitación de 100 rpm.

A continuación se describen los medios de cultivo formulados según la enzima a producir y las cepas evaluadas.

3.5.1 Composición Medio de Cultivo Lacasa

Composición del medio de cultivo: 25 g L⁻¹ residuos de Crisantemo (tratados), 5 g L⁻¹ peptona, 2 g L⁻¹ tartrato de amonio, 1.05 g L⁻¹ fosfato monopotásico, 1 g L⁻¹ extracto de levadura, 0.5 g L⁻¹ sulfato de magnesio, 0.5 g L⁻¹ cloruro de potasio, solución mineral 1 mL L⁻¹ (solución mineral: 100 mg L⁻¹ borato de sodio, 70 mg L⁻¹ sulfato de zinc, 50 mg L⁻¹ sulfato de hierro, 10 mg L⁻¹ molibdato de amonio, 10 mg L⁻¹ sulfato de magnesio).

Cepas evaluadas: HF1, HF2, HF3, HF4, MF1, SF1.

3.5.2. Composición Medio de Cultivo Amilasa

Composición del medio de cultivo: 21 g L⁻¹ almidón de papa (tratado), 3 g L⁻¹ sulfato de amonio.

Cepas evaluadas: HF2, MF1.

3.5.3 Composición Medio de Cultivo para Celulasa

Composición del medio de cultivo: 25 g L⁻¹ residuos de Crisantemo (tratados), 5 g L⁻¹ fosfato monopotásico, 5 g L⁻¹ sulfato de amonio, 1 g L⁻¹ sulfato de magnesio, 1 g L⁻¹ cloruro de sodio, 5 mg L⁻¹ sulfato de hierro, 1.6 mg L⁻¹ sulfato de manganeso, 3.45 mg L⁻¹ sulfato de zinc, 1 g L⁻¹ urea, 0.75 g L⁻¹ triptosa.

Cepas evaluadas: MF1.

3.6 Seguimiento Crecimiento Microbiano

Se pesan cada una de las unidades experimentales en balanza digital de precisión, teniendo en cuenta diferencia de peso considerando el peso del matraz y medio de cultivo respecto a la biomasa que se genera cada día de evaluación.

3.7 Actividad Enzimática

3.7.1 Actividad Enzimática Lacasa

Se realizan mediciones a partir de tomar 350 μL de extracto enzimático (muestra), junto con 450 μL del reactivo ABTS (10 mM) y 700 μL de buffer tartrato de sodio (pH 3). Las lecturas correspondientes se llevaron a cabo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm, en un tiempo de reacción de 1 minuto ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), teniendo en cuenta la velocidad de oxidación del ABTS.

La ecuación (1), corresponde a la actividad enzimática lacasa (Bourbonnais et al., 1995):

$$\frac{U}{L} = \frac{mAbs/min \times vol \text{ final de Rx}(mL)}{\epsilon \times A \times (vol \text{ extracto})} \times 1000 \quad (1)$$

Dónde:

mAbs/min: pendiente, valor que entrega el espectrofotómetro configurado en el modo cinético

Vol final de Rx (mL): volumen final de reacción (1.5 mL)

ϵ : coeficiente de extinción molar ($36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

A: diámetro de la cubeta, por donde atraviesa el haz de luz (0.5 cm)

Vol extracto: volumen del extracto enzimático (350 μL)

3.7.2 Actividad Enzimática Amilasa

Se transfieren 750 μL de solución madre de almidón soluble (2 g L^{-1}) y 750 μL de extracto enzimático (previamente diluida en el buffer) a un tubo de ensayo. Se somete a calentamiento a 60°C por 10 minutos. Se detiene el proceso de hidrólisis agregando 750 μL de ácido clorhídrico (1 M). De la muestra anterior se toman 200 μL , se adiciona 600 μL de agua y 200 μL de solución de KI (2 g L^{-1})/ I₂ (0.2 g L^{-1}) en una cubeta. Agitar la muestra por 30 segundos, leer absorbancia a 580 nm.

La actividad enzimática corresponde a la tasa de hidrólisis de almidón, expresada en mg de almidón soluble por minuto.

La ecuación (2) , corresponde a la actividad enzimática amilasa (Oliveira et al., 2019):

$$\frac{U}{mL} = \frac{m \text{ control} - m \text{ ensayo}}{\text{tiempo} \times \text{volumen}} \times \text{factor de dilución} \quad (2)$$

Donde:

m control: absorbancia del control

m ensayo: absorbancia de la muestra

Tiempo: tiempo de hidrolisis (10 minutos)

Volumen: volumen del extracto enzimático utilizado para el ensayo

Factor de dilución: dilución total aplicada a la solución de extracto enzimático

3.7.3 Actividad Enzimática Celulasa

Se determinó midiendo celulasas totales (FPU). Como sustrato se emplea papel Whatman N°1 de 1 cm x 6 cm, equivalente a 50 mg de celulosa. Se prepara un estándar de glucosa, y se construye la curva estándar asociada. Se adicionan cintas de papel Whatman N°1 en un tubo de ensayo, se añade 1 mL de buffer citrato (pH 4.8) y 0.5 mL de extracto enzimático. Se lleva al baño termostático, fijado a una temperatura de 50 °C durante 60 min, se pasa el sistema a baño de ebullición durante 10 minutos, para desactivar la enzima. Luego se transfieren 200 µL de cada tubo y mezcla con 200 µL de DNS en otro tubo de ensayo. Se lleva a baño de ebullición 5 minutos y posteriormente llevar el sistema a baño hielo 5 minutos. Finalmente se transfieren 1000 µL de cada muestra a una cubeta y se lee la absorbancia en espectrofotómetro a 540 nm.

La ecuación (3) , corresponde a la actividad enzimática celulasa (Adney & Baker, 2008):

$$\frac{FPU}{mL} = \frac{C \times VR \times FDenzima}{t \text{ rxn} \times Venzima \times Mglucosa} \quad (3)$$

Donde:

C: concentración de azúcares reductores ($\mu\text{g/L}$)

VR: volumen de reacción (0.0015 L)

FDenzima: Factor de dilución de enzima

Trxn: tiempo de reacción (60 minutos)

Venzima: volumen de solución de enzima diluida (0.5 mL)

Mglucosa: Masa molar de la glucosa ($180 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$)

3.8 Azúcares Reductores

La cuantificación de azúcares reductores totales se realiza usando la técnica de oxidación DNS (Miller, 1959), se utilizó 750 μL de muestra diluida (1:10) y 750 μL del reactivo. La medición se llevó a cabo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

3.9 Purificación y Concentración de Enzima

3.9.1 Método de Ultrafiltración

El líquido de los cultivos se filtró a través de papel de filtro fino (Whatman N° 1), El filtrado se centrifuga a 4000 rpm por 30 minutos para eliminar los precipitados. Se someten los extractos a ultrafiltración usando una membrana de corte de 10 kDa. La enzima concentrada se recogen después de la filtración y se analiza la actividad enzimática.

La ecuación (4), permite determinar el factor de concentración volumétrico (Zaccaria et al., 2019):

$$FCV = \frac{v_0}{v_c} \quad (4)$$

Donde:

FCV: factor de concentración volumétrico

v₀: volumen del extracto enzimático inicial (mL)

v_c: volumen de concentrado final (mL)

La ecuación (5), se refiere al factor de concentración de actividad (Cheryan, 1998):

$$ACF = \frac{E_c}{E_0} \quad (5)$$

Donde:

ACF: factor de concentración de actividad

E₀: actividad de la enzima que se encuentra en la alimentación (U mL⁻¹)

E_c: actividad de la enzima que se encuentra en el concentrado (U mL⁻¹)

La ecuación (6), describe la eficiencia de recuperación de la enzima (Cheryan, 1998):

$$R = \frac{E_c \times v_c}{E_0 \times v_o} \quad (6)$$

Donde:

R: eficiencia de recuperación

3.9.2 Método Precipitación con Sulfato de Amonio

Se añade lentamente sulfato de amonio a la enzima cruda con agitación suave para alcanzar una saturación del 90 %, 60 % y 35 %. Luego se centrifugan las muestras a 4000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sedimento que se obtiene se disuelve en 15 mL de tampón tartrato de sodio (pH 3). Finalmente se mide la actividad enzimática de las muestras.

3.10 Aplicación Decoloración de Colorantes

Se determina el porcentaje de decoloración en seis colorantes utilizados en la industria textil, estos son: rojo efdacron, amarillo elianamida, amarillo oro efdacron, marino efdacron, azul oscuro directo y azul oscuro (iris). Para los cuales se obtuvo el espectro de absorción, a una concentración de 100 mg L⁻¹, procedimiento que se llevó a cabo en el espectrofotómetro, con el objetivo de conocer la longitud de onda a la cual se evaluaría la decoloración de los colorantes.

La ecuación (7), permite calcular el porcentaje de decoloración de acuerdo a la diferencia de absorbancia antes y después de la incubación de la mezcla de reacción, de la que hace parte la enzima concentrada, buffer tartrato de sodio (pH 3), ABTS (10 mM), y el respectivo colorante (100 mgL⁻¹), se toma de cada uno de ellos 250 µL, para un volumen total de 1000 µL. Las muestras se llevan a incubación durante 1 hora, a 37 °C. (Omeje et al., 2020).

$$\% \text{ Decoloración} = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100 \quad (7)$$

Donde:

A_i: absorbancia inicial antes de la incubación

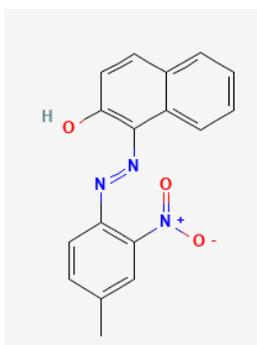
A_f: absorbancia final después de la incubación.

3.10.1 Estructura de los Colorantes Evaluados

Se llevó a cabo la búsqueda de las estructuras de los colorantes en la base de datos de moléculas PubChem, esto para determinar el tipo y/o clasificación de los colorantes evaluados.

Figura 1

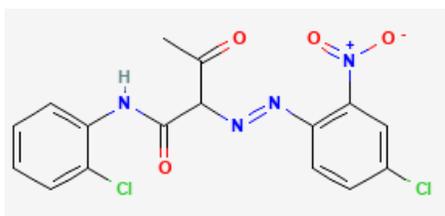
Rojo Efdacron - Colorante Azoico



Nota: Fuente <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/17047> (PubChem Identifier: CID 17047)

Figura 2

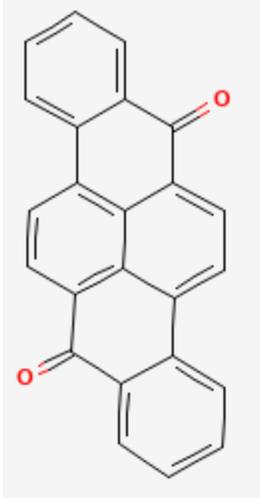
Amarillo Elianamida - Colorante Azoico



Nota: Fuente <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/94326> (PubChem Identifier: CID 94326)

Figura 3

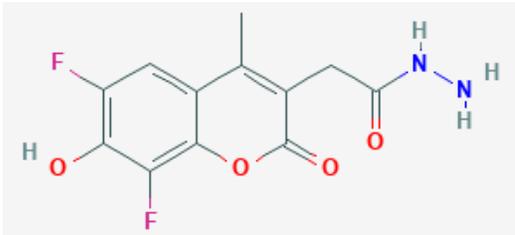
Amarillo Oro Efdacron – Colorante Aromático Policíclico



Nota: Fuente <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/319084151> (PubChem Identifier: CID 319084151)

Figura 4

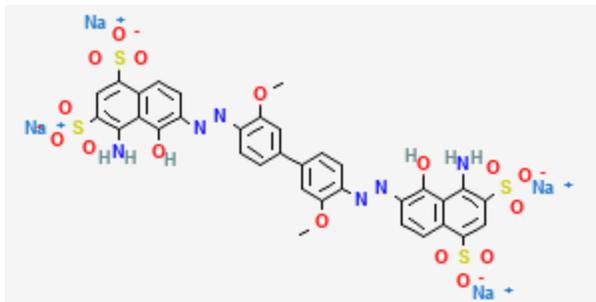
Marino Efdacron - Colorante Carbohidrazina



Nota: Fuente <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Marina-blue-dye> (PubChem Identifier: CID 25195414)

Figura 5

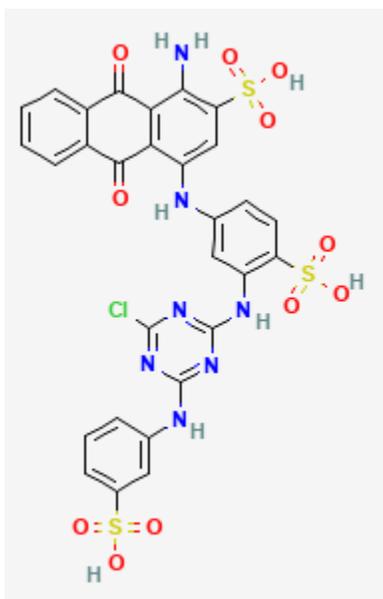
Azul Oscuro Directo - Colorante Azoico



Nota: Fuente <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/17460> (PubChem Identifier: CID 17460)

Figura 6

Azul Oscuro (Iris) - Colorante Antraquinona



Nota: Fuente <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/85599> (PubChem Identifier: CID 85599)

4 Resultados

El objetivo principal de este proyecto fue evaluar la producción de enzimas lacasa, amilasa y celulasa, a escala de matraz en un medio de cultivo no convencional, y obtener extractos enzimáticos para su posterior aplicación en la degradación de compuestos contaminantes.

Así pues, para los medios de cultivo no convencionales se emplearon como fuentes de carbono: tallos provenientes de los residuos generados en los cultivos de crisantemo, y almidón que se obtiene de la papa de rechazo, de manera que al formular y establecer las condiciones del medio de cultivo, se llevaron a cabo los montajes experimentales con las cepas de trabajo (ver **Tabla 1**); a los cuales se les hizo seguimiento durante 15 días, para obtener los resultados que se presentaran a continuación y se discutirán posteriormente, estos corresponden a las cinéticas de actividad enzimática, azúcares reductores liberados y generación de biomasa. Adicional a ello, tras caracterizar los substratos, se obtienen los valores de composición en cuanto a porcentaje de lignina, celulosa, hemicelulosa y almidón. Dichos resultados permiten evaluar y discutir la producción de las enzimas en cuestión.

En torno a la purificación y concentración del extracto enzimático, se evaluaron dos métodos: Ultrafiltración y precipitación con sulfato de amonio, por tanto se presentan resultados respecto a la enzima recuperada en términos de actividad enzimática. Finalmente se hace la aplicación del extracto sobre colorantes de naturaleza azoico, antraquinona, carbohidrazina y aromático policíclico; con la objetivo de determinar el porcentaje de decoloración y discutir la degradación de colorantes.

4.1 Cinéticas

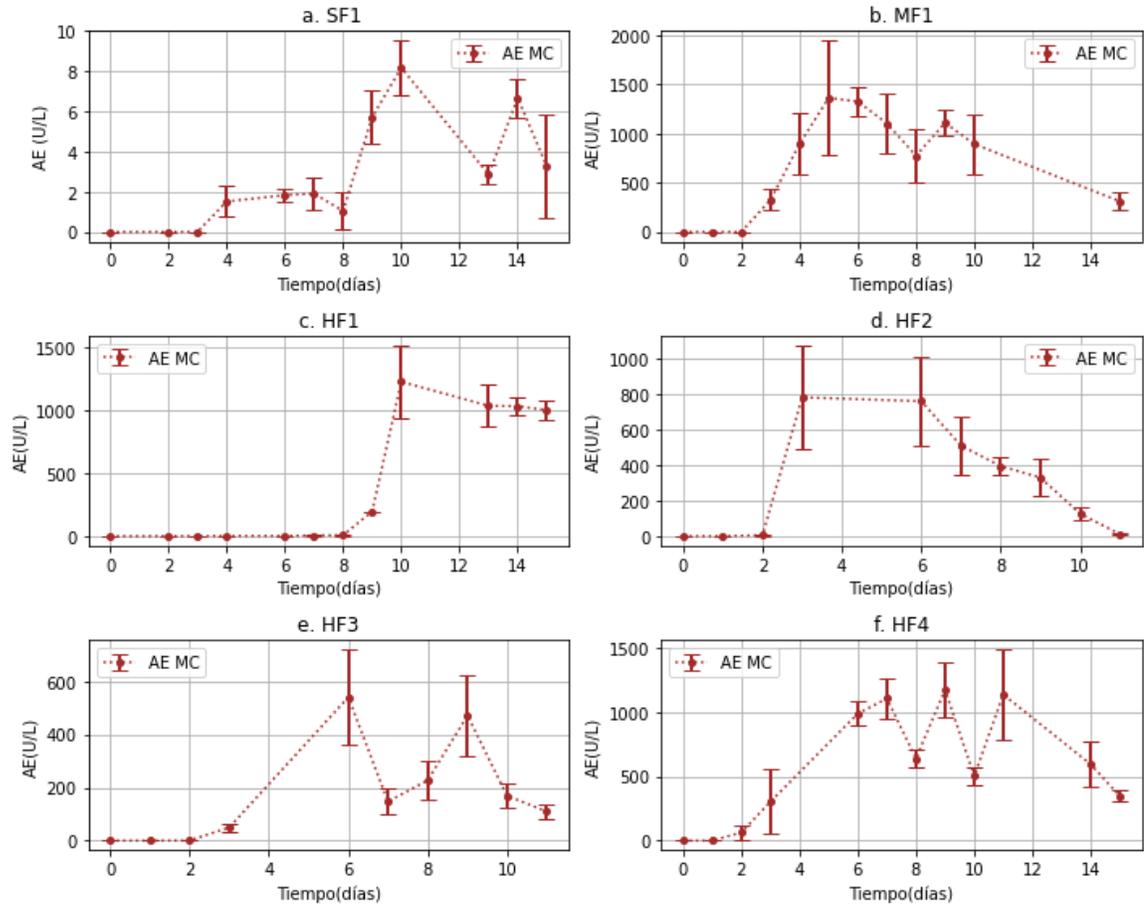
A continuación se presentan las cinéticas correspondientes a actividad enzimática, azúcares reductores liberados y generación de biomasa, tanto para el medio con residuos de crisantemo, donde se evaluaron las enzimas lacasa y celulasa; como también para el medio con almidón de papa de rechazo, para la evaluación de enzima amilasa.

4.1.1 Cinéticas Lacasa

Se presentan en la **Figura 7**, **Figura 8**, y **Figura 9**, las cinéticas de actividad enzimática, azúcares reductores liberados y generación de biomasa, respectivamente. En el medio con residuos de crisantemo para la evaluación de la producción de la enzima lacasa por las seis cepas de trabajo: HF1, HF2, HF3, HF4, MF1 & SF1 (ver **Tabla 1**).

Figura 7

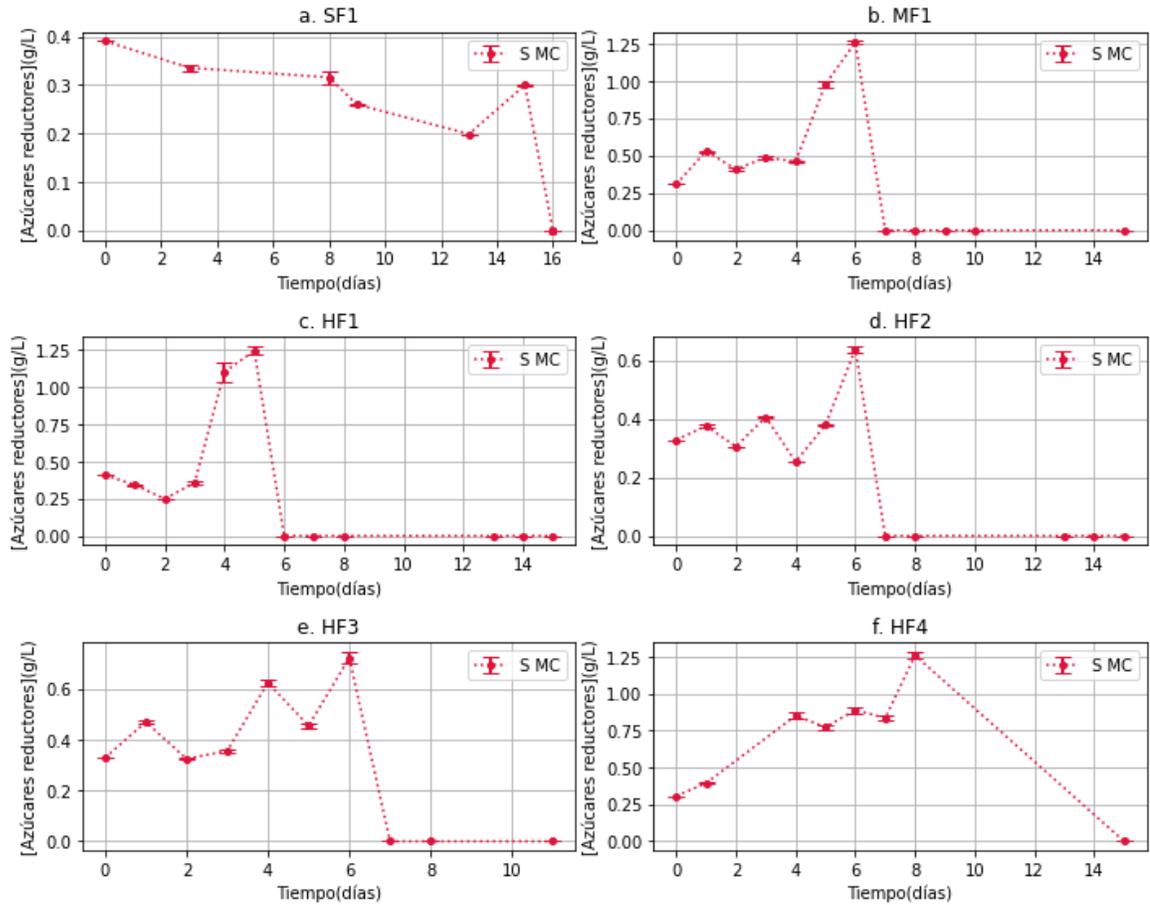
Actividad Enzimática Lacasa



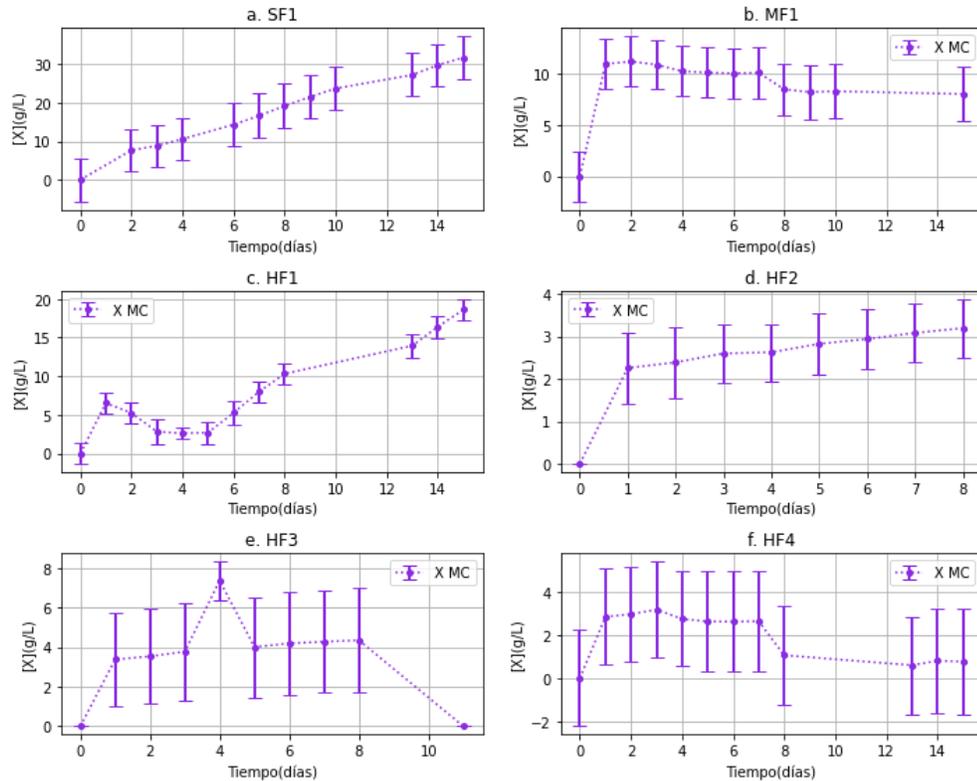
Nota. AE se refiere actividad enzimática de lacasa, MC: medio de cultivo.

Figura 8

Azúcares Reductores Liberados Medio para Lacasa



Nota. S se refiere azúcares reductores liberados, MC: medio de cultivo.

Figura 9*Generación de Biomasa Medio para Lacasa*

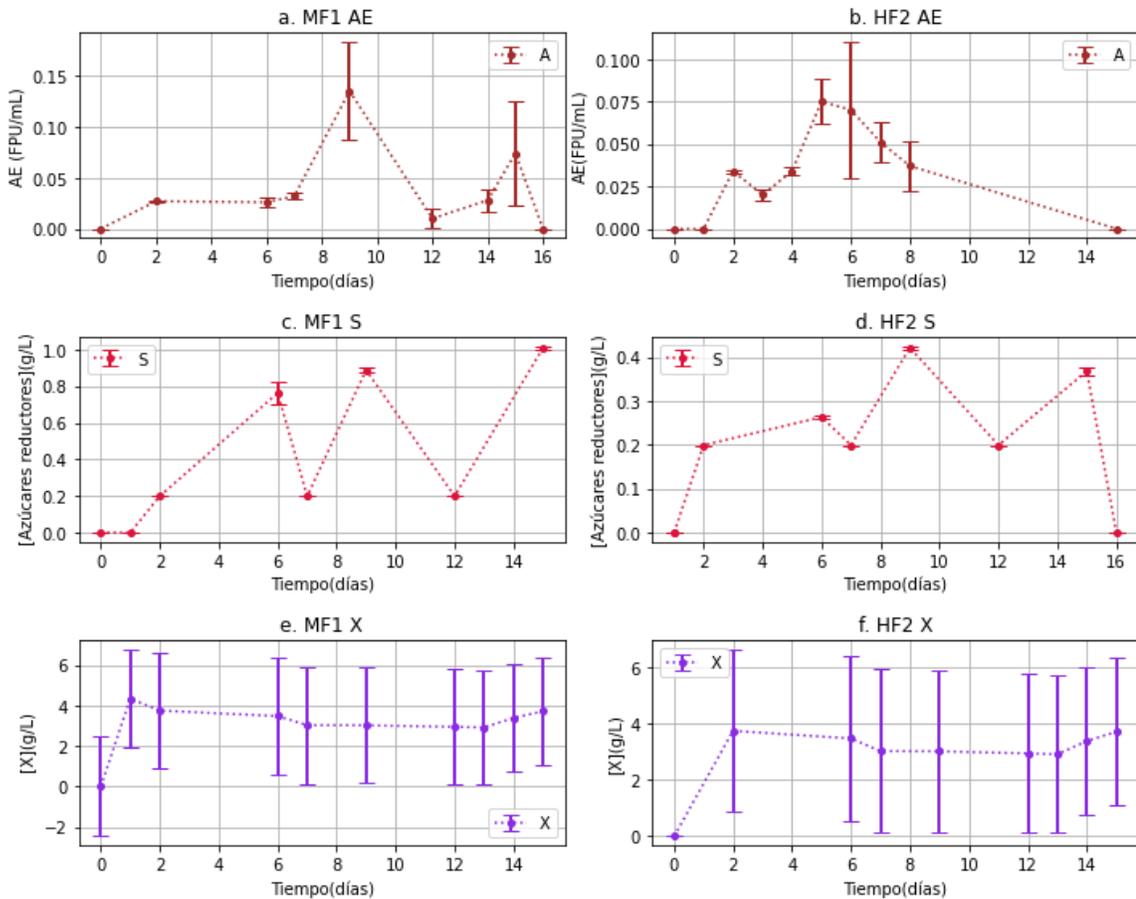
Nota. X se refiere biomasa generada, MC: medio de cultivo.

4.1.2 Cinéticas Celulasa

En este caso se evaluaron dos cepas: MF1 & HF2, seleccionadas a partir de los resultados de la producción de lacasa, los cuales se reportan en la **Tabla 2**, donde se tiene en cuenta rendimiento, productividad, y análisis de varianza de medias (*valor-P*). En torno a la evaluación del medio con residuos de crisantemo para la producción de la enzima celulasa, se presentan las cinéticas de actividad enzimática, azúcares reductores liberados y generación de biomasa, en la **Figura 10**.

Figura 10

Actividad Enzimática, Azúcares Reductores Liberados, Generación Biomasa - Celulosa



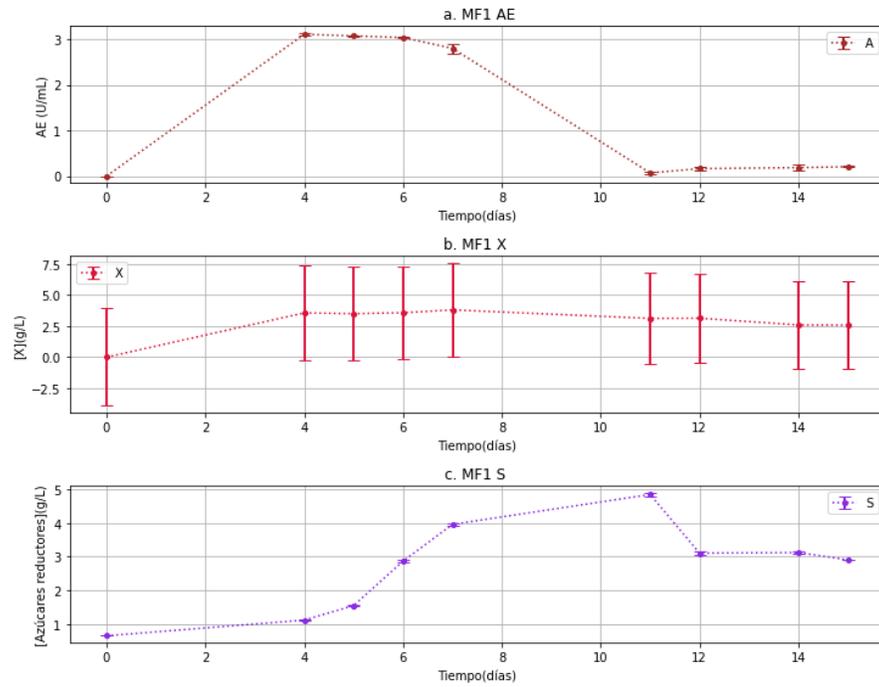
Nota. AE: actividad enzimática celulasa (FPU: celulasas totales), S: azúcares reductores liberados, X: biomasa generada

4.1.3 Cinéticas Amilasa

Las cinéticas asociadas la producción de la enzima amilasa se exponen en la **Figura 11**, en este caso la evaluación se hizo con la cepa MF1, siguiendo el criterio de selección con base a los resultados de la producción de celulasa (**Tabla 2**), considerando mayor rendimiento y productividad, a partir del análisis de varianza de medias (*valor-P*). Allí el sustrato empleado es almidón de papa de descarte.

Figura 11

Actividad Enzimática, Azúcares Reductores Liberados, Generación Biomasa - Amilasa



Nota. AE: actividad enzimática amilasa S: azúcares reductores liberados X: biomasa generada

4.2 Productividad y Rendimiento de las Enzimas

En la **Tabla 2** se presenta la productividad y rendimiento, dado los resultados obtenidos de actividad enzimática para las tres enzimas: lacasa, celulasa, y amilasa. De acuerdo con la metodología, los montajes se hicieron por triplicado para la evaluación de la producción de las enzimas, así que allí se reporta también la actividad enzimática promedio, y *valor-p*; a partir de estos resultados se realizó el análisis de varianza (ANOVA) empleando el software Minitab, con el objetivo de establecer si las medias de los resultados son estadísticamente significativas (*valor-p* < 0.05), realizando el análisis tomando como factor categórico el día de mayor producción de manera individual (para cada cepa). Adicional a ello, otro factor categórico fue la cepa, para analizar de manera global, la cepa de mayor producción de enzima. La variable de respuesta en ambos casos fue la actividad enzimática.

Tabla 2*Productividad y Rendimiento*

Lacasa							
Cepa	AE UL ⁻¹	Valor-P**	Productividad			Rendimiento	
			Día-mayor Productividad	Productividad	Error	Yx/s	Yp/s
HF1	1226.27	0 ⁺	10	122.62	29.13	22.24	1196.30
HF2	780.397	0.550	3	260.13	232.31	10.32	14.87
HF3	540.238	0.760	6	90.04	89.86	11.05	278.33
HF4	1174.52	0.001 ⁺	6	165.01	42.60	0.82	364.19
MF1	1362.30	0.019 ⁺	7	194.61	97.33	8.48	327.18
SF1	8.17	0 ⁺	10	0.82	0.13	345.40	35.42
Análisis varianza- Factor Cepas						0.212*	
Celulasa							
Cepa	FPU mL ⁻¹	Valor-P**	Productividad			Rendimiento	
			Día-mayor Productividad	Productividad	Error	Yx/s	Yp/s
MF1	0.13	0.071	9	0.02	0.01	14.71	0.06
HF2	0.07	0.298	9	0.01	0.00	21.93	0.01
Análisis varianza - Factor Cepas						0.296*	
Amilasa							
Cepa	E U mL ⁻¹	Valor-P**	Productividad			Rendimiento	
			Día-mayor Productividad	Productividad	Error	Yx/s	Yp/s
MF1	3.11	0 ⁺	4	0.78	0.01	1.14	0.09

Nota. Las unidades de productividad corresponde a: U L⁻¹ día⁻¹ para lacasa, FPU mL⁻¹ día⁻¹ para celulasa, U mL⁻¹ día⁻¹ para amilasa. U se refiere unidades de actividad, Yx/s: rendimiento biomasa en azúcares reductores liberados (unidades: gramos de biomasa/g de azúcares liberados), Yp/s: rendimiento producto (enzima) en azúcares reductores liberados (unidades: U enzima /g de azúcares liberados). *se refiere al valor-p que se obtuvo tras análisis estadístico ANOVA, del factor categórico Cepas (análisis global). ** se refiere al valor-p donde el factor categórico es el día de producción de la enzima. ⁺ indica el valor-p < 0.05.

4.3 Purificación y Concentración de Enzima

Se realizó la purificación y concentración de la enzima lacasa, dado que los resultados obtenidos de productividad y rendimiento (con base en el análisis estadístico) (ver **Tabla 2**), sugieren que esta enzima fue la de mayor producción.

En la **Tabla 3** se reporta la concentración de la enzima lacasa, empelando dos métodos diferentes, ultrafiltración y precipitación por sulfato de amonio, los resultados que se presentan obedecen a las condiciones y metodología planteada para cada uno de los ensayos. El extracto enzimático se obtuvo tras filtrar el medio de producción para lacasa, se hizo la lectura de la actividad enzimática, antes y después de someter el extracto a los procesos de concentración.

Tabla 3

Concentración Enzima Lacasa

		Ultrafiltración		AE Extracto (UL ⁻¹)
VCF	AFC	R %	AE* (UL ⁻¹)	
2.6	1.38	53.33	1281.31	
		Precipitación sulfato de amonio		
	% saturación		AE*(UL ⁻¹)	
	90		1020.24	924.05
	60		477.98	
	35		202.62	

Nota. Para el proceso de ultrafiltración se calcula VCF: factor de concentración volumétrico, AFC: factor de concentración de actividad, R: eficiencia de recuperación. En el proceso de precipitación sulfato de amonio, el % de saturación hace referencia a la saturación de sulfato de amonio. AE extracto: es la actividad enzimática inicial del extracto antes de iniciar los procesos de concentración. AE*: corresponde a la actividad enzimática al finalizar los procesos.

4.4 Aplicación Decoloración de Colorantes

El ensayo de aplicación de decoloración de colorantes se realizó con el extracto de la enzima lacasa, el cual paso por el proceso de purificación y concentración, siguiendo el método de ultrafiltración.

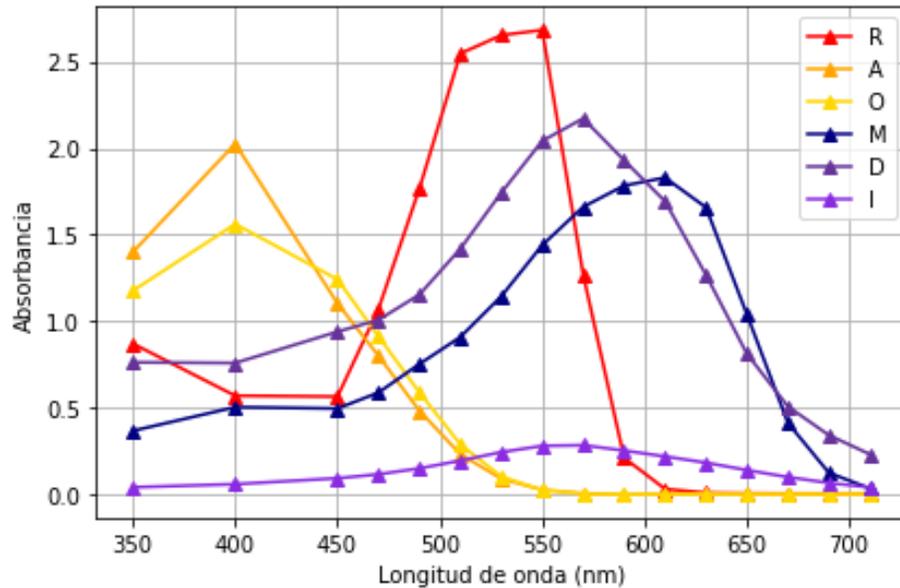
Los resultados del ensayo de aplicación de la enzima concentrada lacasa se encuentran en la **Tabla 4**, donde se presenta los colorantes evaluados y la longitud de onda máxima de estos, dado el espectro de absorción obtenido (**Figura 12**). A partir del porcentaje de decoloración como variables de respuesta, se realiza el análisis de variancia, en este caso el factor categórico corresponde al colorante.

Tabla 4

Degradación de Colorantes por Enzima Lacasa

Colorante	Longitud de Onda (nm)	%Decoloración-promedio	Error
Rojo efdacron	550	74.74	1.63
Amarillo elianamida	400	56.51	0.68
Amarillo oro efdacron	400	59.35	1.05
Marino efdacron	610	75.95	0.62
Azul oscuro directo	570	76.75	3.27
Azul oscuro iris	570	80.43	2.61
Análisis varianza - Factor Colorante			0*

Nota. *se refiere al valor-p que se obtuvo tras análisis estadístico ANOVA, del factor categórico Colorante.

Figura 12*Espectro de Absorción Colorantes*

Nota. Colorantes evaluados, R: rojo efdacron, A: amarillo elianamina, O: amarillo oro efdacron, M: marino efdacron, D: azul oscuro directo, I: azul oscuro iris.

4.5 Caracterización de Residuos - Substratos

En la **Tabla 5**, se presenta el análisis de fibra de los tallos de crisantemo tratados, se hace énfasis en que los resultados del análisis corresponden a 100 g de muestra. En cuanto a la caracterización de los tallos de crisantemo se determina la composición en base seca en términos de celulosa, lignina y hemicelulosa, para la papa de descarte se presenta el porcentaje de almidón; los resultados se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 5*Análisis Residuos de Crisantemo*

Análisis	Resultado en 100 g de muestra (g)	Método de análisis	Documento normativo
Cenizas	5.94	Gravimétrico	ISO 5984:2002
Fibra (detergente ácido)	67.2	Gravimétrico	PRE-006 V01:2019 Numeral 2.1
Fibra en detergente neutro tratada con amilasa	81.3	Gravimétrico	PRE-006 V01:2019 Numeral 2.1
Humedad y otras materias volátiles	14.1	Gravimétrico	PRE-002 V00:2018

Tabla 6*Caracterización de los Residuos*

Caracterización residuos crisantemo (composición en base seca g/100g)	
Celulosa	26.75
Lignina	40.45
Hemicelulosa	14.1
Caracterización papa descarte	
% Almidón	7.03

5 Análisis y Discusión de Resultados

5.1 Producción de Enzima Lacasa

En esta investigación las seis cepas evaluadas presentan actividad enzimática lacasa, en el medio donde la fuente de carbono corresponde a residuos de crisantemo. Las cepas HF1, HF4 y MF1, reportan actividad lacasa por encima de las 1000 UL⁻¹ (ver **Figura 7**), en los días 10, 6, y 7, respectivamente; lo que está asociado a los días en los que se obtuvo la mayor productividad, esto se confirma con el análisis estadístico de varianza, donde hay una diferencia estadísticamente significativa (valor-p < 0.05) para el factor categórico de días de producción, esto para las cepas mencionadas anteriormente (ver **Tabla 2**, sección **lacasa**).

Las cepas MF1 (1362.30 UL⁻¹), HF1 (1226.27 UL⁻¹) y HF4 (1174.52 UL⁻¹), que presentaron una mayor producción de la enzima, son del genero *Trichoderma* sp., de acuerdo con la bibliografía existen amplios reportes en donde los hongos de pudrición blanca pueden producir diversas cantidades de lacasa, incluso se ha encontrado que nuevas especies de ascomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos pueden producir esta enzima (Du et al., 2018).

Respecto a estudios que se enfocan en la diversidad genética y metabólica de cepas *Trichoderma*, se plantea que el crecimiento rápido con potencial de producción lacasa es una característica presente en las especies de hongos que pertenecen a este género (Kubicek et al., 2003). Así que en trabajos como el de Umar (2021), se evalúa la producción de lacasas por diferentes especies de *Trichoderma*, allí la mayor producción la presento *T. atroviride* (2.62 U mL⁻¹). *Trichoderma cremeum* y *T. longipile* mostraron una potencia de lacasa media, mientras que *T. beinartii* tiene una capacidad de secreción de lacasa débil (Umar, 2021); en este caso el medio de cultivo fue medio basal (medio básico sin agar).

En búsqueda de mejorar la producción de la enzima lacasa de origen fúngico, Omeje et al (2020) reportaron el uso de diferentes residuos agroindustriales, la máxima actividad lacasa (336 ± 11.31 UL⁻¹) se obtuvo al utilizar la cascara de maní, la cepa evaluada fue *Aspergillus* (Omeje et al., 2020), este y otros estudios sugieren el uso de biomasa lignocelulósica como sustrato, con el objetivo de estimular la producción de la enzima (Han et al., 2021).

Wang et al, concluye en su trabajo que usar desechos lignocelulósicos como sustratos de fermentación es una alternativa viable para reducir costos de producción, lo cual ha representado una limitante para la aplicación a nivel industrial de la enzima lacasa (F. Wang et al., 2019). En algunos estudios se reporta que las cepas microbianas productoras de lacasa, pueden degradar la

lignina de una manera eficaz debido a que liberan un potente sistema extracelular de enzimas degradadoras de la lignina (Martani et al., 2017). En la producción de lacasa a partir de la adición de lignina, se han reportado resultados relevantes, como el de actividades enzimáticas correspondientes a 1009.49 UL^{-1} , adicionando un hidrolizado que contenía lignina de tallo de maíz a un medio para el hongo *Trametes versicolor* (Adekunle et al., 2017). Investigaciones realizadas por Gómez et al, donde se evalúan dos residuos, evidencia que los niveles de lacasa en cultivos con salvado de cebada (1799.6 UL^{-1}) son dos veces más altos que los de cultivos con cáscara de castaña (959.8 UL^{-1}) (Gómez et al., 2005).

En comparación con las revisiones bibliográficas consultadas para la presente investigación, los resultados que se obtuvieron de los montajes en cuestión, en torno a la actividad enzimática lacasa que presentan las cepas *Trichoderma* sp. (MF1, HF4 & HF1); estos se consideran positivos y altos, los cuales se atribuyen a la influencia de la composición de los residuos de crisantemo. La caracterización de los tallos de crisantemo se presenta en la **Tabla 6**, en mayor proporción se tiene lignina (40.45 g/100g), seguido de celulosa (26.75 g/100g) y finalmente hemicelulosa (14.1 g/100g).

Autores expresan que los substratos relacionados estructuralmente con la lignina o derivados de la lignina, activan un metabolismo secundario responsable de una mejor producción de enzimas lignolíticas, entre ellas lacasa (Debnath & Saha, 2020).

Ahora bien, es importe analizar el crecimiento de las cepas y su relación con la actividad enzimática. SF1 presentan una generación de biomasa sobre los 30 g L^{-1} (ver **Figura 9**, subfigura **a**), mientras las cepas HF1, HF4, y MF1 que reportaron mayor actividad enzimática lacasa, muestran una generación de biomasa menor (ver **Figura 9**, subfiguras **b**, **c**, **f**), esto influye en los valores de rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$) obtenidos, reportados en la **Tabla 2**, donde se determina que un mayor rendimiento de biomasa en azúcares reductores liberados, no está directamente relacionado con la producción de la enzima lacasa, pues las condiciones y el medio de cultivo inciden no solo en el crecimiento de la cepa, sino también en la producción de la enzima. En este caso SF1 pertenece al género *Aspergillus* sp., dado los resultados se tiene en cuenta que el medio de cultivo y las condiciones del mismo, no favorecieron la producción de la enzima para este hongo, en la misma proporción que para las otras cepas; pero sí contribuyeron a su crecimiento.

El rendimiento de producto se realizó en base a los azúcares reductores liberados (ver **Tabla 2**, sección **lacasa**), los mayores rendimientos se presentan para las cepas de mayor actividad lacasa (HF1, HF4, MF1), lo cual se relaciona con el comportamiento de los azúcares reductores en la cinética (ver **Figura 8**). Se puede observar como para las cepas MF1, HF1, HF2, HF3 y HF4, se produce un aumento de azúcares reductores, lo cual se asocia con la liberación de azúcares que hacen parte del sustrato (tallos de crisantemo); también se aprecia que entre los días 6 y 8, estos azúcares se consumen progresivamente, lo que tiene relación con los días en los cuales se alcanza el máximo de productividad de las cepas.

Con base al comportamiento de los azúcares reductores, Gómez y otros autores (2005) en su estudio emplean salvado de cebada y cascara de castaña para suplementar sus cultivos, se reporta un aumento inicial de azúcares, y perfiles de comportamiento análogos para ambos sustratos, sin embargo tiene un consumo total de azúcares en el medio con cascara de castaña, mientras que en salvado, se mantiene un valor residual aproximado de 1 g L^{-1} , concluye a partir de estos resultados que el hongo *Corioloopsis rigida*, tiene la capacidad de metabolizar los hidratos de carbono contenidos en ambos sustratos (Gómez et al., 2005).

Si bien las cepas *Trichoderma* sp. , representan la mayor actividad enzimática lacasa (HF1, HF2, HF4 y MF1), también la cepa del género *Penicillium* sp. (HF3), cuenta con una actividad importante (540 UL^{-1}), de manera que se realizó un análisis de varianza adicional con un solo factor categórico, en este caso la cepa; y la variable de respuesta fue la actividad enzimática, el análisis arrojó un *valor-p* mayor a 0.05 (*valor-p* = 0.212), de manera que estadísticamente en cuanto a la producción de la enzima lacasa no hay una diferencia significativa entre las cepas, así que las seis cepas evaluadas son potenciales productoras de la enzima lacasa. Esto se confirma con el criterio de búsqueda que se había establecido inicialmente en la base de datos NCBI, donde se indica que estas cepas presentan en su genoma genes que codifican para la enzima lacasa.

A partir de los resultados obtenidos de producción de lacasa, se establece evaluar la producción de la enzima celulasa en dos cepas, una de ellas MF1, dado que presentó la mayor actividad lacasa y se toma de referencia el día de mayor producción, teniendo en cuenta que este fue significativo estadísticamente. La otra cepa seleccionada es HF2, por presentar la productividad más alta, se alcanzó un pico importante de producción de enzima en el día 3.

5.2 Producción de Enzima Celulasa

La cinética completa para la producción celulasa en el medio con residuos de crisantemo se presenta en la **Figura 10**, la actividad celulasa máxima, está por debajo de los 0.15 FPU mL^{-1} para las cepas evaluadas, MF1 (0.13 FPU mL^{-1}) y HF2 (0.07 FPU mL^{-1}) (ver **Figura 10**, subgráficas: **a**, **b**). Al comparar los resultados de actividad y determinar la productividad (ver **Tabla 2**, sección celulasa), se concluye que esta, es baja; ya que se reportan valores de 0.02 y $0.01 \text{ FPU mL}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Adicional a ello, entre los días de evaluación, cuando estos se toman como factor categórico, no hay una significancia estadística frente a la actividad celulasa obtenida (valor- $p > 0.05$), al igual que ocurre cuando se comparan las cepas. La generación de biomasa es cercana a los 4 g L^{-1} , esta se mantiene estable durante el desarrollo de la cinética (ver **Figura 10**, subfiguras: **e**, **f**), se relaciona con el comportamiento de los azúcares reductores liberados (ver **Figura 10**, subfiguras: **c**, **d**) donde se observan picos y valles, que se asocian a la liberación y también consumo de estos azúcares, lo que influye en que se mantenga el crecimiento de las cepas; así pues se explica que los rendimientos que se alcanzan de biomasa en azúcares liberados Y_x/s sean mayores frente los rendimientos de producto (enzima celulasa) en azúcares liberados Y_p/s . No hay una producción significativa de la enzima celulasa.

Entre los factores que interfieren en la producción de enzimas celulasa, se encuentra la temperatura, estudios informan que temperaturas entre los 32 y 35 °C presenta una inhibición en la producción de la enzima, lo que se debe a pérdida del contenido de humedad del substrato de fermentación, siendo un inconveniente para el crecimiento de los hongos y su actividad metabólica (Hu et al., 2018), en la presente investigación la temperatura a la que se sometieron los montajes experimentales fue de 30 °C .

En el presente desarrollo experimental el pretratamiento, el tipo y la concentración de substrato, junto con el tamaño de partícula, temperatura, y pH; pueden incidir en la baja producción celulasas, de acuerdo con otras investigaciones, los factores mencionados anteriormente influyen en la eficiencia de las celulasas y su aplicación en la reacción de hidrólisis enzimática (Srivastava et al., 2022).

5.3 Producción de Enzima Amilasa

Para esta enzima como se menciona en la metodología la fuente de carbono es almidón, que se obtuvo de papa de descarte. La papa que se empleó como punto de partida, de acuerdo a la caracterización contiene 12 % de almidón. Para este caso se evaluó la cepa MF1 del género *Trichoderma* sp, presentando actividad enzimática máxima en el día 4, de 3.11 U m L⁻¹ (ver **Figura 11**), al observar la cinética completa, los azúcares reductores liberados aumentan a partir del día 4, lo que se relaciona con el aumento en la actividad enzimática y a su vez con que el crecimiento se mantenga estable desde ese día, hasta aproximadamente el día 8 (ver **Figura 11**, subfiguras **a, b, c**).

Al observar los resultados de productividad y rendimiento (ver **Tabla 2**, sección **amilasa**), se da validez estadística a que el día 4 es el de mayor productividad, pues existe una diferencia significativa entre los demás días evaluados, respecto a la actividad enzimática obtenida (*valor-p* <0.05), sin embargo los rendimientos están por debajo de lo que se obtuvo para la enzima lacasa.

Algunos trabajos de investigaciones han demostrado que las especies asociadas al género *Trichoderma* cuentan con la capacidad de generar cantidades representativas de amilasa extracelular y glucoamilasa en el almidón de papa soluble (De Azevedo et al., 2000; De Marco et al., 2003), pero para llegar a producir la enzima con altos rendimientos, es importante la optimización de los medios de cultivo, como se ha mencionado anteriormente. Autores exponen que la producción de la enzima amilasa en los hongos, depende del estado morfológico y metabólico del cultivo, un ejemplo de ello es que el crecimiento del micelio es crucial para las enzimas extracelulares (Carlsen et al., 1996); otras investigaciones también resaltan la naturaleza y la cantidad de la fuente de carbono en los medios de cultivo, ya que afecta el crecimiento de la biomasa y la producción de la enzima (Sunitha et al., 2012).

Singh et al (2014), evaluó como sustrato cascara de granada y salvado de trigo, en donde la cascara de granada presentó la máxima actividad amilasa, adicionalmente se evaluaron otras condiciones en donde la enzima presenta una mayor actividad, como resultado encontraron un pH óptimo de 6, temperatura de 55 °C y tiempo de incubación de 60 minutos, lo anterior se evaluó sobre la cepa *Apergillus fumigatus* (S. Singh et al., 2014).

5.4 Concentración Enzima Lacasa

La concentración de la enzima lacasa por el método de ultrafiltración se considera satisfactoria, dado que la actividad enzimática final (1281.31 UL^{-1}) que se alcanzó tras el proceso, supera a la inicial (924.05 UL^{-1}), esto se asocia al resultado de eficiencia de recuperación de la enzima, pues está por encima del 50 % (ver **Tabla 3**). De acuerdo con la bibliografía, el que no se haya presentado un porcentaje mayor de recuperación tiene relación con la presencia de impurezas, ocasionando la formación de incrustaciones en la membrana, afectando así la concentración, y por tanto los factores de concentración volumétrico y el de concentración de actividad; los cuales son considerados bajos, respecto a otros ensayos reportados, pues los valores del ACF que se consiguen en dichos estudios, están alrededor de 14, en estos casos se pueden alcanzar porcentajes de recuperación enzimática superiores al 100 %, donde el aumento de actividad enzimática se asocia más allá de la concentración de la enzima, a factores como la extracción de compuestos inhibidores presentes en el medio (Zaccaria et al., 2019).

El método de concentración a partir de saturación por sulfato de amonio consigue al igual que la ultrafiltración, aumentar el valor de actividad enzimática (1020.24 UL^{-1}), esto cuando el porcentaje de saturación es del 90%, pues con concentraciones más bajas, esta actividad tiende a disminuir frente a la actividad inicial. En otras investigaciones se logró una actividad enzimática de 1605.73 UL^{-1} , con una saturación de sulfato de amonio del 70 %, allí se evaluó la producción de la enzima lacasa en especies del género *Aspergillus* (Omeje et al., 2020). La concentración por este método también puede ser efectiva, sin embargo es importante tener en cuenta, que las sales hacen interferencia y pueden precipitar otras proteínas, así que es necesario tener en cuenta un proceso de diálisis del concentrado enzimático.

5.5 Degradación de Colorantes por Enzima Lacasa

La aplicación final de la enzima concentrada por el método de ultrafiltración se lleva a cabo sobre seis colorantes, tres de ellos de tipo azoico (rojo efdacron, amarillo elianamida, azul oscuro directo), un antraquinona (azul oscuro iris), un aromático policíclico (amarillo oro efdacron), y uno de tipo carbohidrazina (marino efdacron). Se determinó la clasificación de los colorante según su estructura (ver sección **3.10.1 Estructura de los Colorantes Evaluados**).

De acuerdo con la bibliografía los colorantes de tipo azoicos constituyen el mayor grupo de colorantes utilizados en la industria textil, estos se caracterizan por la presencia de uno o más

azocromóforos y también los enlaces entre dos o más anillos aromáticos; en cuanto a los tintes de antraquinona, estos representan la segunda clase más importante, tienen los grupos cromóforos, formando un complejo de antraquinona (A. B. dos Santos et al., 2007; Jamal et al., 2011). Partiendo de los resultados obtenidos, los colorantes que presentan un porcentaje mayor de decoloración corresponden a colorantes antraquinona y azoico.

Los seis colorantes evaluados presentaron un porcentaje de decoloración superior al 50 %, el colorante Azul oscuro iris obtuvo el mayor porcentaje de decoloración (80.43 %), seguido de azul oscuro directo (76.75 %), marino efdacron (75.95 %), rojo efdacron (74.74 %), amarillo oro efdacron (59.35%) y amarillo elianamida (56.51 %); resultados que se presentan en la **Tabla 4**. De acuerdo con el análisis de varianza, las diferencias sobre el porcentaje de decoloración son estadísticamente significativas, entre los colorantes empleados. Los resultados de decoloración alcanzados se asocian a que la enzima lacasa escienden los colorantes azoicos y antraquinonas, formando a su vez moléculas de nitrógeno que no se consideran tóxicas (Zille et al., 2005).

Se reportan trabajos de investigación donde se evalúa la degradación del colorante antraquinona: remazol brilliant blue R, por parte de la enzima lacasa de *Phomopsis*, allí la decoloración alcanza 53,61 % (Navada et al., 2018).

Estudios similares se han enfocado en evaluar el potencial de decoloración de la enzima lacasa sobre colorantes sintéticos, en un caso específico se evaluó la decoloración de seis colorantes azoicos (azo yellow 6, acid red 337, basic blue 22, Azo purple, azo yellow y azo brilliant black) donde se demuestra que la enzima lacasa parcialmente purificada de *Aspergillus* sp. , decoloraba los colorantes después de 60 minutos de incubación. Allí se obtuvieron porcentajes por encima del 60 % de decoloración en los colorantes evaluados. La enzima presenta una alta afinidad por los enlaces azoicos (Omeje et al., 2020).

De acuerdo con diferentes revisiones bibliográfica, las enzimas lacasa se estudian con gran interés por el potencial de degradación de colorantes azoicos (Blánquez et al., 2004; Chivukula & Renganathan, 1995; Martins et al., 2003; Novotný et al., 2004). Se reporta que estas enzimas siendo fenol oxidasas multicobre, pueden decolorar los colorantes azo a través de un mecanismo de radicales libres altamente inespecífico, donde se da paso a la formación de compuestos

fenólicos, y se evita la formación de aminas aromáticas que resultan ser tóxicas (Chivukula & Renganathan, 1995; Wong & Yu, 1999; Zille et al., 2005).

Retomando los resultados obtenidos en este trabajo, la diferencia entre los porcentajes de decoloración de colorantes evaluados, se asocia a la estructura química de cada uno, ya que esta confiere características a los colorantes, como lo son: resistencia a la biodegradación, toxicidad y resistencia a los procesos reductores (Jamal et al., 2011), de manera que la acción reductora de la enzima fue mayor sobre el colorante antraquinona (azul oscuro iris). Es importante destacar que la enzima lacasa en este estudio logró decolorar no solo los colorantes antraquinona y azoicos, sino también colorantes asociados a compuestos aromáticos policíclicos y carbohidrazina.

6 Conclusiones

La evaluación de producción de la enzima lacasa empleando como fuente de carbono residuos de crisantemo, permitió obtener resultados de relevancia dado los valores de actividad enzimática alcanzados, los cuales fueron significativos para las cepas del género *Trichoderma* sp., reportando actividad lacasa por encima de la 1000 UL⁻¹, donde destaca MF1 con una actividad de 1362.30 UL⁻¹. En esta investigación se concluye que entre los días 6 y 10 se presenta la productividad más alta, así que son claves en el seguimiento de la actividad enzimática.

Los resultados obtenidos indican una relación favorable entre la actividad de la enzima lacasa y la adición de los tallos de crisantemo, ya que la composición de estos residuos en términos de lignina, celulosa y hemicelulosa, estimula la producción de la enzima.

De acuerdo al análisis y discusión de resultados, la actividad de estas cepas iguala y está por encima de la actividad que se reporta en otras investigaciones donde los substratos son residuos agroindustriales y las cepas evaluadas corresponden a especies del género *Trichoderma*.

Los antecedentes confirman el interés de trabajar con residuos agroindustriales, principalmente ligninolíticos, pues presentan resultados de mayor producción enzimática, frente a cuando se utilizan substratos convencionales.

Respecto a la evaluación de la producción de la enzima celulasa, la actividad máxima fue de 0.13 FPU mL⁻¹, esto para la cepa MF1, el día de mayor productividades es el 9. Como se menciona en el análisis previo, se consideran valores bajos de actividad frente a lo reportado en la literatura. En este ensayo se evaluaron dos cepas (MF1 y HF2), para las cuales el medio con residuos de crisantemo no presentó un efecto directo en la producción de celulasa. Se considera que los parámetros establecidos en torno a la formulación del medio y condiciones como la temperatura, agitación, pH, pueden estar afectando la actividad enzimática. Por ello es importante en próximos ensayos una optimización estadística, esto con el fin de determinar los niveles clave de los parámetros y así mejorar el rendimiento de la enzima, no solo para celulasa, sino también para lacasa y amilasa.

En cuanto a la evaluación de la producción de la enzima amilasa, donde la fuente de carbono es almidón de papa de descarte, la cepa MF1 alcanzó una actividad enzimática de 3.11 U mL⁻¹, esto en el día 4 (mayor productividad), los valores de rendimiento y la productividad obtenidos se consideraron bajos. Al igual que con la evaluación de la enzima celulasa, se asume

que los parámetros establecidos afectan la producción de la enzima, y de acuerdo con la bibliografía, pueden estar asociados a inhibición del producto.

Puesto que la enzima que destaco en su producción fue lacasa, al concentrar el extracto enzimático de esta, se determinó que el método de ultrafiltración es el más conveniente para la concentración de la enzima, dado que la actividad enzimática lacasa en el extracto, tras el paso por la membrana de ultrafiltración fue mayor (1281.31 UL^{-1}), frente al proceso de saturación con sulfato de amonio (1020.24 UL^{-1}). Adicionalmente, por el método de ultrafiltración se obtuvo un porcentaje de recuperación de la enzima lacasa superior al 50 %.

El extracto enzimático de lacasa concentrado en esta investigación, tiene la capacidad de degradar colorantes sintéticos de tipo azo y antraquinona, pues alcanza porcentajes de decoloración desde 56.51% (para amarillo elianamida) hasta 80.43 % (para azul oscuro iris), tras una hora de incubación a 37 °C.

A partir de los resultados obtenidos en esta investigación, se concluye que las cepas correspondientes a *Trichoderma* sp. presentan una capacidad promisoriosa en la producción de la enzima lacasa, la cual puede ser utilizada con el fin de degradar compuestos contaminantes, entre estos colorantes presentes en aguas residuales. Por ello es importante optimizar la producción de la enzima, evaluando medios de cultivo no convencionales que maximicen la biosíntesis de esta.

Referencias

- Abdel-Azeem, A. M., Yadav, A. N., Yadav, N., & Sharma, M. (2022). *Correction to: Industrially Important Fungi for Sustainable Development* (Vol. 2). https://doi.org/10.1007/978-3-030-85603-8_24
- Acharya, S., & Chaudhary, A. (2012). Bioprospecting thermophiles for cellulase production: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, *43*(3), 844–856. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000300001>
- Adekunle, A. E., Guo, C., & Liu, C. Z. (2017). Lignin-Enhanced Laccase Production from *Trametes versicolor*. *Waste and Biomass Valorization*. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9680-4>
- Adney, B., & Baker, J. (2008). Measurement of cellulase activities laboratory. *Technical Report NREL/TP-510-42628*.
- Agarwal, M., Goel, A., & Wati, L. (2018). Ethanol Production from Paddy Straw using Partially Purified Fungal Cellulase. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.708.376>
- Aguero de Oliveira, A., Silvestre, M., Ferreira, H., Rodrigues, A., Fossa da Paz, M., Graciano, G., & Ribeiro, R. (2015). Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts. *African Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.5897/ajb2014.14062>
- Anto, H., Trivedi, U. B., & Patel, K. C. (2006). Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.007>
- Arora, D. S., & Sandhu, D. K. (1984). Laccase production and wood degradation by *Trametes hirsuta*. *Folia Microbiologica*. <https://doi.org/10.1007/BF02875963>
- Bankeeree, W., Prasongsuk, S., Imai, T., Lotrakul, P., & Punnapayak, H. (2016). A novel xylan-polyvinyl alcohol hydrogel bead with laccase entrapment for decolorization of Reactive Black 5. *BioResources*. <https://doi.org/10.15376/biores.11.3.6984-7000>
- Behera, B. C., Sethi, B. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017). Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *15*(1), 197–210. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.001>

- Blánquez, P., Casas, N., Font, X., Gabarrell, X., Sarrà, M., Caminal, G., & Vicent, T. (2004). Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.01.019>
- Bourbonnais, R., Paice, M. G., Reid, I. D., Lanthier, P., & Yaguchi, M. (1995). Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(5), 1876–1880. <https://doi.org/10.1128/aem.61.5.1876-1880.1995>
- Cardona, C. A., & Sánchez, Ó. J. (2007). Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. In *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.002>
- Carlsen, M., Nielsen, J., & Villadsen, J. (1996). Growth and α -amylase production by *Aspergillus oryzae* during continuous cultivations. *Journal of Biotechnology*. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00147-6](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00147-6)
- Chandel, A. K., Chandrasekhar, G., Silva, M. B., & Silvério Da Silva, S. (2012). The realm of cellulases in biorefinery development. *Critical Reviews in Biotechnology*, *32*(3), 187–202. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.595385>
- Chen, J., Chen, L., Xie, F., & Li, X. (2019). Drug delivery applications of starch biopolymer derivatives. In *Drug Delivery Applications of Starch Biopolymer Derivatives*. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-3657-7>
- Cheryan, M. (1998). Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. In *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. <https://doi.org/10.1201/9781482278743>
- Chivukula, M., & Renganathan, V. (1995). Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.61.12.4374-4377.1995>
- Chmelová, D., & Ondrejovič, M. (2016). Purification and characterization of extracellular laccase produced by *Ceriporiopsis subvermispora* and decolorization of triphenylmethane dyes. *Journal of Basic Microbiology*. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600152>
- Dadwal, A., Sharma, S., & Satyanarayana, T. (2019). Diversity in cellulose-degrading microbes and their cellulases: Role in ecosystem sustainability and potential applications. In *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications: Volume 2. Soil &*

- Agroecosystems*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8487-5_15
- De Azevedo, A. M. C., De Marco, J. L., & Felix, C. R. (2000). Characterization of an amylase produced by a *Trichoderma harzianum* isolate with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. *FEMS Microbiology Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00231-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00231-7)
- De Marco, J. L., Valadares-Inglis, M. C., & Felix, C. R. (2003). Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822003000100008>
- de Souza, P. M., & Magalhães, P. de O. (2010). Application of microbial α -amylase in industry - a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850–861. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822010000400004>
- Debnath, R., & Saha, T. (2020). An insight into the production strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26(May), 101645. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101645>
- dos Santos, A. B., Cervantes, F. J., & van Lier, J. B. (2007). Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology*, 98(12), 2369–2385. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.013>
- Du, W., Sun, C., Wang, J., Wang, B., Yao, Z., Qu, F., Xia, J., Xie, W., Sun, J., & Duan, D. (2018). Isolation, identification of a laccase-producing fungal strain and enzymatic properties of the laccase. *3 Biotech*. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1149-7>
- El-Fallal, A., Abou, M., El-Sayed, A., & Omar, N. (2012). Starch and Microbial α -Amylases: From Concepts to Biotechnological Applications. In *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. <https://doi.org/10.5772/51571>
- Fang, X., & Qu, Y. (2018). Fungal cellulolytic enzymes: Microbial production and application. In *Fungal Cellulolytic Enzymes: Microbial Production and Application*. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-0749-2>
- Fedepapa, & FNFP. (2021). *Boletín Regional Antioquia* (Vol. 5, p. 10). www.fedepapa.com
- Froehner, S. C., & Eriksson, K. E. (1974). Induction of *Neurospora crassa* laccase with protein synthesis inhibitors. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/jb.120.1.450-457.1974>
- Ghosh, S., Godoy, L., Anchang, K. Y., Achilonu, C. C., & Gryzenhout, M. (2021). *Fungal*

- Cellulases: Current Research and Future Challenges*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85603-8_7
- Gómez, J., Pazos, M., Couto, S. R., & Sanromán, M. Á. (2005). Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid-state conditions. *Journal of Food Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.06.005>
- Gooch, J. (2011). Whiteness Index In: Encyclopedic Dictionary of Polymers. In *Encyclopedic Dictionary of Polymers*.
- Han, M. L., Yang, J., Liu, Z. Y., Wang, C. R., Chen, S. Y., Han, N., Hao, W. Y., An, Q., & Dai, Y. C. (2021). Evaluation of Laccase Activities by Three Newly Isolated Fungal Species in Submerged Fermentation With Single or Mixed Lignocellulosic Wastes. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682679>
- Hu, Y., Du, C., Pensupa, N., & Lin, C. S. K. (2018). Optimisation of fungal cellulase production from textile waste using experimental design. *Process Safety and Environmental Protection*. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.06.009>
- Jamal, F., Qidwai, T., Pandey, P. K., Singh, R., & Singh, S. (2011). Azo and anthraquinone dye decolorization in relation to its molecular structure using soluble *Trichosanthes dioica* peroxidase supplemented with redox mediator. *Catalysis Communications*, 12(13), 1218–1223. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2011.04.012>
- Kantelinen, A., Hatakka, A., & Viikari, L. (1989). Production of lignin peroxidase and laccase by *Phlebia radiata*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/BF00258401>
- Kohli, I., Joshi, N. C., & Varma, A. (2020). Production, purification and applications of raw starch degrading and calcium-independent α -amylase from soil rich in extremophile. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.160>
- Kubicek, C. P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C., & Szakacs, G. (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: A case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology*. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00583-2](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00583-2)
- Kumar, A., & Chandra, R. (2020). Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. In *Heliyon*. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03170>
- Madhu, A., & Chakraborty, J. N. (2017). Developments in application of enzymes for textile

- processing. In *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.01.013>
- Mäkelä, M. R., Bredeweg, E. L., Magnuson, J. K., Baker, S. E., de Vries, R. P., & Hildén, K. (2017). Fungal ligninolytic enzymes and their applications. In *The Fungal Kingdom*. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch52>
- Martani, F., Beltrametti, F., Porro, D., Branduardi, P., & Lotti, M. (2017). The importance of fermentative conditions for the biotechnological production of lignin modifying enzymes from white-rot fungi. In *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNX134>
- Martins, M. A. M., Lima, N., Silvestre, A. J. D., & Queiroz, M. J. (2003). Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. *Chemosphere*. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00286-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00286-8)
- Marulanda Giraldo, L. F., & Silva Duque, A. (2021). *Residuos orgánicos generados en el oriente antioqueño como fuente potencial para la producción de biogás*. [trabajo de grado, Universidad de San Buenaventura, Medellín]. Biblioteca Digital Universidad de San Buenaventura Colombia.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mitidieri, S., Souza Martinelli, A. H., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2006). Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.022>
- Montoya-Castrillón, M., Serna-Vasco, K. J., Pinilla, L., Quiceno-Rico, J. M., Cardona-Bermúdez, L. M., & Osorio-Echavarría, J. (2021). Isolation and characterization of filamentous fungi from wood and soil samples of “La Lorena”, Sonsón, Antioquia (Colombia), natural reserve. *DYNA (Colombia)*, 88(219), 171–180. <https://doi.org/10.15446/dyna.v88n219.96144>
- Müller, A., Kowalczyk, J. E., & Mäkelä, M. R. (2021). Applications of Fungal Cellulases. *Encyclopedia of Mycology*, 295–304. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819990-9.00044-5>
- Navada, K. K., Sanjeev, G., & Kulal, A. (2018). Enhanced biodegradation and kinetics of anthraquinone dye by laccase from an electron beam irradiated endophytic fungus. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 132(January), 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.04.012>

- Novotný, Č., Svobodová, K., Kasinath, A., & Erbanová, P. (2004). Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.06.003>
- Oliveira, H. M., Pinheiro, A. Q., Fonseca, A. J. M., Cabrita, A. R. J., & Maia, M. R. G. (2019). Flexible and expeditious assay for quantitative monitoring of alpha-amylase and amyloglucosidase activities. *MethodsX*, 6, 246–258. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.01.007>
- Omeje, K. O., Nnolim, N. E., Ezema, B. O., Ozioko, J. N., & Eze, S. O. O. (2020). Synthetic dyes decolorization potential of agroindustrial waste-derived thermo-active laccase from *Aspergillus* species. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101800>
- Pointing, S. B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1–2), 20–33. <https://doi.org/10.1007/s002530100745>
- Pozdnyakova, N. N., Rodakiewicz-Nowak, J., & Turkovskaya, O. V. (2004). Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.03.005>
- Rai, M., & Kövics, G. (2010). Progress in mycology. In *Progress in Mycology*. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-3713-8>
- Rodríguez-Couto, S. (2019). *Fungal Laccase: A Versatile Enzyme for Biotechnological Applications*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_13
- Rodríguez Couto, S., & Toca Herrera, J. L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, 24(5), 500–513. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.04.003>
- Roth, C., Moroz, O. V., Turkenburg, J. P., Blagova, E., Waterman, J., Ariza, A., Ming, L., Tianqi, S., Andersen, C., Davies, G. J., & Wilson, K. S. (2019). Structural and functional characterization of three novel fungal amylases with enhanced stability and ph tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms20194902>
- Saini, S., & Sharma, K. K. (2021). Ligninolytic Fungi from the Indian Subcontinent and Their Contribution to Enzyme Biotechnology. In *Progress in Mycology*. https://doi.org/10.1007/978-981-16-3307-2_6
- Saleem, A., & Ebrahim, M. K. H. (2014). Production of amylase by fungi isolated from legume

- seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. *Journal of Taibah University for Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2013.09.002>
- Santos, F. A., Carvalho-Gonçalves, L. C. T. de, Cardoso-Simões, A. L. de C., & Santos, S. F. de M. (2021). Evaluation of the production of cellulases by *Penicillium* sp. FSDE15 using corncob and wheat bran as substrates. *Bioresource Technology Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100648>
- Sharma, K. K., & Kuhad, R. C. (2008). Laccase: Enzyme revisited and function redefined. In *Indian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0028-z>
- Silano, V., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Brüscheiler, B. J., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M., Grob, K., Lampi, E., Mortensen, A., Rivière, G., Steffensen, I. L., Tlustos, C., Van Loveren, H., Vernis, L., Zorn, H., Glandorf, B., Herman, L., Aguilera, J., & Chesson, A. (2019). Characterisation of microorganisms used for the production of food enzymes. *EFSA Journal*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5741>
- Simmonds, N. W. (1977). Relations between specific gravity, dry matter content and starch content of potatoes. *Potato Research*. <https://doi.org/10.1007/BF02360274>
- Singh, A., Bajar, S., Devi, A., & Pant, D. (2021). An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresource Technology Reports*, 14(October 2020), 100652. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100652>
- Singh, S., Singh, S., Bali, V., Sharma, L., & Mangla, J. (2014). Production of fungal amylases using cheap, readily available agriresidues, for potential application in textile industry. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2014/215748>
- Siva, D., Srivethi, G., Vasan, P. T., Rajesh, D., Alfarhan, A., & Rajagopal, R. (2022). Enhanced cellulase enzyme production by *Aspergillus niger* using cellulase/iron oxide magnetic nanocomposites. *Journal of King Saud University - Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101695>
- Srivastava, N., Singh, R., Srivastava, M., Syed, A., Bahadur Pal, D., Bahkali, A. H., Mishra, P. K., & Gupta, V. K. (2022). Impact of mixed lignocellulosic substrate and fungal consortia to enhance cellulase production and its application in NiFe₂O₄ nanoparticles mediated enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126560>
- Srivastava, N., Srivastava, M., Mishra, P. K., Gupta, V. K., Molina, G., Rodriguez-Couto, S.,

- Manikanta, A., & Ramteke, P. W. (2018). Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82(September 2017), 2379–2386. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.074>
- Sunitha, V. H., Ramesha, A., Savitha, J., & Srinivas, C. (2012). Amylase production by endophytic fungi *Cylindrocephalum* sp. isolated from medicinal plant *Alpinia calcarata* (Haw.) Roscoe. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 1213–1221. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000300049>
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2007). Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources*.
- Tanaka, T., Tonosaki, T., Nose, M., Tomidokoro, N., Kadomura, N., Fujii, T., & Taniguchi, M. (2001). Treatment of Model Soils Contaminated with Phenolic Endocrine-Disrupting Chemicals with Laccase from *Trametes* sp. in a Rotating Reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(4), 312–316. <https://doi.org/10.1263/jbb.92.312>
- Torres, E., Bustos-Jaimes, I., & Le Borgne, S. (2003). Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. In *Applied Catalysis B: Environmental*. [https://doi.org/10.1016/S0926-3373\(03\)00228-5](https://doi.org/10.1016/S0926-3373(03)00228-5)
- Umar, A. (2021). Screening and evaluation of laccase produced by different *Trichoderma* species along with their phylogenetic relationship. *Archives of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02420-5>
- Upadhyay, P., Shrivastava, R., & Agrawal, P. K. (2016). Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0316-3>
- Vaishnav, N., Singh, A., Adsul, M., Dixit, P., Sandhu, S. K., Mathur, A., Puri, S. K., & Singhania, R. R. (2018). *Penicillium*: The next emerging champion for cellulase production. In *Bioresource Technology Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.04.003>
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vanhulle, S., Trovaslet, M., Enaud, E., Lucas, M., Sonveaux, M., Decock, C., Onderwater, R., Schneider, Y. J., & Corbisier, A. M. (2008). Cytotoxicity and genotoxicity evolution during decolorization of dyes by White Rot Fungi. *World Journal of Microbiology and*

- Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9475-7>
- Wang, F., Xu, L., Zhao, L., Ding, Z., Ma, H., & Terry, N. (2019). Fungal laccase production from lignocellulosic agricultural wastes by solid-state fermentation: a review. *Microorganisms*, 7(12), 665.
- Wang, T., Ai, S., Zhou, Y., Luo, Z., Dai, C., Yang, Y., Zhang, J., Huang, H., Luo, S., & Luo, L. (2018). Adsorption of agricultural wastewater contaminated with antibiotics, pesticides and toxic metals by functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(5), 6468–6478. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.10.014>
- Wong, Y., & Yu, J. (1999). Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research*. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00066-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00066-4)
- Yang, X., Zhou, S., Li, M., Wang, R., & Zhao, Y. (2017). Purification of cellulase fermentation broth via low cost ceramic microfiltration membranes with nanofibers-like attapulgitic separation layers. *Separation and Purification Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.11.012>
- Yaseen, D. A., & Scholz, M. (2019). Textile dye wastewater characteristics and constituents of synthetic effluents: a critical review. In *International Journal of Environmental Science and Technology* (Vol. 16, Issue 2). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-2130-z>
- Zaccaria, S., Boff, N. A., Bettin, F., & Dillon, A. J. P. (2019). Use of micro- and ultrafiltration membranes for concentration of laccase-rich enzymatic extract of *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 and application in dye decolorization. *Chemical Papers*. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00845-3>
- Zapata, D., Barrera, M., Gómez, R., & Narajo, L. (2017). *Plan de Crecimiento Verde y Desarrollo Compatible con el Clima en el Oriente antioqueño* (p. 176). Alianza Clima y Desarrollo, Corporación Autónoma Regional de las cuencas de los ríos Negro y Nare, Fundación Natura. <https://www.cornare.gov.co>
- Zerva, A., Pentari, C., Ferousi, C., Nikolaiivits, E., Karnaouri, A., & Topakas, E. (2021). Recent advances on key enzymatic activities for the utilisation of lignocellulosic biomass. In *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126058>
- Zhu, J., Yan, C., Zhang, X., Yang, C., Jiang, M., & Zhang, X. (2020). A sustainable platform of lignin: From bioresources to materials and their applications in rechargeable batteries and

supercapacitors. *Progress in Energy and Combustion Science*, 76, 100788.
<https://doi.org/10.1016/j.pecs.2019.100788>

Zille, A., Gornacka, B., Rehorek, A., & Cavaco-Paulo, A. (2005). Degradation of azo dyes by *Trametes villosa* laccase over long periods of oxidative conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6711-6718.2005>