



Separación de tinta de papel impreso por actividad amilolítica microbiana

Ink separation from printed paper by microbial amyolytic activity

^{1,a}Delsy Espinal

^{2,b}Ariadna Zúñiga

^{3,c}Daladier Castillo

^{4,d}Roberto Castellanos

ARTÍCULO ORIGINAL

¹Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna. Perú.
E-mail: delsymirian@gmail.com

²Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna. Perú.
E-mail: ariadnazunigallanos@gmail.com

³Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna. Perú.
E-mail: dcastilloc@unjbg.edu.pe

⁴Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna. Perú.
E-mail: robertocastellanoscabrera@yahoo.es

^aORCID: 0000-0003-1363-5411

^bORCID: 0000-0001-6304-0745

^cORCID: 0000-0003-0133-5921

^dORCID 0000-0002-9021-412X

Palabras clave: Amilasa microbiana termoestable, desprendimiento de tinta, *Geobacillus thermoparaffinivorans*.

Keywords: Thermostable microbial amylase, ink detachment, *Geobacillus thermoparaffinivorans*.

Información adicional

Presentado: 09/09/2020

Aprobado: 29/12/2020

RESUMEN

En esta investigación se tuvo como objetivo la separación de tinta de papel impreso de oficina utilizando un microbio termófilo amilolítico. Se evaluaron los parámetros óptimos de pH, temperatura, concentración de enzima y de papel impreso para una máxima separación de tinta por la actividad amilolítica de *Geobacillus thermoparaffinivorans*, procedente de los géiseres de Tacna, Perú. Las amilasas fueron incubadas a un pH de 6, 70 °C, 1 % de concentración de papel, y 20 % de concentración de enzima. Se obtuvo una separación de tinta máximo del papel impreso de oficina de 0.570 mg ml⁻¹ a los 40 minutos con una máxima concentración de azúcares reductores de 0.275 mg ml⁻¹ a los 100 minutos.

ABSTRACT

The objective of this research was the separation of ink from printed office paper using an amyolytic thermophilic microbe. The optimal parameters of pH, temperature, enzyme concentration and printed paper for maximum ink separation were evaluated by the amyolytic activity of *Geobacillus thermoparaffinivorans* from the geysers of Tacna, Peru. Amylases were incubated at optimal values of pH 6, 70 °C, 1% paper concentration and 20% enzyme concentration. A maximum ink separation of the printed office paper of 0.570 mg ml⁻¹ was obtained at 40 minutes with a maximum reducing sugar concentration of 0.275 mg ml⁻¹ at 100 minutes.

INTRODUCCIÓN

La celulosa es un carbohidrato presente en la estructura de la pared celular de las células vegetales, formando parte de los componentes lignocelulósicos. Es extraída para obtener las fibras de celulosa para la producción de papel de plantas como los pinos, eucaliptos, ficus, caña de azúcar (Tejado *et al.*, 2012; Robles *et al.*, 2014; Fuentes *et al.*, 2015; Honorato *et al.*, 2016; Gonzalez *et al.*, 20016). La producción de papel está en un continuo crecimiento con un índice de consumo que aumenta vertiginosamente en el mundo y se espera para el 2020 llegue a los 566 millones de toneladas (Dovale, 2009).

El reciclado de la fibra de papel es utilizado para la fabricación de papel higiénico o cartón de baja calidad. Esto data desde el siglo XVII en Dinamarca, y se da a gran escala con la invención de la máquina de papel en el siglo XVIII, además de su perfeccionamiento e implementación progresiva en el siglo XIX (Sánchez, 2000). En los últimos 20 años, el reciclaje se ha incrementado de 5.9 a 45 millones de toneladas año⁻¹ (Costa & Rubio, 2005). La calidad de la fibra del papel reciclado aumenta en medida a su blancura, siendo la calidad menor cuando se presenta residuos de tinta (Ramírez *et al.*, 2018; Alliot *et al.*, 2004).

A lo largo de su vida, el ser humano desecha grandes proporciones de papel. Por tanto, su reciclaje tiene mucha importancia desde el punto de vista social, económico y ambiental. El empleo de la tecnología tradicional para reciclar el papel impreso trae diversos problemas, entre ellos los ambientales, pues emplea productos químicos tóxicos como agentes quelantes, peróxido de hidrógeno, hidróxido de sodio, agentes blanqueadores, surfactantes y silicato de sodio (Bobu & Ciolacu, 2008). La aplicación de la tecnología enzimática es una alternativa a la tecnología tradicional que permite separar la tinta del papel impreso empleando enzimas microbianas bajo un proceso ventajoso considerando el impacto económico, social y ambiental (Dorronsoro & Haute, 1998; Pala *et al.*, 2003; Chalá, 2013; Das *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2018).

En el destintado del papel, las enzimas actúan sobre las partículas de tinta o sobre el papel haciendo que la resistencia, la blancura y demás propiedades del papel sean mejoradas (Bajpai & Bajpai, 1998). Entre las enzimas empleadas para la separación de tinta de la fibra del papel están las celulasas, las hemicelulosas, las xilanasas, las amilasas, las lipasas (Das *et al.*, 2013; Desai & Iyer, 2016; Germinario *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2018). Las celulasas, las más comunes, hidrolizan la celulosa haciendo que se liberen las partículas de tinta impregnadas en el papel (Elegir *et al.*, 2000), haciendo que se obtenga un papel sin tinta con calidad mejorada, menos costo y menos consumo de energía (Dovale, 2009). Las enzimas lipasas, hemicelulasas o combinaciones de estas, han sido evaluadas para destintar diferentes tipos de papel de desperdicio (Lee *et al.*, 2006). Las amilasas en acción conjunta con las celulasas destintan las fibras recicladas de papel fotocopia (Chalá, 2013). La actividad enzimática de las amilasas está influenciada por el pH, nutrientes, tiempo de incubación y temperatura que en sus valores óptimos van a permitir una máxima actividad (Figen *et al.*, 2006; Das & Kayastha, 2019; Herrera *et al.*, 2019; Skoluda *et al.*, 2020).

En esta investigación se tuvo como objetivo la separación máxima de tinta de papel impreso de oficina utilizando un microbio termófilo amilolítico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de amilasas

Geobacillus thermoparaffinivorans, termófilo amilolítico, fue sembrado en agar nutritivo, replicado en 1 ml de caldo Luria Bertani (cloruro de sodio 10 gl⁻¹, extracto de levadura 5 gl⁻¹, peptona 10 gl⁻¹), incubado durante 24 horas a 60 °C y vertido en 4 ml de caldo Luria Bertani nuevo para su incubación a 60 °C hasta que estuvo en una densidad óptica de 0.3, determinada por espectrofotometría a 600 nm de longitud de onda. La

suspensión bacteriana amilolítica obtenida sirvió como inóculo para realizar la fermentación de producción de amilasas.

El inóculo amilolítico fue agregado al 5 % (v/v) a 50 ml de caldo almidón 1 % (almidón 10 g l⁻¹; extracto de levadura 5 g l⁻¹; peptona 5 g l⁻¹; MgSO₄ 0.5 g l⁻¹; NaCl 1 g l⁻¹; KH₂PO₄ 0.5 g l⁻¹; CaCl₂ 0.5 g l⁻¹; K₂HPO₄ 1.2 g l⁻¹) (Manoj, 2013), pH 7 e incubado con agitación orbital a 150 rpm a 60 °C por 60 horas, sacando alícuotas de 1.5 ml cada 12 horas que fueron centrifugadas a 10 000 rpm por 10 minutos para obtener un sobrenadante con las amilasas cuya actividad enzimática (U ml⁻¹) fue medida relacionándola con el tiempo de incubación (Miller, 1959; Karnwa & Nigam, 2013).

Determinación de los valores óptimos de pH, temperatura, concentración de papel impreso y concentración de amilasas para una máxima actividad amilolítica

Se prepararon, en matraces, soluciones tampón de acetato de sodio 50 mM pH 5 y de fosfato de sodio 50 mM pH 6, 7 y 8, a las cuales se agregó almidón para obtener soluciones de almidón 1 % (p/v) con el correspondiente pH de 5, 6, 7 y 8. Para cada pH, se utilizaron microtubos de 2 ml. En el primero se colocó 150 µl de tampón (blanco reactivo); en el segundo, 50 µl de tampón y 100 µl de solución de almidón (blanco sustrato); en el tercero 100 µl de tampón y 50 µl de extracto amilolítico (blanco enzima) (producido a las 36 horas); y en el cuarto, 100 µl de solución de almidón y 50 µl de amilasas (enzima sustrato) (producido a las 36 horas). Los microtubos fueron incubados a 60 °C durante 30 minutos y colocados en la nevera del frigider durante 2 minutos. Se agregó en cada uno 250 µl de reactivo DNS (Miller, 1959) y fueron puestos en baño maría (en estado de hervor) durante 5 minutos. A los microtubos, luego de ser enfriados, se les agregó 500 µl de agua destilada y fueron llevados al espectrofotómetro para leer sus absorbancias a 540 nm. La absorbancia real para cada pH se determinó restando la suma blanco enzima y blanco sustrato a la enzima sustrato seguido de la resta del blanco reactivo. En la curva patrón, la absorbancia real fue relacionada con la concentración de azúcares reductores para determinar la concentración de azúcar correspondiente. La actividad de la amilasa (Karnwa & Nigam, 2013) fue estimada aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad amilolítica (U ml}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Concentración de azúcar reductor} \times \text{Volumen total de reacción (ml)} \times \text{factor de dilución}}{\text{tiempo (minutos)} \times \text{vol. de enzima (ml)}}$$

U (unidad de actividad amilolítica) es la cantidad de 1 µmol de glucosa liberada por la enzima a partir del sustrato en un minuto bajo condiciones estándar de laboratorio.

Se preparó, en un matraz, la solución tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7 que sirvió como diluyente en otro matraz para la preparación de solución almidón 1 % (p/v); a partir de esta se hizo la distribución de la solución de almidón en otros matraces, en cada uno de los cuales se inoculó la enzima amilasa para que fueran incubadas a 50, 60, 70 y 80 °C para determinar el óptimo de temperatura de la actividad enzimática de la amilasa. La concentración de azúcar producto de la actividad amilolítica con su correspondiente actividad enzimática para cada temperatura fue determinada de manera similar a lo empleado para ver el valor óptimo del pH.

El papel impreso obtenido de las oficinas fue cortado en pedazos de aproximadamente 4 cm² de área, se pesó, y se colocó en el vaso de la licuadora al cual se le agregó buffer fosfato pH 6 en una cantidad proporcional a la cantidad de papel para que tuviera la concentración deseada de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 y 1.6 % (p/v). El papel se licuó durante 5 minutos. Estas suspensiones se diluyeron al 15 % (v/v) con la amilasa producido a las 36 horas. La actividad enzimática se determinó en microtubos de 2 ml para establecer el valor óptimo de

la concentración de papel impreso por triplicado, previa incubación a 70 °C durante 30 minutos (Miller, 1959; Karnwa & Nigam, 2013).

La amilasa obtenida fue diluida en matraces a concentraciones de 1, 5, 10, 15, 20 y 25 % (v/v) con el licuado de papel 1 % y luego determinada su actividad enzimática por triplicado en microtubos de 2 ml previa incubación a 70 °C durante 30 minutos, para determinar el valor de la concentración óptima de la amilasa para una mayor actividad enzimática (Miller, 1959; Karnwa & Nigam, 2013).

Separación de tinta del papel impreso bajo las condiciones óptimas de actividad enzimática de la amilasa

Las mejores concentraciones de la amilasa (10, 15 y 20 %) se diluyeron con el licuado de papel 1 % en matraces por triplicado (v/v). Estas diluciones por triplicado se incubaron a 70 °C hasta 200 minutos conjuntamente con un control constituido solo por licuado de papel 1 %. Los tiempos de evaluación de separación de tinta fueron cada 20 minutos desde el tiempo cero. Para la evaluación de separación de tinta del papel impreso, se extrajo de cada matraz 1 ml de muestra para ser centrifugada durante 10 minutos a 10 000 rpm, y luego llevadas al espectrofotómetro para la determinación de las absorbancias que fueron leídas con una longitud de onda de 300 nm. Las absorbancias fueron llevadas a la curva patrón para determinar la concentración de tinta desprendida del papel impreso.

La longitud de onda de 300 nm se determinó evaluando diferentes concentraciones de tinta (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg ml⁻¹) a diferentes longitudes de onda (260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 360, 370, 380, 390 y 400 nm) hasta que se obtuvo una absorbancia de 1.014 (valor más cercano a 1.0) que correspondió a la concentración de tinta de 0.4 mg ml⁻¹, obtenida en el lector de microplacas EPOCH 2T y que se tuvo en cuenta como máxima concentración de tinta que se empleó para la curva patrón.

Para establecer si se produjeron azúcares por la acción de las amilasas sobre el papel impreso, se extrajeron algunos microlitros del sobrenadante que contuvo la tinta desprendida del papel impreso; posteriormente, se determinó la concentración de azúcares según el protocolo del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959).

Tratamiento estadístico para los valores óptimos de pH, temperatura, concentración de papel impreso y concentración de amilasas para una máxima actividad amilolítica

Los datos obtenidos fueron graficados y sometidos al análisis de varianza y a la prueba de Tukey para determinar la máxima actividad enzimática con diferencia significativa y su correspondiente valor óptimo de pH, temperatura, concentración de papel impreso o de amilasas.

RESULTADOS

Actividad enzimática de la amilasa microbiana obtenida por cultivo sumergido

La amilasa obtenida de *Geobacillus thermoparaffinivorans*, actuando sobre el almidón a pH 7, 60 °C y a diferentes tiempos de incubación, mostró una actividad enzimática creciente inicialmente hasta un máximo de 3.438 U ml⁻¹ a las 36 horas, después fue disminuyendo progresivamente (Figura 1).

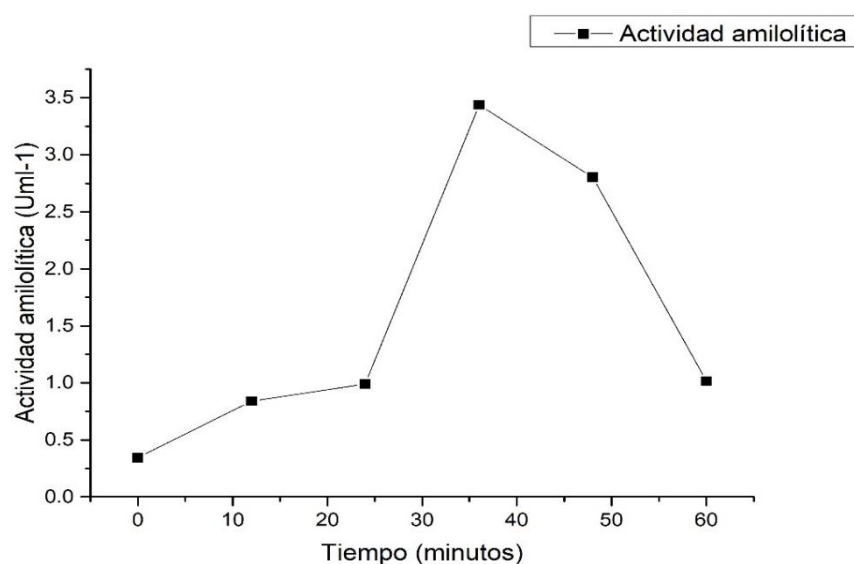


Figura 1. Actividad enzimática de la amilasa de *Geobacillus thermoparaffinivorans* a diferentes tiempos de incubación.

Valores óptimos de pH, temperatura, concentración de papel impreso y concentración de amilasa para una máxima actividad amilolítica

La amilasa microbiana, actuando sobre el almidón a 60°C y a diferentes valores de pH, mostró inicialmente una actividad enzimática creciente máxima de 2.852 U ml⁻¹ a pH 6, disminuyendo luego a medida que el pH aumentaba (Figura 2).

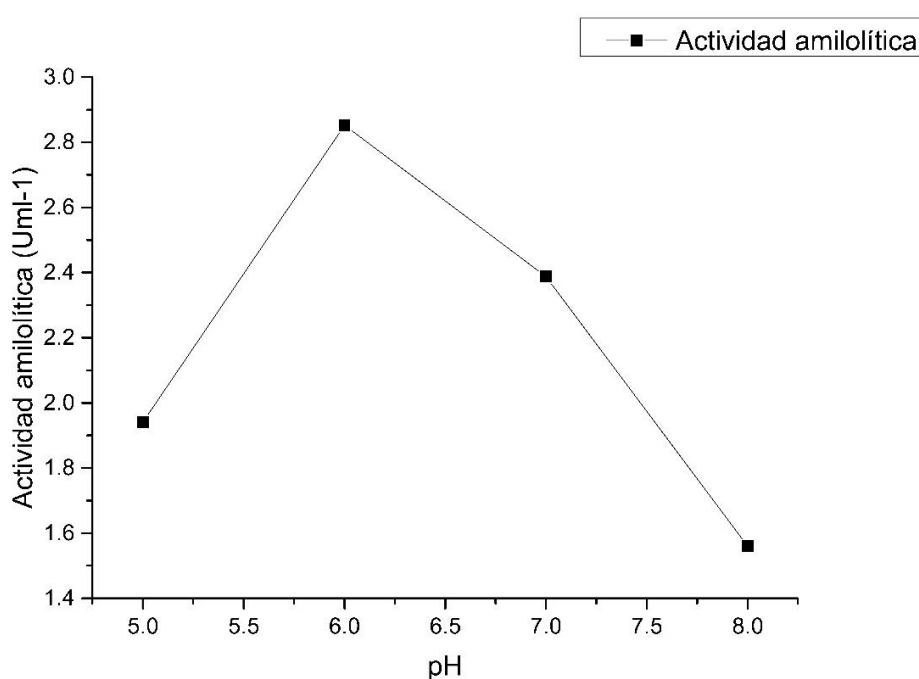


Figura 2. Actividad enzimática de la amilasa microbiana a diferentes valores de pH

La amilasa microbiana, actuando sobre el almidón a pH 7, mostró inicialmente una actividad enzimática creciente máxima de 3.063 U ml^{-1} a 70°C , disminuyendo luego a medida que la temperatura aumentaba (Figura 3).

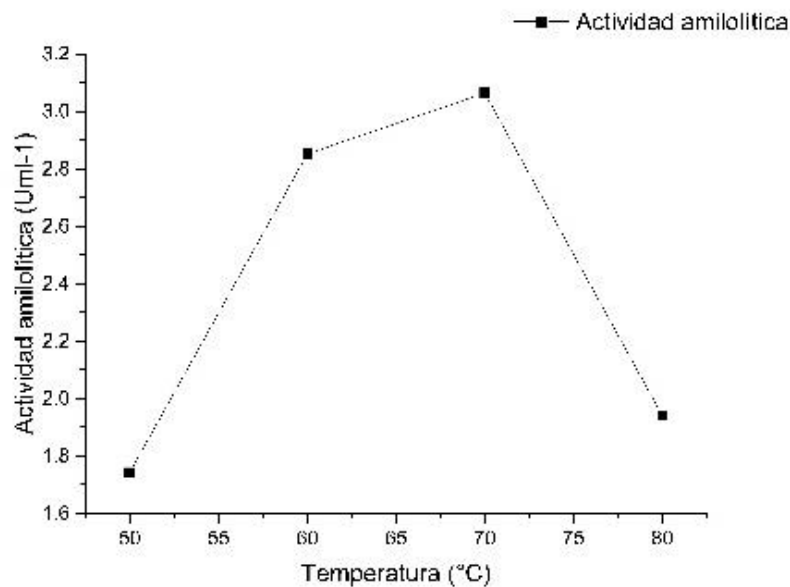


Figura 3. Actividad enzimática de la amilasa microbiana a diferentes valores de temperatura

La amilasa microbiana actuando sobre la suspensión de papel impreso licuado a 70°C , pH 6 y a diferentes valores de concentración del papel mostró inicialmente una actividad enzimática creciente máxima de 0.313 U ml^{-1} a la concentración de papel del 1 %, después disminuyó a medida que la concentración del papel aumentaba (Figura 4).

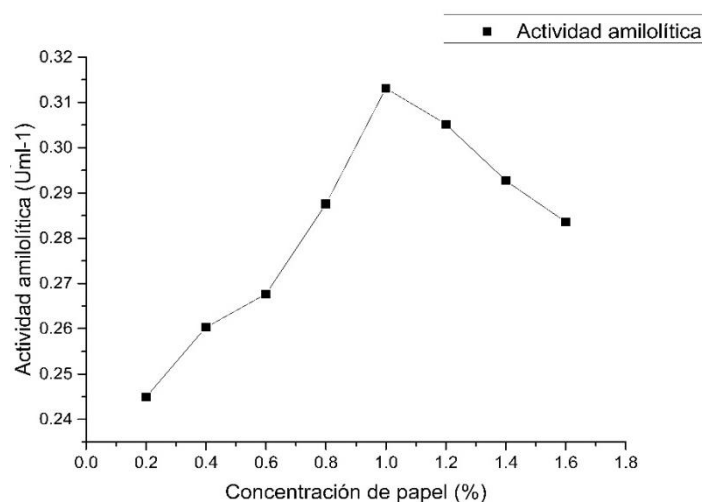


Figura 4. Actividad enzimática de la amilasa microbiana a diferentes concentraciones de papel impreso licuado

La amilasa microbiana, actuando sobre el papel impreso licuado 1 %, pH 7, 70°C y a diferentes concentraciones de amilasa microbiana, mostró inicialmente una actividad enzimática creciente máxima de 0.324 U ml^{-1} en la concentración de amilasa del 15 %, disminuyendo luego a medida que la concentración de la amilasa aumentaba (Figura 5).

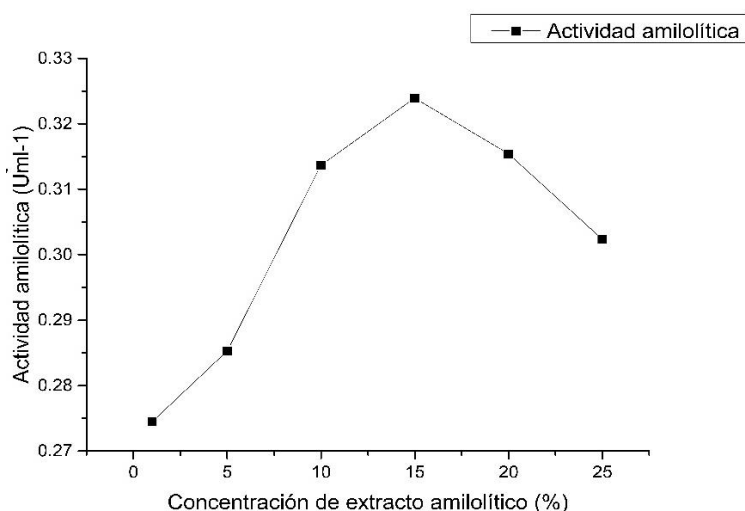


Figura 5. Actividad enzimática de la amilasa microbiana a diferentes concentraciones de la amilasa (extracto amilolítico).

Tinta separada del papel impreso bajo las condiciones óptimas de actividad enzimática de la amilasa

La amilasa microbiana, actuando sobre el papel impreso licuado 1 %, pH 7, 70°C y en tres diferentes concentraciones de amilasa microbiana, mostró una separación de tinta del papel máxima de 0.570 mg ml⁻¹ en la concentración de amilasa del 20 % a los 40 minutos (Figura 6).

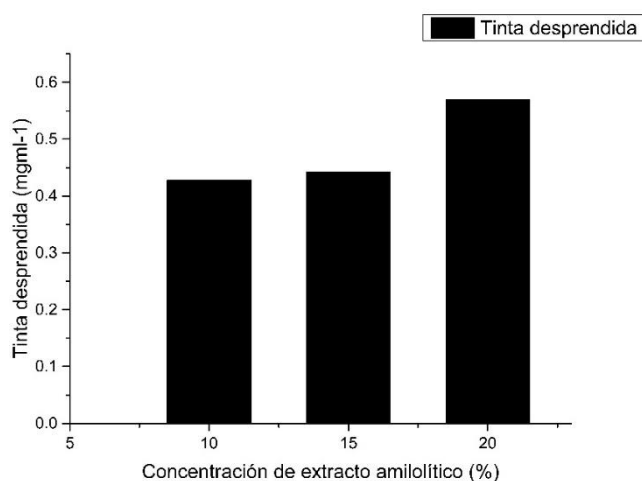


Figura 6. Tinta separada del papel impreso licuado por la amilasa microbiana (extracto amilolítico) en tres concentraciones diferentes

La amilasa microbiana actuando a una concentración del 20 % sobre el papel impreso licuado 1 %, pH 7, 70 °C y a diferentes tiempos de incubación, mostró inicialmente una creciente separación de tinta del papel máxima de 0.570 mg ml⁻¹ a los 40 minutos, disminuyendo a medida que el tiempo incrementaba (Figura 7).

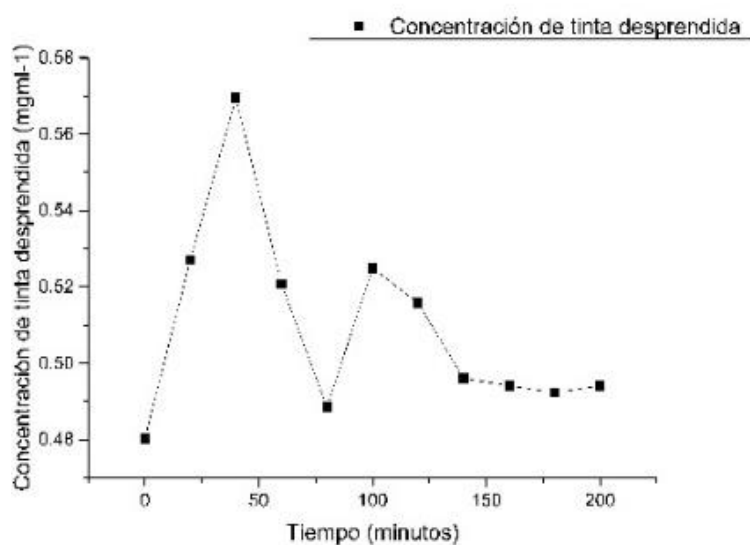


Figura 7. Tinta separada del papel impreso licuado por la amilasa microbiana a diferentes tiempos de incubación

La amilasa microbiana, actuando a una concentración del 20 % sobre el papel impreso licuado 1 %, pH 7, 70 °C y a diferentes tiempos de incubación, mostró inicialmente una creciente separación de azúcares reductores hasta un máximo de 0.275 mg ml⁻¹ a los 100 minutos. A medida que pasó el tiempo, la concentración de azúcares reductores se mantuvo casi constante (Figura 8).

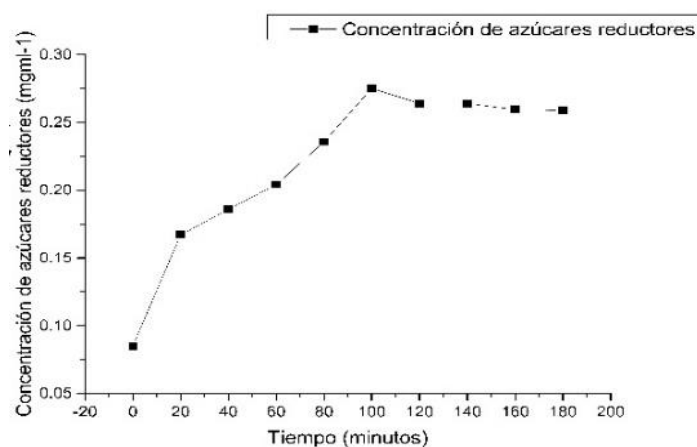


Figura 8. Azúcares reductores del papel impreso licuado separados por la amilasa microbiana a diferentes tiempos de incubación.

DISCUSIÓN

La mayor actividad enzimática de la amilasa microbiana obtenida de *Geobacillus thermoparaffinivorans* de 3.438 U ml⁻¹ es ligeramente menor a 3.50 U ml⁻¹ (Hasan *et al.*, 2017), pero mayor a 0.574 U ml⁻¹ (Kumar *et al.*, 2014), 0.75 U ml⁻¹ (Gusakov *et al.*, 2011), 0.75 U ml⁻¹ (Unal, 2015) y 0.46 U ml⁻¹ (Oyeleke *et al.*, 2010). Estas actividades enzimáticas corresponden a enzimas que provienen de microbios diferentes a *G. thermoparaffinivorans* y con distintos tiempos de incubación. La actividad amilolítica de 0.75 U ml⁻¹ es, por

ejemplo, de la amilasa de *Aspergillus terreus* con un tiempo de incubación de 7 días. La variación de la actividad amilolítica está influenciada por el pH, tiempo de incubación, temperatura y nutrientes (Figen *et al.*, 2006).

El valor de pH 6 encontrado como valor óptimo para la actividad amilolítica es inferior al de 7.5 de la amilasa de *Bacillus sp.* BCC021-50 (Ahmed *et al.*, 2017), al de 7.0 de la α -amilasa de *Geobacillus stearothermophilus* (Garrett & Grisham, 1999), pero similar al de 5.5-6.5 de la amilasa de *Thermus sp.* (Shaw *et al.*, 1995) y al de 5.5-6.0 de la amilasa de *Thermus filiformis* (Egas *et al.*, 1998). El rango de pH óptimo de la amilasa es de neutro a menos (Pandey *et al.*, 2000). El pH óptimo encontrado para una mayor actividad amilolítica en este trabajo es ligeramente ácido. Existen amilasas bacterianas que han mostrado un óptimo de actividad en el rango de 5 y 10.5 (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006).

El valor óptimo de 70 °C encontrado para la actividad amilolítica en este trabajo es inferior al de 95 °C de la amilasa de *Thermus filiformis* (Egas *et al.*, 1998), similar al de 70 °C de la amilasa de *Bacillus sp.* termófilo marino BCC 021-50 (Ahmed *et al.*, 2017), pero superior al de 60 °C de la amilasa de *Thermus sp.* (Fatoni & Zufahair, 2012). La enzima evaluada en este trabajo podría ser empleada en procesos industriales considerando que su actividad amilolítica máxima es a alta temperatura. La enzima termófila es importante en la industria, permite menor o nula contaminación microbiana, mejores condiciones de hidrólisis del sustrato y menores costos por enfriamiento (Burhan *et al.*, 2003). La actividad amilolítica a altas temperaturas nos demuestra que hay enzimas que no se desnaturalizan (Montor, 2013; Sivaramakrishnan *et al.*, 2006).

El valor óptimo del 1 % de concentración de papel encontrado, para que a través de la actividad enzimática de la amilasa se desprendiera el máximo de tinta, fue posible debido a la homogenización del papel por el licuado al que estuvo sometido en su preparación y por la homogenización de la enzima que actuó sobre el papel. La buena homogenización de la enzima para desprender la tinta del papel es muy importante (Lee *et al.*, 2007). El valor de 1 % de concentración del papel es un valor medio respecto a los otros valores evaluados, es posible que esto también haya ayudado a la separación de tinta. En un destintado convencional, a mayor consistencia del papel hay mayor fricción entre las fibras, y por ello el desprendimiento de tinta es mejor (Pelach *et al.*, 2003; Pala *et al.*, 2004).

La separación de tinta obtenida bajo condiciones óptimas de pH 6, 70 °C y 1 % de concentración de papel es un buen resultado. Existen varios reportes sobre destintado de papel. Por ejemplo, empleando amilasas que actuaron a 6.5 de pH, 65 °C y 0.85 % de concentración de papel, donde se explica que el destintado con amilasas produce debilitamiento de la estructura y por ende reducción de la resistencia del papel al ingreso de fluidos (López, 2000). En otros reportes se han utilizado α -amilasa bajo condiciones de pH 6.85 y de 65 °C (Hoyos y López, 2006). Del mismo modo, se han empleado celulasas y xilanasas bajo condiciones de pH 5.5, 50 °C y 2 % de concentración de papel en un tiempo de 60 minutos (Lee *et al.*, 2011). Asimismo, otros emplearon enzimas comerciales novozyme 342 (celulasa) y novozyme 51055 (α -amilasa), en una mezcla de 50:50, donde obtuvieron un buen destintado del papel a una concentración de 0.1 % de papel, pero con un tiempo de 180 minutos, considerado demasiado (Sulbarán *et al.*, 2014). Los valores óptimos obtenidos de concentración de amilasas de 20 % y tiempo de actividad amilolítica de 40 minutos son buenos para el destintado. En otra investigación, el destintado se ha logrado empleando más de 40 minutos (Sulbaran *et al.*, 2014). Por estos resultados, el microbio amilolítico empleado debe continuar estudiándose para su aplicación en la separación de tinta del papel impreso de oficina.

El mecanismo por el cual las amilasas destintan el papel provoca debilitamiento de la estructura en la superficie del papel y en consecuencia la poca resistencia ante penetración de fluidos (Alzate, 2013).

El valor máximo de 0.570 mg ml⁻¹ de tinta desprendida a los 40 minutos (Figura 7), cuando la producción de azúcares reductores (Figura 8) está por debajo de su valor máximo a los 100 minutos, permite deducir que la

actividad amilolítica se da solo hasta cierto tiempo de desprendimiento de azúcares reductores sin necesidad de que el valor de estos azúcares llegue a su máxima cantidad.

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen un aporte importante sobre el conocimiento y la aplicación potencial de una fuente microbiana nativa de Tacna productora de amilasas termófilas como una alternativa frente a otras fuentes, cuya utilización conllevan altos costos en el reciclamiento de papel impreso de oficina.

CONCLUSIONES

Se obtuvo separación de la tinta del papel impreso de oficina, empleando amilasa microbiana en la concentración máxima de 0.570 mg ml⁻¹ en un tiempo de incubación de 40 minutos con una concentración máxima de azúcares de 0.275 mg ml⁻¹ a los 100 minutos.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, por el apoyo al proyecto de investigación sobre “Producción de enzimas industriales a partir de microbios termófilos” (R.R. N° 3714-2018-UN/JBG), en beneficio al desarrollo de la presente investigación.

REFERENCIAS

- Ahmed, A., Khushk, I., Saltar, A., Aqeel, M., Ali, H., & Changrui, L. (2017). Amylase Production from Thermophilic *Bacillus* sp. BCC 021-50 Isolated from a Marine Environment. *Fermentation*, 3, 25. <http://dx.doi.org/10.3390/fermentation3020025>.
- Alliot, M., Avila, A., & Argentina, A. (2004). *Destintado de papel por flotación: influencia de los factores de forma. Desafíos ambientales y del saneamiento en el siglo XXI*. Buenos Aires. Argentina: AIDIS.
- Alzate, H., Dovale, A., Chala, V., Muñoz, O., Casas, A., & Quintana, G. (2013). Study of the enzymatic/neutral deinking process of waste photocopy paper. *Technical Article*, 74, 61-65.
- Bajpai, P., & Bajpai, P. (1998). Deinking with enzymes: a review. *Tappi Journal*, 111-117.
- Bobu, E., & Ciolacu, F. (2008). Deinkability of mixed prints: alkaline vs neutral deinking. *Progress in Paper Recycling*, 18, 23-31.
- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., & Osman, G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38, 1397-1403.
- Chalá, V. (2013). *Destintado de papel fotocopia con pretratamiento enzimático empleando celulasa y amilasa* (tesis de pregrado). Universidad Pontificia Bolivariana. Colombia.
- Costa, C., & Rubio, J. (2005). Deinking flotation: influence of calcium soap and surface-active substances. *Minerals Engineering*, 18(1), 59-64.
- Desai, D., & Iyer, B. (2016). Biodinking of old newspaper pulp using a cellulase-free xylanase preparation of *Aspergillus niger* DX-23. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 5: 78-85.
- Dorronsoro, R., & Haute, E. (1998). Las Enzimas en la Industria Papelera. *Ingeniería Química*.
- Das, A., Tanmay, P., Halder, S., Jana, A., Maity, Ch., Das, P., Bicas, P., & Mondal, K. (2013). Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus fumigatus* ABK9 in wheat bran-rice Straw mixed substrate and use of cocktail enzymes for deinking of waste office paper pulp. *Bioresour Technology*, 128, 290-296.
- Das, R., & Kayastha, A. (2019). Enzymatic hydrolysis of native granular starches by a new β - amylase from peanut (*Arachis hypogaea*). *Food chemistry*, 276, 583-590.
- Dovale, A. (2009). Evaluación del Proceso de Destintado Enzimático de Papel tipo (Mow Mixed Office Waste) empleando Celulasa. Medellín.

- Egas, M., Da Costa, M., Cowan, D., & Pires, E. (1998). Extracellular α -amylase from *Thermus filiformis* Ork A2: purification and biochemical characterization. *Extremophiles*, 2(1), 23-32.
- Elegir, G., Panizza, E., & Canetti, M. (2000). Neutral enzyme assisted deinking of xerographic office waste with a cellulase-amylase mixture. *Tappi Journal*, 40-44.
- Fatoni, A., & Zufahair. (2012). Thermophilic amylase from *Thermus* sp. isolation and its potential application for bioethanol production. *Songklanakarín J. Sci. Technol.*, 34 (5), 525-531.
- Figen, E., Bilal, B., Seda, B., & Tulin, A. (2006). Solid State Fermentation for the Production of α -Amylase from *Penicillium Chrysogenum* Using Mixed Agricultural By-Products as Substrate. *Section Cellular and Molecular Biology*, 657- 661. <http://dx.doi.org/10.2478/s11756-006-0137-2>.
- Fuentes, M., Jiménez, N., García, J., & Caamal, I. (2015). Evaluación de la sustentabilidad del sistema del papel amate. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6 (1), 125-138.
- Garrett, R., & Grisham, C. (1999). *Biochemistry*. Philadelphia, US: Saunder's College Publishing.
- Germinario, G., Van der werf, I., Palazzo, G., Regidor, J., Montes, R., & Sabbatini, L. (2017). Bioremoval of marker pen inks by exploiting lipase hydrolysis. *Progress in Organics Coatings*, 110, 162-171.
- Gonzalez, K., Daza, D., Caballero, P., & Martínez, Ch. (2016). Valuación de las propiedades físicas y químicas de residuos sólidos orgánicos a emplearse en la elaboración de papel. *Revista Luna Azúl*, 43, 499-517.
- Gusakov, A., Kondratyeva, E., & Sinitsyn, A. (2011). Comparación de dos métodos para analizar azúcares reductores en la determinación de las actividades de la carbohidrasa. *Revista Internacional de química analítica*.
- Hasan, M., Wal, L., Hosna, A., Hakim, A., & Kalam, A. (2017). Optimización de algunas condiciones de fermentación para la producción de amilasas extracelulares mediante el uso de aislamientos de *Chryseobacterium* y *Bacillus* a partir de desechos orgánicos de cocina. *Revista de ingeniería genética y biotecnología*, 15 (1), 59-68.
- Herrera, O., Fernández, M., Pilamala, M., Jácome, M., & Luzón, G. (2019). Stability studies of an amylase and a protease for cleaning processes in the food industry. *Food an Bioproducts Processing*, 117, 64-73.
- Honorato, J., Apolinar, F., & Colotl, G. (2016). Composición lignocelulósica de *Pinus ayacahuite* Ehrenb. Ex Schltdl., *P. leiophylla* Schlecht % Cham. y *P.herreriae* Martínez. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 7 (33), 47-56.
- Hoyos, J., & López, G. (2006). Destintado enzimático de papel impreso por el método offset. Medellín, 82 p. (tesis de pregrado). Universidad Pontificia Bolivariana.
- Karnwa, K., & Nigam, V. (2013). Production of amylase by isolated microorganisms and its application. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 3 (4), 354-360.
- Kumar, N., Rany, N., Gunaseeli, R., & Kannan, N. (2018). Paper pulp modification and deinking efficiency of cellulose-xylanase complex from *Escherichia coli* SD5. *International Journal of Biological macromolecules*, 111, 289-295.
- Kumar, S., Raut, S., Satpathy, S., Ranian, P., & Bandvopadhyay, B. (2014). Caracterización de nuevas bacterias termófilas productoras de amilasa de Taptapani Hot Spring, Odisha, India. *Jundishapur. J Microbiol.*, 7(12).
- Lee, C., Darah, I., & Ibrahim, C. (2006). Enzymatic deinking of laser printed office waste papers: Some governing parameters on deinking efficiency. *Bioresource Technology*, 98, 1684-1689. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.052>.
- Lee, C., Ibrahim, D., & Che Omar, I. (2011). Enzymatic and chemical deinking. *Bioresources*, 6(4).
- Lopez, D., Colom, J., Vidal, T., & Torres, A. (2000). *Aplicación previa de amilasas a la desintegración del papel reciclado*. Iberoamerican congress on pulp andpaper research.
- Manoj, N. (2013). Thermostable alpha-amylase enzyme production from *Bacillus laterosporus*: Statistical optimization, purification and characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 38-44.

- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.*, *31*, 426–429.
- Montor, J. (2013). Caracterización de amilasas producidas por bacterias de suelos cultivados con caña de azúcar (tesis de pregrado). Universidad de Papaloapan-México.
- Oyeleke, S., Auta, S., & Egwim, E. (2010). Production and characterization of amylase produced by *Bacillus megaterium* isolated from a local yam peel dumpsite in Minna, Niger State. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, *2*(7), 88-92.
- Pala, H., Mota, M., & Gama, F. (2003). Enzymatic versus chemical deinking of non-impact ink printed paper. *Journal of Biotechnology*, 79-89.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C., Soccol, V., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. (2). 135-152.
- Pelach, M., Pastor, F., Puig, J., Vilaseca, F., & Mutjé, P. (2003). Enzymatic deinking of old newspapers with cellulase. *Process Biochemistry*, *38*, 1063–1067. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00237-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00237-6)
- Ramírez, R., Ramírez, E., Carrillo, A., Dávalos, F., & Navarro, F. (2018). Destintado de papel de impresión laser con ultrasonido de acción intensiva, para obtener celulosa de alta pureza. *Rev. Méx. de Cienc. Forestales*, *9*(46).
- Robles, N., Saucedo, A., Delgado, E., Sanjuán, R., & Turrado, J. (2014). Efecto de las microfibras de celulosa sobre papel con alto contenido de fibra reciclada. *Rev. Mex. Cien. For.*, *5* (24), 70-79.
- Sánchez, L. (2000). El reciclado de papel. *Ingeniería Química*, *32* (367), 101-108.
- Shaw, J., Lin, F., Chen, S., & Chen, H. (1995). Purification and properties of an extracellular α -amylase from *Thermus* sp. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, *36*, 195-200.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K., Soccol, C., & Pandey, A. (2006). α -Amylases from microbial sources—an overview on recent developments. *Food Technol Biotechnol*, *44*(2), 173-184.
- Skoluda, N., Dhrami, I., & Nater, U. (2020). Factors contributing to stability and instability in alpha-amylase activity in dilute saliva samples over time. *Psychoneuroendocrinology*, *121*: 104847.
- Sulbarán, B., Turrado, J., Delgado, E., Rojas, O., & Venditti, R. (2014). Destintado en medio neutro de papel reciclado aplicando mezclas de enzimas celulasa y α -amilasas. *European Scientific Journal*.
- Tejado, A., Alam, M., Antal, M., Yang, H., & Ven, T. (2012). Energy requirements for the disintegration of cellulose fibers into cellulose nanofibers. *Cellulose*, *19*, 831-842.
- Unal, A. (2015). Production of α -amylase from some thermophilic aspergillus species and optimization of its culture medium and enzyme activity. *Academic journals*, *14* (47), 31709-3183.