UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE GUANAJUATO

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

Producción de celulasas y bioetanol a partir de películas de celulosa regenerada degradadas por *Pleurotus ostreatus* y *Saccharomyces cerevisiae*

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

Presenta

ING. SUSANA CHÁVEZ AGUIRRE

DIRECTOR DE TESIS

M.C. GUILLERMO ARZATE MARTÍNEZ

Diciembre de 2016 **Cortázar, Gto, México.**

COORDINACIÓN GENERAL DE UNIVERSIDADES TECNOLÓGICAS y POLITÉCNICAS

Universidad Politécnica de Guanajuato

Maestría en Ciencias en Biotecnología Agroalimentaria

Producción de celulasas y bioetanol a partir de películas de celulosa regenerada degradadas por *Pleurotus ostreatus* y *Saccharomyces cerevisiae*.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el el grado de

Maestro en Ciencias en Biotecnología Agroalimentaria

Presenta:

Ing. Susana Chávez Aguirre

Dirigido Por:

M. en C. Guillermo Arzate Martínez

Sinodales:

M. en C. Guillermo Arzate Martínez Director Interno	Firma
Dr. Arturo Salinas Martínez Director Externo	Firma
Dr. Lorenzo Jarquín Enríquez Asesor Interno	Firma
Dr. Miguel David Dufoo Hurtado Asesor Externo	Firma

Cortázar, Gto.
México
21 de diciembre de 2016

Cortázar, Gto., a 14 de diciembre de 2016.
Asunto: Impresión de tesis
Oficio No.: MCBA-043-2016

ING. SUSANA CHÁVEZ AGUIRRE
NÚMERO DE MATRÍCULA: 14019002
P R E S E N T E

De acuerdo al reglamento en vigor y tomando en cuenta el dictamen emitido por el jurado que le fue asignado para la revisión de su documento de tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biotecnología Agroalimentaria, se le informa que se ha AUTORIZADO LA IMPRESIÓN del trabajo titulado:

"Producción de celulasas y bioetanol a partir de películas de celulosa regenerada degradadas por *Pleurotus ostreatus* y *Saccharomyces cerevisiae*"

Sin más por el momento, me despido de Usted comentándole que este oficio firmado por los integrantes de su comité, debe ser incluido en el documento.

A T E N T A M E N T E

M. en C. Guillermo Arzate Martínez
Director interno

Dr. Arturo Salinas Martínez
Asesor

Dr. Lorenzo Jarquín Enríquez
Asesor

Dr. Miguel David Dufoo Hurtado
Asesor

Dr. Arturo Salinas Martínez
Coordinador MCBA

Maestría en Ciencias en Biotecnología Agroalimentaria

C.c.p. Archivo

Dedicatorias

La presente tesis se la dedico antes que nada a dios por todo lo que me ha dado.

A mis padres Rosario Aguirre Huerta y Roberto Chávez Hernández, que son mi motor para luchar día a día, por haberme dado la vida, por apoyarme a lo largo de mi carrera, por darme la fuerza para seguir adelante.

A mis hermanos Juan y Carmen por estar siempre a mi lado en las buenas y en las malas, dándome tanta felicidad.

A mis amigos que estuvieron siempre apoyándome.

A mi asesor por el tiempo y apoyo brindado.

A la Empacadora Celaya por abrirme las puertas para poder llevar a cabo el proyecto.

Agradecimientos

Agradezco a mi familia, amigos y personas especiales en mi vida que están presentes en todos mis logros y fracasos.

Quiero agradecer a la Universidad Politécnica de Guanajuato por abrirme nuevamente sus puertas para seguir con mi crecimiento profesional.

A mi asesor Guillermo Arzate Martínez por brindarme su tiempo para poder llevar a cabo este proyecto, así como sus conocimientos.

También quiero agradecer a Jaime Gómez Castillo por haberme abierto las puertas en la Empacadora Celaya para poder realizar el proyecto, brindándome la materia prima para poder realizarlo.

A mis maestros que estuvieron presentes en estos 2 años de la carrera por sus enseñanzas.

A mis amigos Francisco y Miguel que siempre estuvieron apoyándome y dando ánimos para poder continuar con este nuevo reto. Con los cuales me llevo recuerdos que siempre quedarán en mi memoria.

Y en general gracias a todos los que de alguna manera fueron parte de esta etapa que está concluyendo, gracias por sus enseñanzas.

Gracias a Dios por darme nuevas oportunidades.

Resumen

El tratamiento y disposición de residuos agroindustriales representa actualmente una preocupación a nivel mundial, debido a que la cantidad de los mismos ha aumentado en años recientes. Es por esto que hoy en día se busca una mejor manera de poder aprovechar estos residuos para resolver problemas ambientales.

Las películas de celulosa regenerada son usadas en la industria cárnica para dar forma a los embutidos durante su cocción; después de ser utilizadas, constituyen un residuo al cual no se da tratamiento alguno y su integración al medio ambiente representa un problema, debido a que su degradación de manera natural es lenta. En este trabajo, se han utilizado éstas películas como sustrato para su fermentación en estado sólido empleando una cepa de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus)* con el objetivo de obtener productos de interés como azúcares reductores, celulasas y etanol.

Las fermentaciones fueron llevadas a cabo con medios enriquecidos con un lixiviado de papa y dextrosa, ácido acético, ácido sórbico, sales de calcio y nutrientes que incluían sulfatos de magnesio, hierro, manganeso, zinc y calcio. Las fermentaciones se mantuvieron por 44 días en los cuales se estuvieron monitoreando los productos de interés. El tratamiento llevado a cabo con la adición de papa dextrosa fue el que mayor pérdida de peso tuvo (20.6%), indicando una mayor degradación del residuo. En todos los tratamientos se obtuvieron extractos con una concentración máxima de entre 1.20 y 1.28 g de azúcares reductores/L a los 20 días; además, del tratamiento enriquecido con papa y dextrosa se obtuvo el extracto con una actividad enzimática máxima de 0.029 UI/mL y en los tratamientos con ácido acético y papa-dextrosa tras concentrar el extracto obtenido, se obtuvieron concentraciones finales de etanol de 18.5 y 17.2 g de etanol/L respectivamente.

Palabras clave—fermentación en estado sólido; celulasas; *Pleurotus ostreatus*; películas de celulosa regenerada, azúcares reductores, etanol.

Abstract

The treatment and disposition of agro industrial residues represent a global concern nowadays because its amount has increased in recent years. For this reason, it is mandatory to search for different ways to reuse these residues to solve the environmental problems.

The regenerated cellulose casings are used on the meat industry to encase the sausages while they are cooked; after their utilization, they are disposed without any treatment and their integration to the environment is slow. In this work, we used this residue as a substrate to solid-state fermentation with an edible fungus such as *Pleurotus ostreatus*, with the purpose of obtaining valuable products such as reducing sugars, cellulases and ethanol.

The fermentations were carried out with different treatments in which the growth media compositions were enriched with a potato-dextrose solution, acetic acid, sorbic acid, calcium salts and nutrients that included magnesium, iron, manganese, zinc and calcium sulfates, during 44 days in which the concentrations of the products were determined. The treatment with the potato dextrose solution was the one that produced a higher weight loss (20.6%), indicating a higher degradation of the residue. In all of the cases, the maximum concentration of reducing sugars in the extracts ranged from 1.2 to 1.28 grams of reducing sugars per liter at 20th day. The extract obtained from the treatment enriched with potato-dextrose had the highest value of enzymatic activity (0.029 IU/mL). The highest ethanol concentrations obtained after a *Saccharomyces cerevisiae* alcoholic fermentation performed over the concentrated extracts were observed in the acetic acid and potato-dextrose treatments with values of 18.5 y 17.2 grams of ethanol per liter respectively.

Key words – Solid-state fermentation; cellulases; *Pleurotus ostreatus*, regenerated cellulose casings, reducing sugars, ethanol

ÍNDICE

1. Introducción.....1
1.1. Descripción del problema. 1
1.2. Planteamiento del Problema.....2
1.3. Marco de referencia.....2
1.3.1. Tratamiento de Residuos Agroindustriales.....2
1.3.2. Celulosa 3
1.3.3. Degradación de los residuos lignocelulósicos. 4
1.3.4. Pretratamientos. 5
1.3.5. Fermentación en Estado Sólido. 9
1.3.6. Celulosa regenerada.....17
2. Objetivo general. 21
2.1. Objetivos específicos. 21
3. Metodología.....22
3.1. Acondicionamiento de la materia prima a utilizar. 22
3.2. Preparación del inoculo de *Pleurotus ostreatus*.....22
3.3. Propagación del hongo en semillas de sorgo. 22
3.4. Fermentación en estado sólido.....23
3.5. Obtención del extracto. 25
3.6. Determinación de azúcares reductores por la técnica de DNS 26
3.7. Medición de actividad enzimática.....26
3.8. Fermentación alcohólica. 27
3.9. Determinación de etanol. 27
4. Resultados y Discusión.....29
4.1. Degradación de las películas de celulosa por *Pleurotus ostreatus*. 29
4.2. Evaluación de la producción de azúcares reductores en los tratamientos.....31
4.3. Actividad enzimática de los extractos.....33
4.4. Obtención de etanol a partir de los extractos. 34

5. Conclusiones.....37
6. Recomendaciones. 37
7. Anexos 38
8. Referencias. 39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura Química de la Celulosa. 4
Figura 2. Tipos de bioreactores para fermentación en estado sólido.....11
Figura 3. Películas de celulosa.....18
Figura 4. Reacciones que ocurren en la producción de celulosa regenerada.....19
Figura 5. Película de celulosa regenerada con la semilla de sorgo inoculada. 25
Figura 6. Porcentaje de pérdida de peso en la fermentación en estado sólido.....30
Figura 7. Concentración de azúcares reductores en los tratamientos 33
Figura 8. Actividad enzimática en los tratamiento 34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de celulosa y hemicelulosa de algunos residuos vegetales. 4
Tabla 2. Ventajas y Desventajas de la Fermentación en Estado Sólido con respecto a la Fermentación Sumergida. 10
Tabla 3. Aplicaciones de la fermentación en estado sólido. 13
Tabla 4. Macronutrientes de *P. ostreatus*..... 16
Tabla 5. Composición de las películas de celulosa regenerada de acuerdo al fabricante. 18
Tabla 6. Tratamientos utilizados para la fermentación en estado sólido..... 24
Tabla 7. Composición de la mezcla de sales añadida al tratamiento con nutrientes. 24
Tabla 8. Composición de la mezcla de sales añadida al tratamiento con sales. 25
Tabla 9. Velocidad de pérdida de peso en la sacarificación..... 30
Tabla 10. Comparación de máximas concentraciones de etanol obtenidas y máximos rendimientos de etanol. 35

1. Introducción

1.1. Descripción del problema.

La falta de tratamiento a los residuos sólidos generados tanto a nivel doméstico como industrial ha originado un problema grave a nivel mundial, esto por las grandes cantidades desechadas de los mismos así como su tendencia a aumentar. Es por esto que en la actualidad, se busca la mejor manera de tratar estos residuos, con la finalidad de evitar problemas de salud pública y ambiental.

Las películas de celulosa regenerada son un tipo de residuo sólido generado en la industria cárnica. Estas películas son utilizadas para llevar a cabo la cocción de los embutidos, las cuales una vez que se termina este proceso, son desechadas a basureros municipales sin tratamiento alguno; como ejemplo, la empresa Empacadora Celaya S.A. de C.V. genera cerca de 50 toneladas mensuales del residuo.

Las películas son elaboradas a base de celulosa natural extraída de los árboles de pino, el producto resulta del tratamiento de la celulosa con álcalis y sulfuro de carbono. Debido a que su proceso de elaboración no modifica de manera sustancial la estructura de este polisacárido, es posible pensar en la factibilidad de aplicar métodos enzimáticos, químicos o biológicos usados para hidrolizar la celulosa natural para obtener productos de interés tales como la glucosa, el etanol, las enzimas y la biomasa.

El residuo, al contener al menos 65% de celulosa regenerada de acuerdo a la especificación del fabricante, tiene potencial de ser un sustrato con una fuente importante de carbono para el crecimiento de microorganismos que lo degraden; actualmente, la empresa Empacadora Celaya S.A. de C.V. utiliza las películas como sustrato para el crecimiento en fermentación en estado sólido de *Pleurotus ostreatus*, un hongo basidiomiceto comestible. Sin embargo, a pesar de llevar cerca de medio año con la producción del hongo, hay poca información con respecto a su capacidad real de degradar el residuo y no existe algún reporte en la literatura con respecto a la obtención de otros

productos tales como glucosa, etanol y celulasas, utilizando las películas como sustrato de *P. ostreatus* en fermentación en estado sólido.

En el presente trabajo se propuso obtener información con respecto a la capacidad de degradar las películas residuales de celulosa por medio de *Pleurotus ostreatus*, evaluar su capacidad de producir glucosa y celulasas en este proceso y la cantidad de etanol producida a partir de la fermentación alcohólica de la glucosa producida.

1.2. Planteamiento del Problema

Básicamente, el problema se presenta como dos preguntas a resolver. ¿En qué grado es posible la degradación de las películas de celulosa regenerada por *P. ostreatus*? Y además ¿Es viable la producción de glucosa y celulasas por medio de *P. Ostreatus* creciendo en un esquema de fermentación en estado sólido usando como sustrato el residuo, así como etanol a partir de la glucosa generada en el proceso mediante la fermentación de éstos por *Saccharomyces cerevisiae* ?

1.3. Marco de referencia.

1.3.1. Tratamiento de residuos agroindustriales.

La contaminación del medio ambiente ha sido un tema al cual se han dedicado varias investigaciones, esto con la finalidad de poder obtener productos a partir de desechos y posteriormente comercializarlos y al mismo tiempo poder disminuir en algún porcentaje la cantidad de residuos que contaminan el medio ambiente.

Los residuos agroindustriales son los desechos sólidos o líquidos que se obtienen a partir de la elaboración de productos derivados de actividades agrícolas y pecuarias. Las principales problemáticas con los residuos son la falta de tecnología para poder integrarlos al medio ambiente así como la escasa cultura ambiental en las empresas que los generan para su manejo y disposición (Saval, 2012).

La mayor cantidad del material procesado en la agroindustria constituye desechos sólidos; como ejemplo de esto, tenemos la industria de la cerveza, en la cual, sólo se utiliza aproximadamente un 8% de los componentes del grano; siendo el resto un residuo; otros ejemplos incluyen las industrias del aceite de palma, del café y del papel, para las cuales sólo se aprovechan el 9%, 9.5% y 30% de los materiales respectivamente (Saval, 2012).

Gran parte de estos residuos están constituidos por material lignocelulósico, lo cual es muy atractivo ya que pueden constituir una fuente importante de celulosa; que puede ser aprovechada en procesos fisicoquímicos como la pirólisis para obtener carbón combustible a partir del calentamiento a altas temperaturas (Demirbas, 2004) o por procesos biológicos, en los cuales diversos microorganismos puedan crecer y degradar dichos residuos, y a la vez, se pueden generar productos de interés tales como bioetanol o enzimas (Lynd et al., 2002; Moldes et al., 2002). Algunos ejemplos de materiales con alto contenido de celulosa incluyen los desechos de la industria maderera, residuos de cosechas, residuos de podas, hierbas, aserrín y desechos sólidos de animales (Gray et al., 2006).

Los microorganismos utilizados en los tratamientos son principalmente bacterias, hongos y levaduras, como ejemplos de su uso en el aprovechamiento de residuos agroindustriales para la obtención de productos de interés se pueden mencionar una infinidad de trabajos, que incluyen la obtención de enzimas como diversas celulasas, lipasas, hemicelulasas, proteasas, pectinasas, ligninoperoxidasas, manganesoperoxidasas, etc., también, se han producido bioenergéticos como el bioetanol a partir de las melazas de caña de azúcar, o ácidos orgánicos como el ácido cítrico, el acético o el vainillínico. Algunos ejemplos de los microorganismos más usados incluyen a bacterias de los géneros *Pseudomonas,, Clostridium* o *Bacillus,* y hongos de los géneros *Trichoderma*, *Candida*, *Aspergillus* o *Rhyzopus* (Granda et. al 2005; Saval, 2011).

1.3.2. Celulosa

La celulosa es un polímero de unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos β-1,4 (Figura 1) que se estructuran en largas cadenas lineales unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares. La celulosa posee una

estructura cristalina, la cual es muy resistente a la hidrólisis, así como regiones amorfas que son susceptibles a la degradación enzimática (Ovando-Chacón et. al. 2005). Es el polímero natural más abundante de la naturaleza porque es el principal componente de la pared celular de las células vegetales. La celulosa presenta rigidez y es insoluble en agua (Franco, 2010). En la Tabla 1 se muestra la abundancia de la celulosa en varios residuos vegetales.

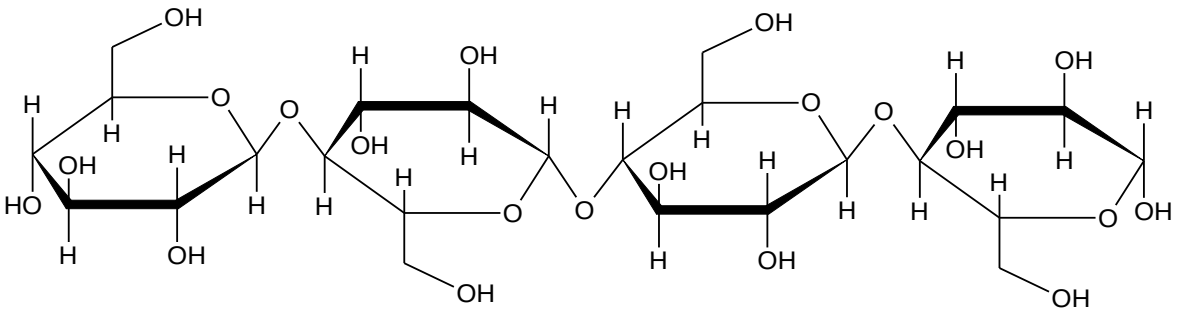


Figura 1. Estructura Química de la Celulosa.

Tabla 1. Contenido de celulosa y hemicelulosa de algunos residuos vegetales. Sannigrahi y Ragauskas (2011)

% en peso seco	**Miscantus**	**Maple Rojo**	**Pasto Varilla**	**Álamo Híbrido**
Celulosa	44	37.7	31-38	42-49
Hemicelulosa	18	22.1	32	16-23

1.3.3. Degradación de los residuos lignocelulósicos.

Para poder degradar los residuos lignocelulósicos es necesario hidrolizar la celulosa en las unidades de D-Glucosa que la componen, de manera sea aprovechada por diferentes microorganismos para la obtención de productos útiles tales como el bioetanol, ácido láctico, enzimas, etc.

Para llevar a cabo la degradación y aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos existen 3 pasos principales: El pretratamiento, la sacarificación o hidrólisis y la fermentación.

1.3.4. Pretratamientos.

El objetivo de los pretratamientos es realizar cambios en la composición física o química del material lignocelulósico haciendo más accesible la celulosa a la degradación, lo que aumenta el rendimiento de azúcares al final del proceso de hidrólisis. Su propósito es reducir la cristalinidad de la celulosa y eliminar la lignina y la hemicelulosa. Los pretratamientos se pueden clasificar como: Métodos físicos, fisicoquímicos o químicos (Niño, et. al, 2013).

a) Métodos físicos.

Fragmentación mecánica: En este proceso se realiza un triturado y una molienda al residuo con el que se trabajará con la finalidad de dejar partículas de un tamaño pequeño y que de esta manera aumente el área de contacto por unidad de volumen de material. Esto aumenta la efectividad de los diferentes métodos de hidrólisis (Millet, et al. 1976).

Hidrotermólisis: Consiste en utilizar agua caliente presurizada para facilitar la hidrólisis de la celulosa, el método tiene la ventaja de no generar residuos tóxicos ni compuestos corrosivos como los que resultan del uso de álcalis y ácidos (Suryawati, et. al 2009).

b) Métodos fisicoquímicos.

Explosión de vapor: En éste método se utiliza vapor a alta temperatura (160-260 ^{o}C) para hidrolizar parcialmente la hemicelulosa y despolimerizar la lignina generando oligómeros solubles y haciendo más accesible el residuo a utilizar, sin embargo las desventajas que presenta es que la separación de lignina y carbohidratos no es completa, así como la destrucción parcial del xilano y la generación de compuestos que impiden el

crecimiento de microorganismos durante la fermentación. El método es recomendado para maderas duras y desechos agrícolas (Mackie et al., 1985; Duff y Murray, 1996; Sun et. al. 2005).

Explosión de fibra de amoníaco: Este es uno de los métodos utilizados para obtener una mejor sacarificación de los sustratos a utilizar. En este método hay que tratar a los residuos con amoniaco a altas temperaturas y presiones por períodos cortos de tiempo (Holtzapple et al., 1991); bajo esas condiciones, el amoníaco y el agua penetran en el interior de la estructura de la celulosa y rompen sus enlaces éster produciéndose diferentes ácidos y amidas (Chundawat et. al 2011, Mathew et. al. 2016). Sus principales ventajas es que no se necesita fraccionar el residuo, no genera inhibidores además de que el amoniaco utilizado durante el proceso se puede recuperar para disminuir costos (Dale et al., 1984).

c) Métodos químicos.

Ozonólisis: En este método, el ozono reacciona con los dobles enlaces presentes en la lignina produciendo compuestos solubles de menor peso molecular como los ácidos orgánicos (García-Cubero et. al. 2009), su principal ventaja es que trabaja a presión y temperatura ambiente, no genera inhibidores, su única desventaja es que durante su proceso ocupa grandes cantidades de ozono lo cual se ve reflejado en los costos (Vidal y Molinier, 1988).

Pretratamiento ácido: La utilización de ácidos como H_2SO_4 y HCl es una buena alternativa para hidrolizar; sin embargo, también es un método caro. Cuando se realizan pretratamientos con ácidos diluidos es necesario realizar una neutralización al medio para poder ajustar el pH y así evitar un efecto inhibitorio durante las fermentaciones, éste método favorece la hidrólisis de la hemicelulosa, pero para su implementación es necesario realizar una extracción con solventes orgánicos para retirar la lignina presente. El empleo de ácidos concentrados se perfila como una opción atractiva para la hidrólisis de la celulosa, considerando que el proceso y los residuos son extremadamente corrosivos, peligrosos y tóxicos, por lo que se requiere contar con las condiciones y equipos necesarios para llevarlo a cabo (Eggeman & Elander, 2005).

Pretratamiento alcalino: Se basa principalmente en la adición de bases diluidas sobre los sustratos a trabajar, de los más utilizados se encuentra al hidróxido de sodio el cual ayuda a hacer más accesible la celulosa reduciendo el grado de cristalinidad y logrando separar las uniones entre la lignina y los carbohidratos. No es un método recomendado a gran escala ya que sus costos son muy elevados (Fan et al., 1987).

1.3.4.1. Sacarificación o hidrólisis.

El proceso de sacarificación o hidrólisis de la celulosa consiste en la descomposición de la misma para producir unidades de glucosa. La glucosa es el sustrato principal para muchas fermentaciones, en las cuales los microorganismos pueden crecer y producir metabolitos de interés. Los métodos de hidrólisis pueden ser químicos, enzimáticos o biológicos.

a) Hidrólisis ácida o química.

Usualmente se lleva a cabo sometiendo el residuo a tratamientos a alta temperatura (T>100ºC) y soluciones diluidas de H_2SO_4 (de entre 2 y 25 % en peso de ácido). Si bien los tratamientos de hidrólisis ácida no son costosos, presentan la problemática de generar furfurales, que son compuestos de color obscuro que resultan de la degradación de la glucosa y son tóxicos para los microorganismos (Navarro, 1994; Lacerda, et. al. 2013). Además, una vez terminada la hidrólisis, es necesario neutralizar el medio de reacción con álcalis, lo cual genera grandes concentraciones de sales (principalmente en forma de Na_2SO_4), además de que en el proceso de neutralización se reduce la concentración final de glucosa por efecto de la dilución (Dussán, et. al. 2014).

b) Hidrólisis enzimática.

Éste tipo de hidrólisis la llevan a cabo las celulasas. Éstas enzimas hidrolizan el enlace glucosídico β 1-4 de la celulosa. Las celulasas son una mezcla de exoglucanasa (1,

4-β-D-glucancelobiohidrolasa, EC 3.2.1.91), endoglucanasa (1,4-β-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.3) y celobiasa (β-D glucosidasa, EC 3.2.1.21) las cuales hidrolizan la molécula de celulosa en secuencia; primero actúan las endoglucanasas; comenzando las partes interiores de la molécula de celulosa; finalmente, las exogluganasas y las celobiasas hidrolizan los oligosacáridos resultantes liberando celobiosa y glucosa respectivamente. Los procesos enzimáticos de hidrólisis son preferidos a los químicos debido a que en estos no se producen sustancias tóxicas y de que se pueden llevar a cabo a un pH cercano a 7. Además de que las enzimas pueden inmovilizarse y así recuperarse (Babu, et. al. 2014).

c) Métodos biológicos

Los tratamientos biológicos consisten en tratar el residuo en un sistema de fermentación en estado sólido. En este sistema, el residuo celulósico se coloca en un reactor con un contenido de humedad limitado y se inocula directamente con microorganismos como bacterias u hongos, los cuales degradan el material celulósico a través de la producción de enzimas extracelulares, las cuales degradan la celulosa transformándola en glucosa (Lynd et al., 2002). Éstos tratamientos son amigables con el medio ambiente ya que la generación de productos tóxicos es baja o en ocasiones nula, además no requieren un gran consumo de energía; sin embargo presentan la limitante de ser lentos (Hatakka, 1983; Kirk Y Jeffries, 1996). Existen reportes donde se han usado hongos para la sacarificación de residuos celulósicos; como ejemplo se pueden citar los siguientes trabajos: Ghadi, y col., (2011) hidrolizaron cáscaras de arroz con *Trichoderma reesei* para producir glucosa obteniendo un extracto con concentración final de 1.34 g/L; Thanapimmetha, y col., (2012) obtuvieron un rendimiento de 10.34% de azúcares reductores con respecto al peso de bagazo de sorgo dulce hidrolizado con *Trichoderma harzianum* y Prawitwong, y col., (2013) quienes obtuvieron un licor con una concentración de 80.28 g de glucosa L^{-1} con un rendimiento de 72% tras hidrolizar celulosa en un sistema que contenía *Clostridium thermocellum* y β-glucosidasa.

1.3.4.2. Fermentación.

La fermentación la llevan a cabo diversos microorganismos utilizando como sustrato los azúcares liberados de los materiales utilizados (Sun y Cheng, 2002). En el proceso de fermentación es importante controlar las condiciones bajo las cuales ésta se lleva a cabo, como por ejemplo la temperatura, el pH, o el nivel de agitación, esto dependerá del microorganismo que lleve a cabo el proceso.

Existe una gran variedad de metabolitos que pueden ser obtenidos por fermentación; siendo los productos más comunes las enzimas, los ácidos orgánicos, los solventes, las vitaminas, los antibióticos, los polímeros, los esteroides, entre otros (Humphrey y Deindoerfer, 1961).

Después de la etapa de fermentación, usualmente es necesario llevar a cabo diferentes etapas de purificación posteriores a la fermentación para aumentar la concentración de las sustancias obtenidas. Estas operaciones pueden ser filtraciones, destilaciones, extracciones líquido-líquido, lixiviaciones, cristalizaciones, etc. Lo cual puede aumentar el costo de la obtención de los productos (Vogel y Todaro, 1997).

1.3.5. Fermentación en estado sólido.

En términos generales podemos distinguir dos tipos de fermentación: La fermentación sumergida y la fermentación en estado sólido. En la primera, los microorganismos crecen en un medio líquido y secretan los metabolitos producidos hacia el mismo; en cambio en la fermentación en estado sólido, se utilizan sustratos sólidos con un contenido de humedad limitado, de manera que el sustrato sirve también de soporte (Maulin, et al 2004; Subramaniyam y Vimala, 2012).

La fermentación en estado sólido se prefiere para el crecimiento de hongos ya que estos requieren un menor contenido de humedad para su crecimiento, mientras que para el crecimiento de bacterias se prefiere la fermentación sumergida (Subramaniyam y Vimala,

2012). En la tabla 2 se muestran las ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido con respecto a la fermentación sumergida.

Tabla 2. Ventajas y Desventajas de la Fermentación en Estado Sólido con respecto a la Fermentación Sumergida. (Rodríguez y Sanromán 2006; Raimbault M. et al. 1998)

Ventajas	**Desventajas**
Mayor productividad.	Dificultades asociadas al escalamiento.
Mejor circulación de oxígeno.	Baja eficiencia de mezclado.
Medios de cultivo con menor costo.	Dificultad en el control de los parámetros del proceso (pH, calor, humedad, condiciones de nutrientes).
Los procesos subsecuentes de purificación usualmente son más simples (aunque no siempre menos costosos)	Problemas de transferencia de calor.
Menores requerimientos de energía y costos.	En ocasiones la recuperación de los productos es costosa.
Tecnología Simple.	
Incidencia relativamente baja de problemas de operación.	
Menor cantidad de agua consumida	

Se prefiere la fermentación en estado sólido para el tratamiento de residuos lignocelulósicos debido a que estos tienen escasa solubilidad en agua; además, existe la ventaja de que tras tratar el residuo con este tipo de fermentación, los microorganismos excretan hacia el exterior los productos de interés, de manera tal que no es necesaria la etapa de sacarificación; como ejemplo de esto, tenemos a los hongos, que generan enzimas extracelulares: Las celulasas que degradan la celulosa y las hemicelulasas a la hemicelulosa y las lacasas que despolimerizan a la lignina, mediante reacciones de oxidación. Todas estas enzimas pueden ser recuperadas. (Pérez et al., 2002).

1.3.5.1. Reactores para la fermentación en estados sólido.

La fermentación en estado sólido se lleva a cabo en diferentes tipos de reactores tales como los mostrados en la Figura 2. Los reactores de charolas tienen un conjunto de anaqueles sobre los cuales se coloca el sustrato con el microorganismo permitiendo el flujo

libre de aire; en los reactores tanto de lecho empacado como de lecho fluidizado, el sólido se empaca dentro de un reactor tubular que usualmente se enchaqueta en su exterior para enfriar el contenido del mismo, la diferencia entre ambos consiste en que en el reactor de lecho fluidizado el sólido se encuentra sumergido en líquido; finalmente, también existen los reactores tipo zimotis, que consiste en un prisma rectangular dentro del cual se intercalan lechos de sustrato con placas rectangulares rellenas de agua que tienen la función de dispersar el calor producido por el crecimiento de los microorganismos (Rodríguez, y SanRomán, 2006) .

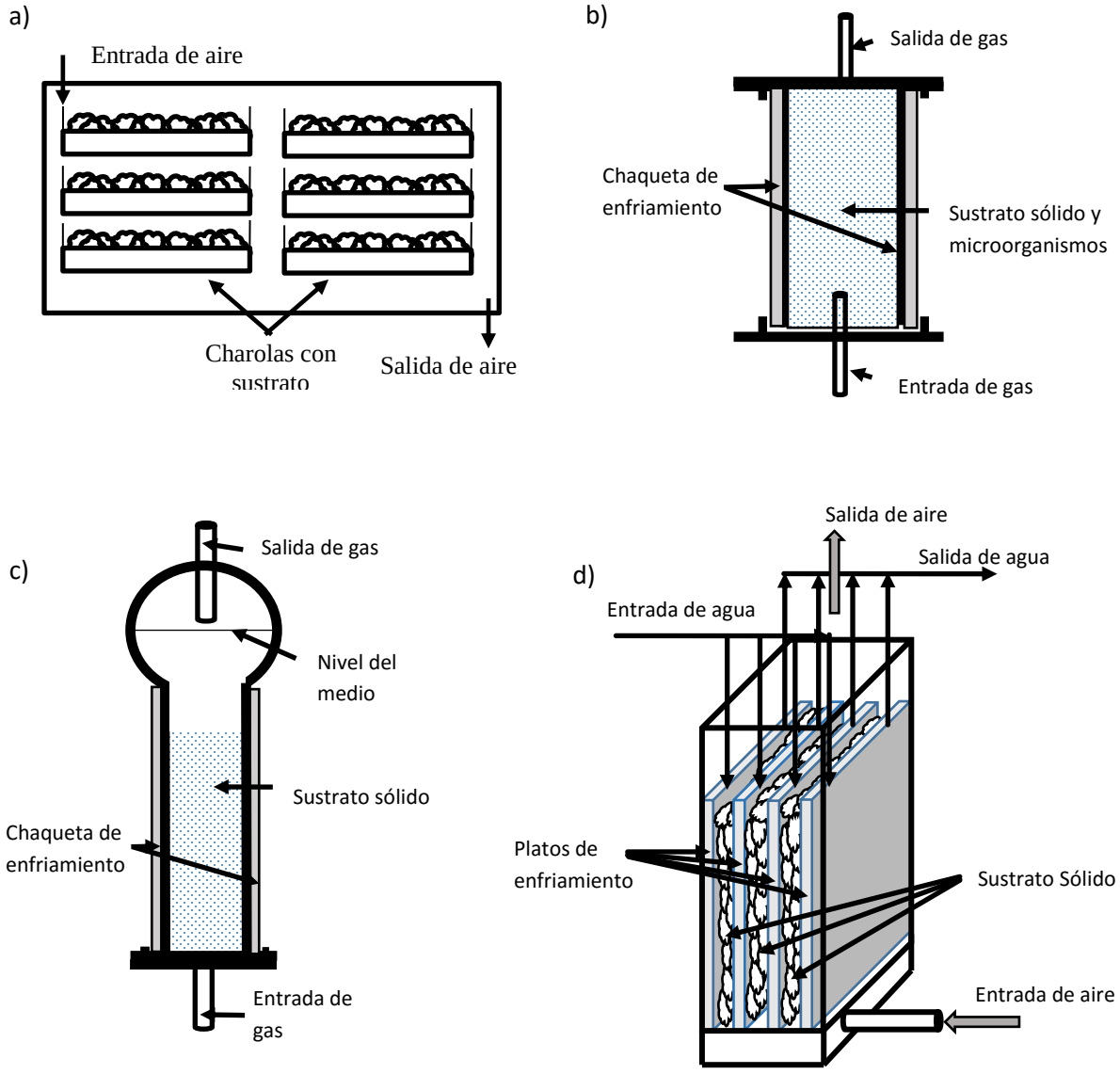


Figura 2. Tipos de bioreactores para fermentación en estado sólido a) de platos o charolas, b) de lecho empacado, c) de lecho fluidizado y d) tipo zimotis. Rodríguez y Sanromán (2006)

1.3.5.2. Principales productos obtenidos por fermentación en estado sólido.

La fermentación en estado sólido se ha utilizado principalmente para la producción de enzimas; sin embargo, también se pueden encontrar aplicaciones en las cuáles se han obtenido ácidos orgánicos y combustibles. Algunas aplicaciones se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Aplicaciones de la fermentación en estado sólido.

Aplicación	Microorganismo	Sustrato	Producto	Referencia
ENZIMAS				
	Aspergillus oryzae	Salvado de arroz y trigo	Proteasas	Chutmanop et. al (2008)
	A. oryzae, A. flavipes, A. niger, A. brasiliensis, P. roquefortii	Salvado de trigo y soya	Proteasas	Novelli et. al (2016)
	Aspergillus niger	Cáscaras de cítricos	Fitasas	Rodríguez et. al (2010)
	Rhyzopus oligosporus	Torta residual del proceso de extracción de aceite de coco	Fitasas	Sabu et. al (2002)
	Thermoascus aurantiacus miehe	Salvado de trigo, Bagaso de caña y naranja, olote, pastos, aserrín y paja	Xilanasas y Carboximetilcelulas	da Silva et. al (2005)
	Trichoderma harzianum	Bagaso de caña	Xilanasas	Rezende et. al (2002)
	Penicillium viridicatum	Bagaso de naranja y salvado de trigo	Pectinasas	Silva et. al (2005)
	Aspergillus niger	Salvado de trigo y bagazo de caña	Pectinasas	de Oliveira et al. (2016)

Tabla 3 (Continúa)

	Apergillus niger, Rhizopus arrhizus	Salvado de trigo y aceite de oliva	Lipasas	Mahadik et al. (2002)
	Yarrowia lipolytica	Tortas desgrasadas de soya y algodón	Lipasas	Farias et al. (2014)
	Aspergillus terreus	Paja de arroz	Celulasas	Narra et al. (2012)
ÁCIDOS ORGÁNICOS				
	Aspergillus niger	Bagazo de caña	Ácido Cítrico	Kumar et al. (2003)
	Aspergillus niger	Bagazo de yuca	Ácido Cítrico	Prado et al. (2005)
	Lactobacillus delbrueckii	Bagazo de caña y yuca	Ácido Láctico	Rojan et al. (2006)
	Lactobacillus casei	Bagazo de caña y almidón hidrolizado de yuca	Ácido Láctico	Rojan et al. (2005)
COMBUSTIBLES				
	Saccharomyces cerevisiae	Pulpa de remolacha y de uva	Etanol	Rodríguez et al (2010)
	Trichoderma sp. y *Saccharomyces cerevisiae*	Patata dulce	Etanol	Swain et al. (2013)

1.3.5.3. Fermentación en estado sólido con basidiomicetos.

El *phylum* basidiomycota comprende hongos superiores entre los cuales tenemos algunas especies que tienen gran importancia económica debido a que son comestibles, como *Agaricus bisporus, Lentinus edodes, Flammulina velutipes, Volvariella volvácea Pleurotus ostrea*tus (Chang, 1980). Debido a que son organismos heterótrofos pueden transformar materiales vegetales mediante enzimas extracelulares degradadoras de lignocelulosa.

A pesar de haber menor cantidad de estudios concernientes al mecanismo mediante el cual los basidiomicetos degradan el material celulósico con respecto a aquellos existentes para los ascomicetos (Rytioja, et al. 2014), existen reportes mediante los cuales se han obtenido productos importantes a partir de la fermentación en estado sólido de los mismos. Entre los productos más importantes están las enzimas como las lipasas (Singh, et al. 2015) y sobretodo celulasas.

A partir del cultivo de basidiomicetos en un esquema de fermentación en estado sólido se han obtenido principalmente enzimas, por ejemplo: Quiroz-Castañeda y col. 2009 obtuvieron celulasas de los hongos *Pycnoporus sanguineus* y *Bjerkandera adusta* en paja de trigo, las enzimas fueron capaces de tolerar condiciones elevadas de temperatura (de hasta 80 ^{o}C) y trabajar en un rango de pH muy amplio (de entre 2 y 8); Han (2003) y Han, et al. (2005) obtuvieron α-amilasas tras cultivar *Hericium erinacenum* sobre residuos de maíz y soya y *Ganoderma lucidum* sobre residuos de maíz enriquecidos con sales, mejorando en ambos casos, el valor nutricional del residuo gracias al aumento del porcentaje de proteínas; Kachlishvili y col., (2012) obtuvieron un conjunto enzimas lignocelulolíticas como endoglucanasas, lacasas, xilanasas y manganeso peroxidasas a partir de varios hongos basidiomicetos como *Irpex lacteus*, *Trametes ochracea* y *Lenzites betunila* en fermentación en estado sólido con cáscaras de mandarina, salvado de trigo y pericarpio de nueces.

1.3.5.4. Fermentación en estado sólido con *Pleurotus Ostreatus*.

Pleurotus ostreatus es un hongo saprófito o parásito débil, que crece de manera natural en árboles de aliso, balso y arce en los valles y ríos, así como también en suelos o sobre residuos agrícolas o agroindustriales constituidos por celulosa (40-60%), hemicelulosa (15-50%) y lignina (10-30%), a las que emplea como nutrientes. *Pleurotus* proviene del griego "Pleuro" formado en posición lateral, refiriéndose a la posición del estípite respecto al píleo. Y *ostreatus* en latín que quiere decir en forma de ostra refiriéndose a la apariencia y al color del cuerpo fructífero (Stamets, 1993). Sus condiciones óptimas de crecimiento son: Temperatura de 30 °C, pH de 5.5-6.5 con una humedad relativa de 85-90 % (Monterroso, 2007). Es uno de los hongos que más se ha estudiado y utilizado para consumo humano, debido a su facilidad para cultivarse y su buena calidad nutricional (Deepalakshmi y Mirunalini, 2014) (Tabla 4). Su cultivo se hace sobre materiales ricos en celulosa, pudiendo utilizarse para este propósito, los residuos agroindustriales que generan un problema al medio ambiente (Oei, 2003).

Tabla 4. Macronutrientes de *P. ostreatus* (Khan, 2010)

Nutrientes	Contenido (g/100 g de hongo seco)
Proteínas	17-42
Carbohidratos	37-48
Lípidos	0.5-5
Fibras	24-31
Minerales	4-10
Humedad	85-87%

Existen varios trabajos que utilizan a *P. ostreatus* para degradar residuos agroindustriales y producir enzimas lignocelulíticas, como las celulasas o las lacasas. Algunos ejemplos de éstos trabajos son los siguientes: Paredes, y col. (2010) obtuvieron celulasas por fermentación sólida con *Pleurotus ostreatus, Pleurotus pulmonarius y Lentinula edodes* en residuos del cultivo de plátano; además, la glucosa obtenida del

proceso de descomposición, fue utilizada para la producción de bioetanol con *Saccharomyces cerevisiae*; Isikhuemhen y Mikiashvilli (2009) cultivaron *P. ostreatus* en un digestor con desechos de pollos enriquecidos con paja de trigo y obtuvieron enzimas con actividad de lacasas, peroxidasas, xilanasas, CMCasas y glucanasas, además de obtener un rendimiento de 874.8–958.3 g/kg en el cultivo del hongo; Karp et al. (2012) obtuvieron y caracterizaron lacasas obtenidas del cultivo de *P. ostreatus* en bagazo de caña; Radhika, y col., (2013) produjeron celulasas y lacasas en fermentación en estado sólido con *P. ostreatus* utilizando como sustratos paja de arroz, salvado de arroz, aserrín y cáscaras de diversas semillas, en este caso, la fermentación en estado sólido aumentó la producción de lacasas; Rodrigues da Luz y col., (2012) cultivaron *P. ostreatus* en cáscaras de café, aserrín, olotes y bagazo de caña para producir enzimas entre las cuales se encontraron: lacasas, peroxidasas, xilanasas, celulasas y tanasas); Khalil y col., (2010) realizaron un trabajo de obtención de celulasas, inoculando residuos agrícolas como aserrín, bagazo de caña y paja de arroz, con *P. ostreatus* y *P. sajor –caju*, estas cepas fueron utilizadas durante la fermentación en estado sólido, obteniendo extractos con actividades enzimáticas hasta 4.28 veces mayores para *P. ostreatus.*

P. ostreatus también ha podido ser cultivado en un sistema de fermentación en estado sólido en películas residuales de celulosa regenerada, un desecho de la industria cárnica (Véase la sección 1.3.5). Gómez-Castillo (2010) ha cultivado este tipo de hongos en éste residuo obteniendo rendimientos de hasta 200 g de hongos por cada 1 kg de residuo seco tratado. El proyecto de cultivo de estos hongos sobre el residuo fue con el objeto de aprovechar la celulosa regenerada y no simplemente verterla al medio ambiente.

1.3.6. Celulosa regenerada

La celulosa regenerada, conocida también como película o tripa de celulosa, es un material permeable, utilizado en la elaboración de productos cárnicos como las salchichas para envolverlos durante el proceso de cocción (Figura 3). Es un producto de grado alimenticio cuya composición, de acuerdo al fabricante, se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición de las películas de celulosa regenerada de acuerdo al fabricante (Viscofan S.A.)

Componente	**% en peso**
Celulosa regenerada pura	65
Glicerina	18
Agua	15
Aceite Mineral Blanco de grado alimenticio	2

Al termino del proceso de cocción la película es retirada y desechada para ser enviada a los rellenos sanitarios, lo cual, ocasiona un problema al medio ambiente ya que su degradación es muy lenta (Gómez-Castillo, 2010).

a) b)

Figura 3. Películas de celulosa a) antes de usarse, b) después de usarse.

1.3.6.1. Proceso de elaboración de la celulosa regenerada.

La celulosa regenerada se fabrica mediante la extracción de celulosa pura de árboles de pino y maple, la madera se disuelve en una solución de hidróxido de sodio, posteriormente se realiza un prensado para eliminar el exceso de la solución alcalina, después mediante un triturado se da la formación de una pasta de celulosa alcalina, la cual se disuelve en disulfuro de carbono dejando reposar para producir el xantano de celulosa, la sal se disuelve nuevamente en una solución de hidróxido y se filtra, se realiza una molienda

y se deja reposar, para darle un baño de regeneración y coagulación con ácido sulfúrico y sulfato de sodio, con este paso se da la conversión de xantano de celulosa a celulosa nuevamente. Finalmente, la mezcla se extruye para dar a la formación de tubos de celulosa regenerada (Organic Materials Review Institute, 2001; Strunk, 2012). Los tubos obtenidos son lavados y se les adiciona glicerina como plastificante con la finalidad de aumentar su resistencia y elasticidad (Aleksandrovich et al., 1976; Nicholson, 1997, Nicholson, 2006). Finalmente son utilizadas en la industria de los embutidos, al término de su proceso de cocción son desechadas. Las reacciones que ocurren en la producción de celulosa regenerada se muestran en la Figura 4.

$$Cell-OH \xrightarrow{NaOH} Cell-ONa \xrightarrow{CS_2} Cell-O\begin{matrix} S \\ // \\ \\ \\ S-Na^+ \end{matrix} \xrightarrow{H_2SO_4} Cell-OH + CS_2 + NaHSO_4$$

Figura 4. Reacciones que ocurren en la producción de celulosa regenerada (Organic Materials Review Institute, 2001).

1.3.6.2. Aprovechamiento de las películas residuales de celulosa regenerada.

Existen algunos trabajos donde se trata la biodegradación del residuo de películas de celulosa por medio del cultivo de hongos. Entre ellos se pueden mencionar los siguientes: Cárdenas y col., (2014) realizaron una investigación sobre la degradación de las películas mediante el crecimiento de hongos nativos para la producción de celulasas y estudian su degradación usando celulasas de *Trichoderma reesei*. Para las degradaciones enzimáticas realizan adición de sales con la finalidad de obtener mejores resultados en cuanto a la producción de enzimas logrando un aumento en la actividad enzimática; Sreenath y Koegel (2008) llevaron a cabo un trabajo sobre el aprovechamiento de la película tratándola con *Trichoderma reesei* para producir celulasas en fermentación en estado sólido, en este trabajo se obtuvieron mejores resultados enriqueciendo el sustrato con combinaciones de alfalfa y salvado de trigo. Otros productos importantes obtenidos fueron la glucosa, el

etanol y el ácido láctico, estos últimos obtenidos por sacarificación-fermentación simultánea con *Lactobacillus plantarum sp*., y *Klueveromyces marxianus.*

Actualmente, la empresa Empacadora Celaya S.A. de C.V., genera cerca de 50 toneladas mensuales de este residuo. Para abatir el problema, se cultiva con éxito *Pleurotus ostreatus* en el mismo; sin embargo, se tiene poca información del impacto real que tiene esta práctica con respecto a la disminución de la cantidad de residuo vertido sin tratamiento, ya que después de cosechado el hongo, aún se puede apreciar que el residuo no se ha degradado completamente (Gómez-Castillo, 2010)

Además de lo anterior, y debido a la posibilidad de obtener otros productos útiles como resultado de la fermentación de los hongos, tales productos pueden ser enzimas, glucosa y etanol, se propuso llevar a cabo este trabajo bajo los objetivos descritos en la sección siguiente.

2. Objetivo general.

Determinar el potencial biotecnológico en la degradación de películas residuales de celulosa mediante un tren de tratamiento de fermentación en medio sólido con *Pleurotus ostreatus* y fermentación sumergida utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

2.1. Objetivos específicos.

- Determinar la pérdida de peso del sistema en la fermentación en estado sólido de películas de celulosa con *P.ostreatus*, bajo diferentes condiciones de reacción como una manera de medir el porcentaje de degradación del residuo.

- Determinar la actividad enzimática y cantidad de glucosa en el extracto acuoso de residuo tratado en diferentes tiempos y a diferentes condiciones de fermentación.

- Producir bioetanol empleando licores obtenidos a partir de los residuos celulósicos fermentados.

3. Metodología.

Los residuos agroindustriales que se utilizaron para este trabajo fueron las películas de celulosa regenerada, las cuales utilizan para la cocción de las salchichas en la empresa Empacadora Celaya S.A. de C.V. La investigación se llevó acabo en las instalaciones de la Universidad Politécnica de Guanajuato y la empresa.

3.1. Acondicionamiento de la materia prima a utilizar.

Después de ser utilizadas en la elaboración de las salchichas, las películas se lavaron para eliminar residuos del embutido. El lavado consistió en la desinfección con una solución que contenía 1L de cloro por cada 600L de agua, usando suficiente para mantener cubiertas las películas por media hora, al final del proceso, las películas fueron enjuagadas.

3.2. Preparación del inoculo de *Pleurotus ostreatus.*

Se obtuvo un inóculo de *Pleurotus ostreatus* y se sembró en cajas Petri en medio PDA, las cuales se almacenaron a 22-24 °C sin presencia de luz. Después de los 7 días, las cajas invadidas completamente por el micelio de *Pleurotus ostreatus*, se almacenaron en refrigeración hasta su propagación en semilla de sorgo.

3.3. Propagación del hongo en semillas de sorgo.

Antes de inocular el hongo en las películas de celulosa, se llevó a cabo una propagación en semillas de sorgo. Primero, el sorgo fue lavado con abundante agua eliminando la suciedad presente, se dejó en agua durante 24 horas con la finalidad de hidratarlo. A las 24 horas el sorgo se escurrió para eliminar el exceso de agua; en vasos de precipitado de vidrio de 1L se colocaron 500 g del sorgo hidratado, los vasos fueron tapados con algodón, cubiertos con aluminio y cinta de papel, y esterilizados a 121 °C por 15 min. Los frascos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y con ayuda de unas pinzas estériles el sorgo fue removido para despegarlo. Las cajas Petri con la cepa de *Pleurotus ostreatus* fueron sacadas de refrigeración para su atemperación. Posteriormente, el hongo se

cortó en cuadrados de 1 cm^2 y se colocaron 10 de estos cuadrados dispersos en los vasos con las semillas. Tras hacer esto, nuevamente se colocaron los tapones de algodón y aluminio nuevamente para evitar el contacto con la luz; todo esto se llevó a cabo en la campana de flujo laminar específica para hongos y levaduras, los recipientes se almacenaron a 22-24 °C durante 2 semanas.

3.4. Fermentación en estado sólido.

La películas limpias y secas se pesaron y se hidrataron con agua destilada, se colocaron en bolsas negras las cuales se amarraron para impedir contacto con el medio ambiente y se llevaron a esterilizar a 121 °C por 15 min, las bolsas se sacaron de la autoclave y se esperó hasta que tuvieran una temperatura de 28-30 °C, posteriormente fueron llevadas a la campana de flujo laminar para poder comenzar con la fermentación en estado sólido. Se utilizaron bolsas para la siembra a manera de un reactor de lecho empacado, dichas bolsas se desinfectaron con una solución de peróxido de hidrogeno al 3% con la finalidad de inhibir el crecimiento de bacterias, las bolsas con la película estéril fueron abiertas dentro de la campana de flujo laminar y fue retirado el excedente de agua, en cada bolsa desinfectada se colocaron 50 g de peso seco de la película, 7.5 g del inóculo del hongo en las semillas de sorgo y los nutrientes dependiendo de cada uno de los tratamientos. Las bolsas fueron cerradas sacando la mayor cantidad de aire presente, al final se rotularon, se pesaron y se llevaron a la cámara de almacenamiento a 28-30 °C con una humedad relativa superior al 70% donde se monitorearon los pesos cada tercer día (ver Figura 5). Después de los 6 días de la siembra con ayuda de una navaja estéril, a las bolsas se les realizaron 6 perforaciones de manera dispersa para lograr el proceso de intercambio gaseoso entre el medio de fermentación y los alrededores. Durante el desarrollo de la fermentación, la cual duró 44 días, se tomaron muestras para realizar las determinaciones de concentración de glucosa y actividad enzimática. Las pruebas fueron destructivas y se llevaron a cabo 10 réplicas. Los tratamientos probados se resumen en las siguientes tablas:

Tabla 6. Tratamientos utilizados para la fermentación en estado sólido.

Tratamiento	Condiciones del tratamiento
Blanco de proceso (sin *P. ostreatus*)	50 g de película y 25 mL de agua destilada
Testigo	50 g de película + 25 mL de agua + 7.5 g de inóculo de *P. ostreatus*.
Papa-Dextrosa: Inóculo y papa-dextrosa.	50 g de película + 25 mL de solución de papa y dextrosa + 7.5 g de inóculo de *P. ostreatus*.
Ácido sórbico: Inóculo, papa-dextrosa y ácido sórbico.	50 g de película + 25 mL de solución de papa y dextrosa + 7.5 g de inóculo de *P. ostreatus* + 0.825 g de ácido sórbico.
Ácido acético: Inóculo, papa-dextrosa y ácido acético.	50 g de película + 25 mL de solución de papa y dextrosa + 7.5 g de inóculo de *P. ostreatus* + 0.75 mL de vinagre.
Nutrientes: Inóculo y solución de sales.	50 g de película + 25 mL de agua + 7.5 g de inóculo de *P. ostreatus* + 68 g de sales (Tabla 6)
Sales: Inóculo y solución de sales de calcio.	50 g de película + 25 mL de agua + 7.5 g de inóculo de *P. ostreatus* + 99 g de sales de calcio. (Tabla 7)

Tabla 7. Composición de la mezcla de sales añadida al tratamiento con nutrientes.

Sal	Cantidad de sal añadida por tratamiento (g)
Sulfato de magnesio heptahidratado	26.4
Sulfato ferroso heptahidratado	5.5
Sulfato manganoso monohidratado	1.75
Sulfato de zinc	1.75
Sulfato de calcio	33

Tabla 8. Composición de la mezcla de sales añadida al tratamiento con sales.

Sal	Gramos por tratamiento
Carbonato de calcio	66
Sulfato de calcio	33

Figura 5. Película de celulosa regenerada con la semilla de sorgo inoculada para cada uno de los tratamientos.

3.5. Obtención del extracto.

Las bolsas fueron pesadas y por cada 100 g de residuo se adicionaron 25mL de solución buffer de citrato con un pH de 4.8, lo cual sirvió para lavar las películas y obtener el extracto rico en azúcar y enzimas, dicho extracto fue filtrado con la ayuda de un colador para retener residuos de la película y micelio, posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min, el sobrenadante fue recuperado y almacenado como extracto a 4 °C.

3.6. Determinación de azúcares reductores por la técnica del ácido dinitrosalicílico (DNS).

Preparación del reactivo DNS (Miller, 1959): Se colocaron 150 mL de agua destilada en un recipiente y se agregaron los reactivos en este orden: 1.12 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, 2.09 g de hidróxido de sodio, 32.41 g de tartrato de sodio-potasio, 0.8 mL de fenol calentado a 50 °C, 0.879 g de metabisulfito de sodio, en todo momento se mantuvo la agitación hasta mezclar completamente los reactivos. Se colocó en un frasco tapado con aluminio y se almacenó en refrigeración.

Para hacer la determinación Se colocaron 0.5 mL del extracto (Sección 3.5) y 0.75 mL del reactivo DNS en tubos Falcon® de 15 mL. La mezcla se agitó y los tubos fueron llevados a ebullición por 5 min. Después fueron enfriados al chorro de agua y se les agregó 5 mL de agua destilada, se agitaron vigorosamente y se realizó la lectura a 490 nm en un espectrofotómetro UV-Visible. Las absorbancias obtenidas para las muestras se compararon con aquellas correspondientes a las obtenidos para la curva de calibración llevadas a cabo con soluciones de glucosa preparadas a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 y 0.7 g/L, a las cuales se les aplicó el mismo protocolo de reacción.

3.7. Medición de actividad enzimática.

A los extractos obtenidos de la fermentación en estado sólido (Sección 3.5) se les determinó la actividad enzimática para hidrolizar celulosa; para esto, se colocó 1 mL del extracto en un tubo Falcon® de 15 mL dentro de un baño María (50 °C). Posteriormente se adicionó 0.03 g de papel filtro y se dejó transcurrir la reacción de hidrólisis por 1 h, pasada la hora se determinaron azúcares reductores liberados por la técnica DNS. En este trabajo, las unidades de actividad enzimática del extracto se expresan por unidades internacionales por mL de extracto (UI/mL), donde 1 UI equivale a la cantidad de enzima que libera µmol de azúcares reductores por minuto por L de extracto bajo las condiciones del análisis.

3.8. Fermentación alcohólica.

Se seleccionaron los extractos de los tratamientos con mayor contenido de azúcares reductores para llevar a cabo la fermentación alcohólica. Los extractos fueron concentrados por evaporación hasta reducir su volumen hasta aproximadamente un 95% del original y fueron enriquecidos de la siguiente manera: Por cada 200 mL de extracto concentrado se añadieron: 0.048 g de fosfato de potasio monobásico, 0.096 g de peptona de carne y 1.068 g de extracto de levadura. Los extractos concentrados fueron esterilizados a 121 °C por 15 min. Finalmente, los extractos esterilizados se enfriaron a 30 °C y fueron inoculados con *Saccharomyces cerevisiae* previamente activada en 20 mL de agua destilada en una proporción de 0.25 g de levadura comercial liofilizada por litro de agua a una temperatura de 30 °C por 30 min. La reacción de fermentación se mantuvo a 30 °C, 180 rpm, y de ella se tomaron muestras cada 6 horas por un período de 36 horas para monitorear la producción de etanol y el consumo de azúcares reductores.

3.9. Determinación de etanol.

La cuantificación de etanol se llevó a cabo por espectrofotometría UV Visible, para la cual, el etanol presente en las muestras reaccionó con dicromato de potasio reduciendo al cromo hexavalente a trivalente (ver Anexo 7.1). Para la determinación se siguen varias etapas. *1) Preparación de la mezcla sulfocrómica (solución de dicromato de potasio):* Para la preparación de esta solución se colocaron 3 g de dicromato de potasio en 13.40 mL de ácido sulfúrico al 13% en un matraz y se aforó a 100 mL con agua destilada. *2) Preparación de soluciones de etanol para la construcción de la curva estándar:* Se prepararon soluciones con de etanol con las siguientes concentraciones (en % $^{p}/_{p}$): 0, 0.6, 1, 2, 3, 4, 5.5 y 6 % para la construcción de una curva de calibración. *3) Limpieza de los extractos fermentados.* Antes de llevar a cabo la reacción de óxido-reducción entre el etanol presente en las muestras y el dicromato de potasio, es necesario eliminar los carbohidratos y las proteínas del medio de reacción ya que estos reaccionan con el ácido sulfúrico presente en la mezcla sulfocrómica. Para esto, se tomó 1 mL del medio de fermentación, se le añadió 1mL de sulfato de cobre al 20%, 8 mL de agua destilada y 1 g de hidróxido de calcio, se agitó vigorosamente y se dejó en reposo 30 min. Pasado el tiempo se llevó a

centrifugar a 6000 rpm por 10 min, se separó el sobrenadante y se metió a centrifugar nuevamente. Este procedimiento también se llevó a cabo sobre los estándares usados en la preparación de la curva de calibración. *4) Reacción con el dicromato de potasio.* Se tomaron 2 mL de los extractos después de su proceso de limpieza y se mezclaron con 2 mL de la mezcla sulfocrómica en tubos Falcon® que fueron agitados vigorosamente y llevados a ebullición durante 15min, después se sumergieron en agua a 20 ºC, y se midió la absorbancia de las muestras y los estándares en un espectrofotómetro a 585 nm.

4. Resultados y Discusión.

4.1. Degradación de las películas de celulosa por *Pleurotus ostreatus*.

Durante la fermentación en estado sólido se pudo observar que a medida que el tiempo fue avanzando, se hizo evidente el crecimiento progresivo de micelio sobre las películas en los tratamientos donde se inoculó el hongo; además, se observó que el tamaño de las películas tratadas se redujo. Para tener una aproximación de la cantidad de película degradada en cada tratamiento, se determinó el porcentaje de pérdida de peso obtenido en cada tratamiento. En la figura 6 se puede observar que conforme el proceso de degradación avanza, es mayor el porcentaje de pérdida de peso para todos los tratamientos. El tratamiento llevado a cabo con la adición de papa dextrosa fue el que tuvo una mayor pérdida de peso (20.6 %); en contraste, el tratamiento que registró menor pérdida de peso fue el blanco (2.6 %), ambos porcentajes determinados a los 44 días. Tal diferencia se atribuye a la pérdida de masa debida al metabolismo de *P. ostreatus* que se pierde en forma de CO_2 resultado de la degradación del residuo. De acuerdo a la Figura 6 en todos los tratamientos se llega a un porcentaje de pérdida de peso mayor a 18%, excepto en los tratamientos realizados con sales de calcio, el de ácido sórbico y el blanco de proceso. En la Tabla 4, se muestra que la velocidad de pérdida de peso para los diferentes tratamientos probados; se puede observar que el testigo, papa-dextrosa, ácido acético y nutrientes, fueron los tratamientos que tuvieron una mayor tasa de pérdida de peso. El caso de la menor velocidad de degradación debida al ácido sórbico puede estar sujeta a algún efecto inhibitorio del mismo. Todos los tratamientos produjeron una reducción de peso de arriba de 0.4 % por día. Los resultados obtenidos son similares a aquellos reportados por Cárdenas y col., (2014) donde se obtuvieron porcentajes de degradación de hasta 21.5% de película utilizando hongos del medio ambiente que crecieron sobre las mismas.

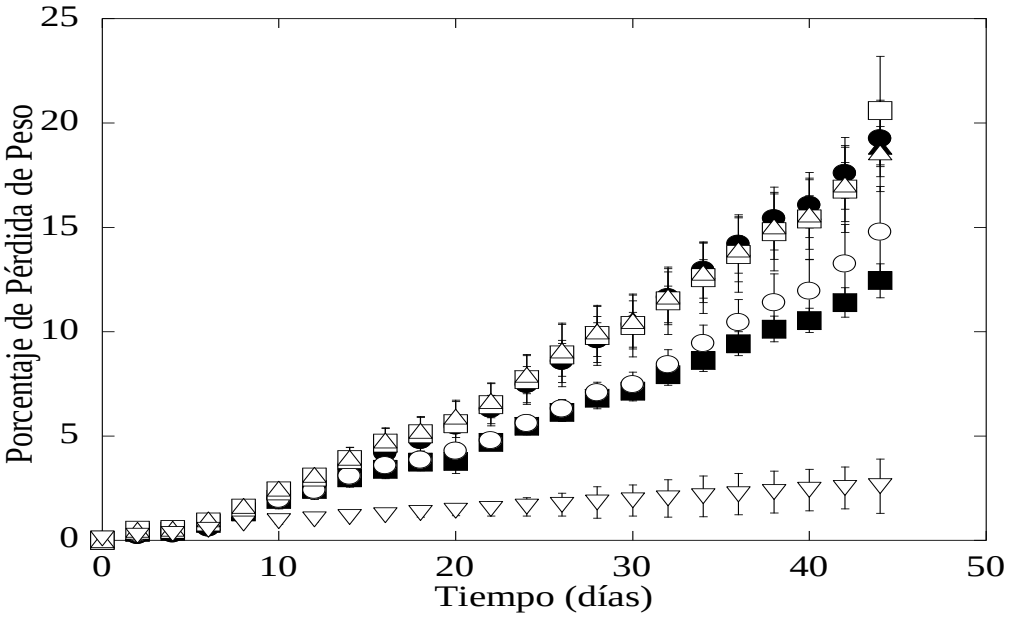


Figura 6. Porcentaje de pérdida de peso en la fermentación en estado sólido para los diferentes tratamientos: Ácido acético ●, Ácido sórbico ■, Nutrientes ▲, Sales ○ Papa-Dextrosa □, Testigo ∆, Blanco ∇.

Tabla 9. Velocidad de pérdida de peso en la sacarificación.

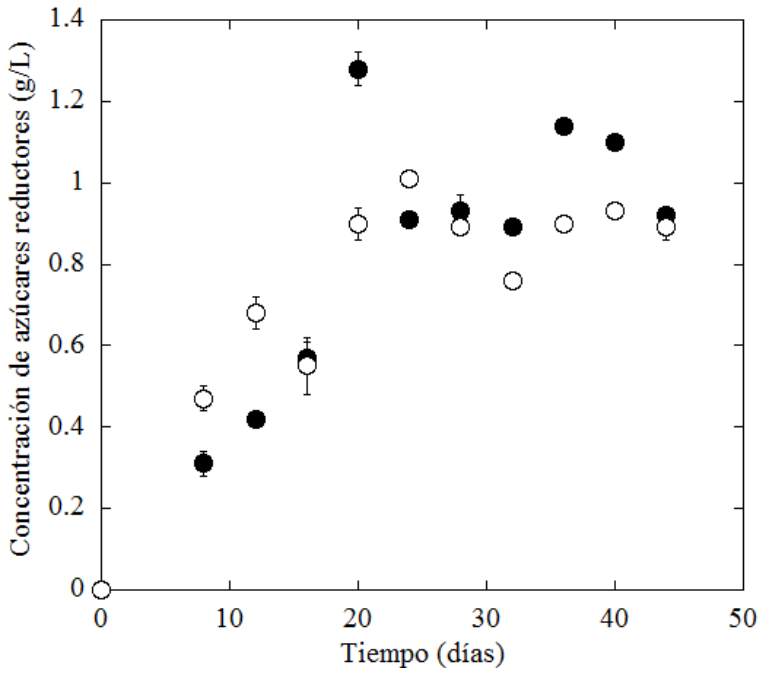
Tratamiento	**Velocidad de pérdida de peso en la sacarificación**	**Tratamiento**	**Velocidad de pérdida de peso en la sacarificación**
Ácido acético	0.4447 a	Sales	0.3219 bc
Nutrientes	0.4326 a	Ácido sórbico	0.2815 c
Papa y dextrosa	0.4322 a	Blanco	0.0550 c
Testigo	0.4251 ab		

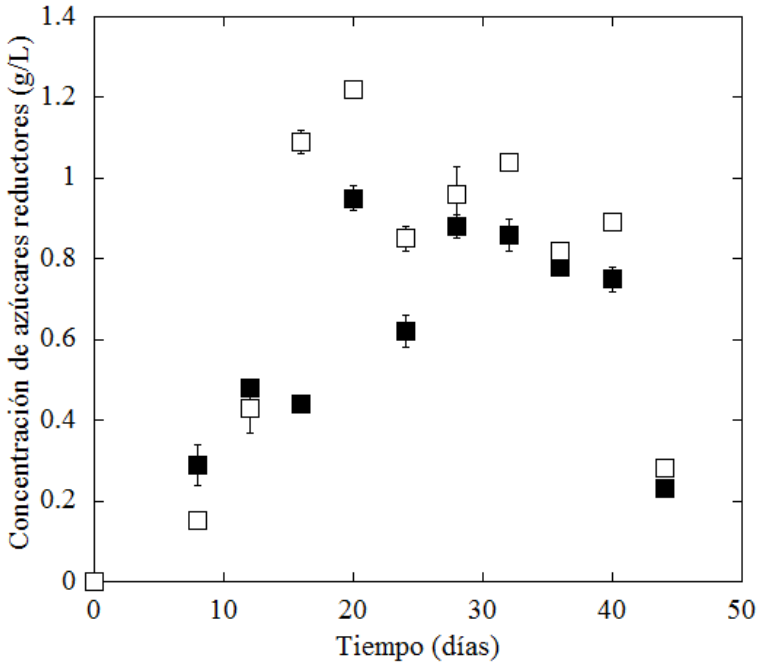
Diferencia de medias de acuerdo a la prueba Tukey-Kramer $p<0.05$

4.2. Evaluación de la producción de azúcares reductores en los tratamientos.

Durante la cinética de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* se puede observar en la Figura 7 que para los 6 tratamientos se ve un aumento en la concentración de azúcares reductores en los extractos, alcanzándose un valor máximo el día 20, en el cual se obtuvieron los siguientes resultados máximos: ácido acético 1.28 g/L; papa y dextrosa 1.24 g/L; sales (carbonato y sulfato de calcio) 1.22 g/L; testigo 1.12 g/L; ácido sórbico 0.99 g/L; nutrientes 0.95 g/L. A partir del día 20, la concentración de glucosa comenzó a disminuir en todos los tratamientos. Esto coincide con lo observado por Khalil y col., (2011), quienes también emplearon *Pleurotus ostreatus* para la degradación de material lignocelulósico, dichos autores observaron una disminución en la concentración de glucosa en los extractos a partir del día 12. Este comportamiento puede deberse a que antes de alcanzarse la concentración máxima de glucosa, la velocidad de consumo de la misma por el microorganismo es menor a la velocidad de su liberación a partir de la hidrólisis de la celulosa de las películas; después, la disminución de su concentración en los extractos indica el consumo de la fuente de carbono por el microorganismo.

A pesar de que en el presente trabajo se muestra que es posible obtener azúcares reductores extraíbles a partir de la fermentación en estado sólido de películas de celulosa, la concentración máxima obtenida no es como la reportada en el acervo internacional. Por ejemplo, Sreenath y Koegel (2008) obtienen extractos con concentraciones de 5-8 g/L de glucosa a partir de la degradación de una combinación de película de celulosa con salvado de trigo utilizando *Trichoderma reesei.* Las diferencias se pueden atribuir a la utilización de distintos microorganismos para llevar a cabo la fermentación. En un experimento similar, donde se degradaron películas con hongos nativos que crecieron sobre las mismas, Cárdenas y col., (2014) reportaron concentraciones de glucosa de 0.3-1.4 g/L, similares a las obtenidas en este trabajo.


Concentración de azúcares reductores (g/L)
Tiempo (días)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
0
10
20
30
40
50


Concentración de azúcares reductores (g/L)
Tiempo (días)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
0
10
20
30
40
50

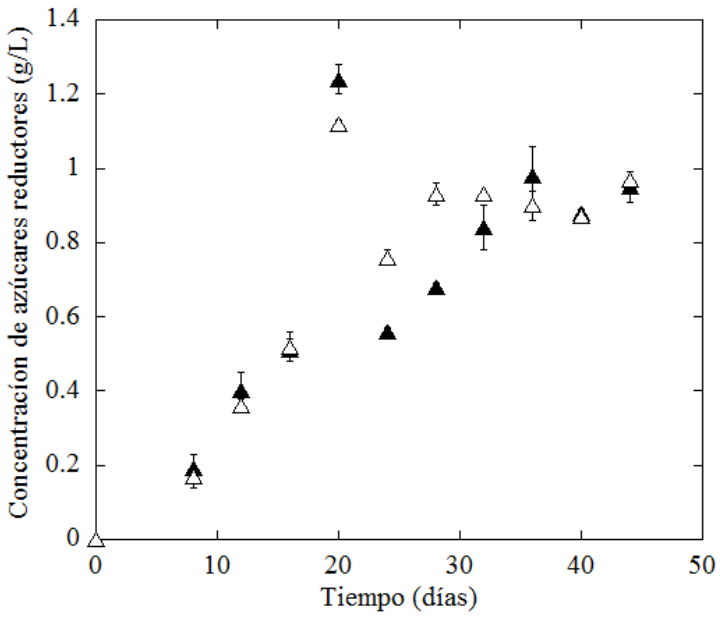


Figura 7. Concentración de azúcares reductores en los tratamientos: Ácido acético ●, Ácido sórbico ■, Nutrientes ▲, Sales ○ Papa-Dextrosa □, Testigo △

4.3. Actividad enzimática de los extractos.

La actividad enzimática del extracto aumentó en función de los días de fermentación. Para este experimento, el valor máximo obtenido fue de 0.029 UI/mL de extracto, con el tratamiento de papa dextrosa alrededor de los 20 días de iniciada la fermentación (ver Figura 8). A pesar de la dificultad que implica comparar el valor con los diferentes trabajos en donde se cultivó *P. ostreatus* debido a que la actividad en dichos trabajos se expresa en diferentes unidades (Khalil, et. al,2011; Rodrigues da Luz, et. al, 2012). En este trabajo y en el realizado por Khalil y col., (2011), se observa que la actividad celulásica de los extractos de *P. otreatus* alcanzan un máximo (a los 12 días, en la referencia y entre los 20 y 30 días para este trabajo) y luego decrecer. La diferencia, puede deberse a una mejor adaptación del hongo a los sustratos probados en la referencia con respecto a las películas de celulosa. La máxima actividad obtenida en este trabajo, es de un orden de magnitud similar a la obtenida en otros trabajos llevados a cabo con hongos en otros sustratos tales como celulosa natural o residuos como paja o aserrín, Murali y col. (1994) obtienen actividades de entre 0.09 hasta 0.33 UI/mL en tratamientos llevados a cabo

con varias especies de *Fusarium*, Cárdenas (2014) y col. obtuvieron actividades de entre 0.039 y 0.056 UI/mL tratando las película de celulosa con hongos nativos de la película.

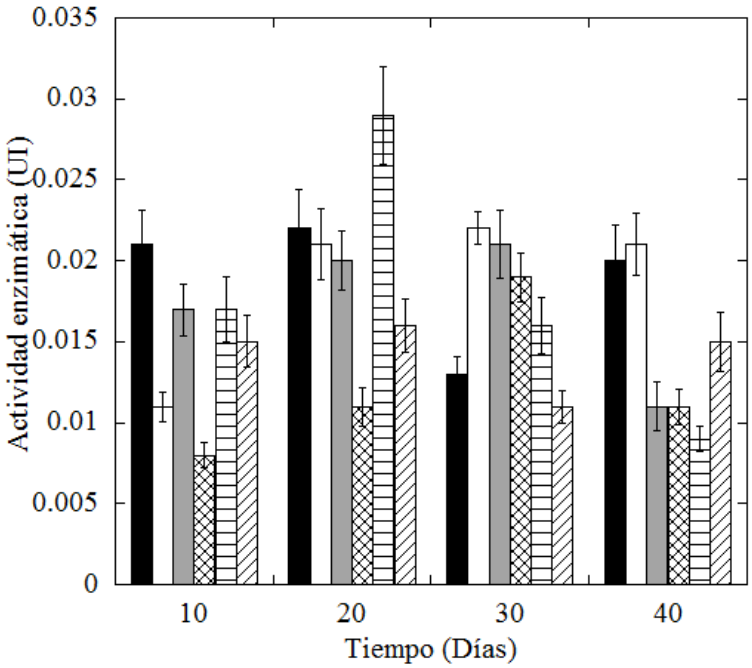


Figura 8. Actividad enzimática en los tratamientos: Ácido acético ■, Sales □, Testigo ▒, Ácido sórbico ▩, Papa-Dextrosa ▤, Nutrientes ◪

4.4. Obtención de etanol a partir de los extractos.

Las concentraciones de glucosa obtenidas en los extractos fueron de alrededor de 1.2 g/L. Para poder obtener mayores concentraciones de etanol en la fermentación, se realizó una concentración de los extractos mediante evaporación para poder llevar a cabo la conversión de glucosa a etanol.

De los 6 tratamientos probados, sólo se concentraron aquellos en los que se obtuvo una mayor concentración de azúcares reductores a los 20 días para realizar la fermentación alcohólica con *Saccharomyces cerevisiae*. Estos tratamientos fueron: ácido acético; papa-dextrosa; sales (carbonato y sulfato de calcio) (ver sección 4.2). Las concentraciones de azúcares reductores en los extractos tras ser evaporados fueron: ácido acético 34.24 g/L; papa y dextrosa 28.02 g/L y para el de sales 20.49 g/L. Además, con fines de comparación,

se preparó un tratamiento al cuál se le denominó “Blanco”, el cual contenía glucosa en una concentración de 59.658 g/L y fue inoculado bajo las mismas condiciones de los otros tratamientos.

Los resultados de la cinética de consumo de glucosa y producción de etanol se muestran en la Figura 9. Las máximas concentraciones de etanol obtenidas para cada tratamiento se resumen en la Tabla 10. para compararlas con aquellas obtenidas con otros

Tabla 10. Concentraciones y rendimientos máximos de etanol.

Tratamiento	Días de degradación por el hongo del residuo previo a la fermentación alcohólica	Máxima concentración de etanol (g/L) lograda en la fermentación con levadura	Rendimiento de etanol (g de etanol producidos/g de glucosa consumida)
Ácido acético	20	18.5 a las 18 h	0.54
Papa-dextrosa	20	17.2 a las 18 h	0.62
Sales	20	5.5 a las 30 h	0.27
Blanco (Concentración inicial de glucosa 59.659 g/L)	N/A	31.16 a las 36 h	0.52
Sreenath y Koegel (2008)	4	25 a las 50 h	Se realizó sacarificación y fermentación simultáneas (No se determinó concentración inicial de glucosa)
Paredes (2010)	24	3.25 % $^{v}/_{v}$ a los 9 días	0.43

autores en experimentos similares. Se puede observar que los mejores tratamientos para la obtención de etanol fueron aquellos realizados con ácido acético y papa-dextrosa, los cuales son comparables a los obtenidos por otros autores; además, tras comparar el rendimiento de la fermentación alcohólica del blanco con aquel obtenido en los otros tratamientos, se observa que se obtienen resultados similares, lo cual indica que no hubo problemas de inhibición por sustancias presentes en el medio de fermentación (tales como el glicerol presente en las películas o los furfurales que se producen por el calentamiento de los azúcares en el proceso de evaporación) que pudieran inhibir el metabolismo de las levaduras. En la Tabla 10 se puede observar un bajo rendimiento de etanol para el tratamiento realizado con las sales de calcio posiblemente debido a un efecto inhibitorio de las mismas sobre el crecimiento de la levadura en los extractos concentrados.

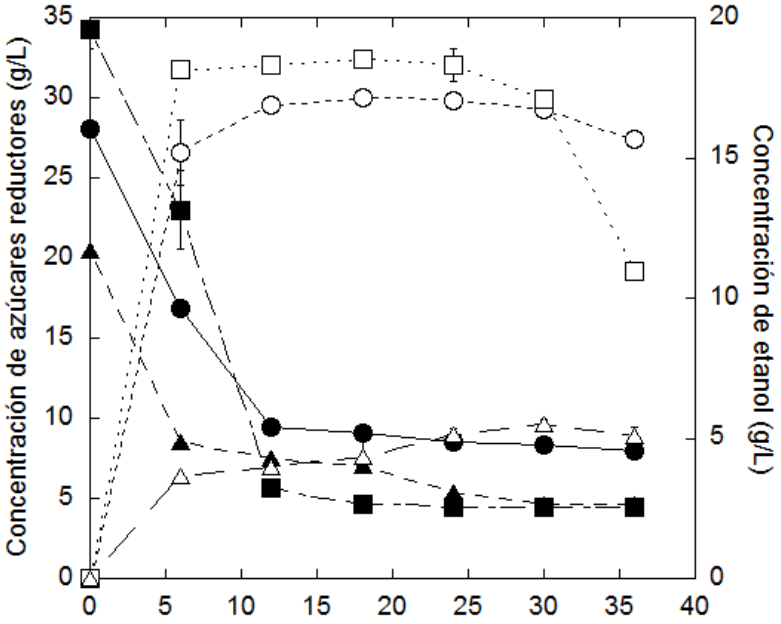


Figura 9. Cinética de consumo de azúcares reductores y producción de etanol de los diferentes tratamientos. Concentración de azúcares en el medio de fermentación: Papa dextrosa (-●-), ácido acético (-■-), sales (-▲-). Concentración de etanol en el medio de Papa dextrosa (-○-), ácido acético (-□-), sales (-△-)

5. Conclusiones.

Fue posible degradar entre un 12.44-20.60 % de las películas residuales de celulosa usándolas como sustrato para el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en fermentación en estado sólido en medios enriquecidos con diferentes nutrientes en 44 días. Además, se obtuvieron extractos con actividades enzimáticas máximas de 0.029 UI/mL a los 20 días de fermentación. Finalmente, al mismo tiempo, se alcanzaron concentraciones máximas de azúcares reductores de 1.28 g/L y 1.24 g/L con medios suplementados con ácido acético y papa-dextrosa respectivamente; al concentrar dichos extractos y fermentarlos con *Saccharomyces cerevisiae*, se obtienen concentraciones máximas de 18.5 y 17.2 g/L de etanol, así como rendimientos de 0.54 y 0.62 g etanol/g de glucosa.

Por lo anterior, la fermentación en estado sólido del residuo de celulosa con *Pleurotus ostreatus* se presenta como una alternativa factible debido a que se demostró que degrada el residuo celulósico. A pesar de lo anterior, el proceso no se presenta como una alternativa económicamente viable para producir etanol a partir del mismo debido a la baja concentración de azúcares reductores obtenida y la necesidad de concentrar los extractos. Por otro lado, la opción de extraer enzimas se presenta como una opción interesante, debido a que los extractos contienen actividades comparables con aquellas obtenidas en otros trabajos. Sin embargo se debe continuar el trabajo de purificación de los mismos.

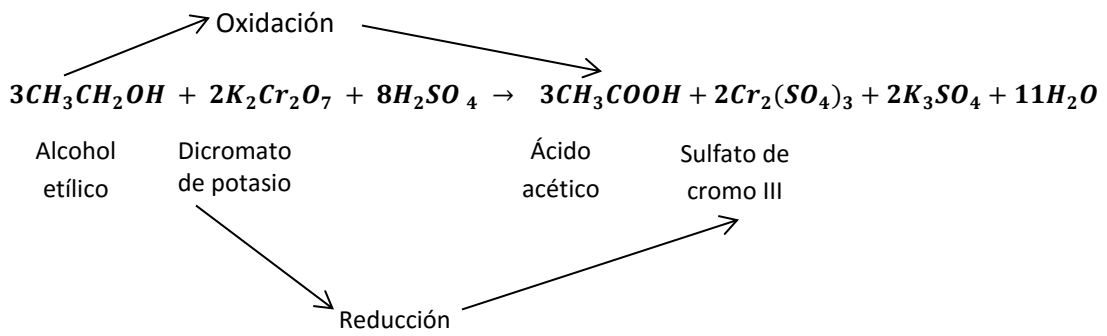
6. Recomendaciones.

Como continuación de este trabajo, se recomienda probar métodos para aumentar la actividad enzimática de los extractos celulósicos. Esto puede realizarse mediante una purificación de las enzimas mediante la adición de sales tales como el sulfato de amonio para su precipitación o por separación por cromatografía de columna.

7. Anexos

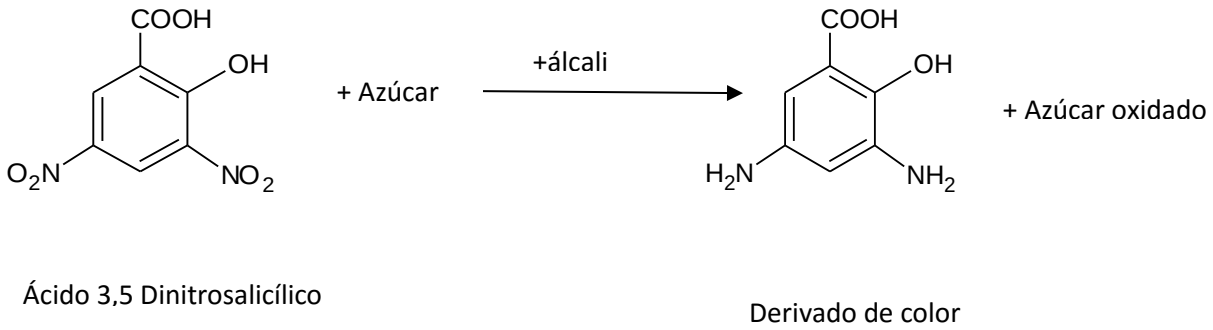
7.1. Reacción de óxido-reducción para la determinación de etanol.

Para la determinación de la concentración de etanol se lleva a cabo una reacción de óxido-reducción con dicromato de potasio, en la cual se oxida el etanol a ácido acético, y el Cr^{+6} del dicromato se reduce a Cr^{+3} formando sulfato de cromo III, un compuesto que absorbe la luz de una longitud de onda de alrededor de 585 nm. La reacción química es la siguiente:



7.2. Reacción para la determinación de azúcares reductores.

Para determinar azúcares a los extractos se utilizó la técnica citada por Sumner y Sisler (1944) utilizando DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico), en la cual se obtiene un producto de color café intenso derivado de la reacción del DNS con azúcares reductores. La concentración de los azúcares reductores es proporcional a la absorbancia a 490 nm del producto formado de acuerdo a la siguiente reacción:



8. Referencias.

Aleksandrovich, I. F., Inozemtseva, S. I., y Pakshver, A. B. (1976). Effect of Mineral Oil on the Properties of Regenerated-Cellulose Film. UDC, 654 y 655.

Babu, V., Thlapliyal, A. y Kumar-Pater, G. (2014). *Biofuels Production.* Scrivener Publishing.

Cárdenas, G. (2014). Degradación de películas de celulosa residual mediante hongos para la producción de enzimas celulásicas y estudio sobre degradación usando celulasas de *Trichoderma reesei.* (Tesis de Licenciatura) Universidad Politécnica de Guanajuato.

Chang, S. T. (1980). Mushrooms as human food. *BioScience* 30(6): 399-401.

Chundawat, S.P.S., Bellesia, G., Uppugundla, N., da Costa Sousa, L., Gao, D., Cheh, A.M., Agarwal, U.P., Bianchetti, C.M., Phillips, G.N., Langan, P., Balan, N., Gnanakaran, S. y Dale, B.E. (2011) Restructuring the crystalline cellulose hydrogen bond network enhances its depolymerization rate *J. Am. Chem. Soc.* 133(29), 11163-11174.

Chutmanop, J., Chuichulcherm, S., Chisti, Y. y Srinophakun, P. (2008). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83(7): 1012-1018.

da Silva, R., Lago, E.S., Merheb, C.W., Macchione, M.M., Park, Y.K. y Gomes, E. (2005) Production of Xylnase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus miehe*. *Braz. J. Microbiol.* 36(3): 235-241

Dale, B.E., Henk, L.L. y Shiang, M. (1984) Fermentation of lignocellulosic materials treated by ammonia freeze-explosion. *Dev. Ind. Microbiol*. 26: 223–233.

de Oliveira, P.L., Biz, A., Mallmann, E., Krieger, N. y Mitchell, D.A. (2016). Production of pectinases by solid-state fermentation in a pilot scale packed-bed bioreactor. *Chem. Eng J.* 283: 1009-1018

Deepalakshmi, K. y Mirunalini, S. (2014) *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *J. Biochem. Tech.* 5(2): 718-726

Demirbas, A. (2004). Effects of the temperature and particle size on bio-char yield from pyrolysis of agricultural residues. *J. Anal. Appl Pyrol.* 72(2): 243-248.

Duff, S.J.B. y Murray W.D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol: a review. *Bioresour. Technol*. 55(1): 1–33.

Dussán, K. J., Silva, D.D.V, Moraes, E. J. C., Arruda, P.V. y Felipe, M.G.A. (2014) Dilute-acid hydrolysis of cellulose to glucose from sugarcane bagasse. *Chem. Eng. Trans.* 38: 433-438.

Eggeman, T. y Elander, R.T. (2005) Process and economic analysis of pre-treatment technologies. *Bioresour.Technol*. 96(18): 2019-2025.

Fan, L.T., Gharpuray, M.M. y Lee, YH (1987) In: Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs. Berlin, Springer.

Farias, M.A., Valoni, E.A., Castro, A.M. y Coelho, M.A.Z. (2014) Lipase production by *Yarrowia lipolytica* in solid-state fermentation using different agro industrial residues. *Chem. Eng. Trans.* 38: 301-306

Franco, B. T. 2010. Panorama de la celulosa. Sinopsis de la importancia del sector forestal en chile. 1-50. www.wrm.orq.uy/plantaciones/Libro celulosa.pdf. 2012

García-Cubero, M.T., González-Benito, G., Indacoechea, I., Coca, M. y Bolado, S. (2009) Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresour. Technol.* 100(4): 1608-1613.

Ghadi, A., Mahjoub, S. y Mehravar, R. (2011). Management of Glucose Production from Rice Husk by Solid State Fermentation Method. *IPCBEE* 18: 93-97

Gómez-Castillo, J. (2010) Sistema ecológico para disponer celulosa industrial. Cultivo de *Pleurotu*s spp. Empacadora Celaya S.A. de C.V. Celaya. no publicado.

Granda, R.D.M., Mejía, G.A.I. y Jiménez, T.G.A. (2005). Utilización de residuos de plátano para la producción de metabolitos secundarios por fermentación en estado sólido con el hongo *Lentinus crinitus. Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia, Medellín - Colombia.* págs. 12(2):13-20.

Gray, K.S., Zhao L. y Emptage M. (2006) *Bioethanol. Curr. Opin. Chem. Biol.* 10: 141-146.

Han, J. (2003) Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete Hericium erinaceum for degrading starch and upgrading nutritional value. *Int. J. Food Microbiol.* 80(1):61-66.

Han, J.R., An, C.H. y Yuan, J.M. (2005) Solid state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Ganoderma lucidum* for degrading starch and upgrading nutritional value. *J. Appl. Microbiol.* 99(4):910-915

Hatakka, A.I. (1983) Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymatic saccharification of cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 18: 350–357.

Holtzapple, M.T., Jun J.H., Ashok G., Patibandla, S.L. y Dale, B.E. (1991) The ammonia freeze explosion (AFEX) process: a practical lignocellulose pretreatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28/29: 59–74.

Humphrey, A.E. y Deindoerfer, F.H. (1961) Fermentation. Unit Processess Review. *Ind. Eng Chem.* 53(11): 934-946.

Isikhuemhen, O.S. y Mikiashvilli, N.A. (2009) Lignocellulolytic enzyme activity, substrate utilization, and mushroom yield by *Pleurotus ostreatus* cultivated on substrate containing anaerobic digester solids. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36(11):1353-1362.

Kachlishvili, E., Khardziani, T., Metreveli, E., Kobakhidze, A. y Elisashvili, V. (2012) Screening of novel basidiomycetes for the production of lignocellulytic enzymes during fermentation of food wastes. Journal of Waste Conversion, *Bioproducts and Biotechnology* 1(1):9-15

Karp, S.G., Faraco, V., Amore, A., Birolo, L., Giangrande, C., Soccol, V.T., Pandey, A. y Soccol, C.R. (2012) Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Bioresource Technol.* 114: 735-739.

Khalil, M.I., Hoque, M. M., Basunia, M. A., Alam N. y Khan, M. A. (2011). Production of cellulase by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* in solid-state fermentation of lignocellulolisic biomass. *Turk. J. Agric. For.* 35:333-341

Khan, M.A. (2010) Nutritional composition and hypocholesterolemic effect of mushrooms: *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus florida*: LAP Lambert Academic Publishing Gmbh &co KG: Saarbrucken, Germany 1-11

Kirk, T.K. y Jeffries T.W. (1996) Roles for microbial enzymes in pulp and paper processing. En Jeffries, T.W. y Viikari, L. (eds) Enzymes for Pulp and Paper Processing. (pp. 2–14) American Chemical Society, Washington DC.

Kumar, D., Jain, V.K., Shanker, G. y Srivastava, A. (2003) Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. *Process Biochem.* 38(12): 1731-1738

Lacerda T.M., Zambon, M.D. y Frollini, E. (2013) Effect of acid concentration and pulp properties on hydrolysis reactions of mercerized sisal. *Carbohyd. Polym.* 93(1): 347-356.

Lynd, L., Weimer, P., van Zyl, W. y Pretorius, I. (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (66)3: 506–577.

Mackie, K.L., Brownell, H.H., West, K.L. y Saddler J.N. (1985) Effect of sulphur dioxide and sulphuric acid on steam explosion of aspenwood. *J. Wood Chem. Technol*. 5: 405–425.

Mahadik, N.D., Puntambekar, U.S., Bastawde, K.B., Khire, J.M. y Gokhale, D.V. (2002) Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochem.* 38(5): 715-721

Mathew, A.K., Parameshwaran, B., Sukumaran, R.K. y Pandey, A. (2016) An evaluation of dilute acid and ammonia fiber explosion pretreatment for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technol.* 199: 13-20

Maulin, P., Shah, G.V., Reddy, R., Banerjee, P., Ravindra-Babu, I. y Kothari, L. (2004) Microbial degradation of banana waste under solid state bioprocessing using two lignocellulolytic fungi (*Phylosticta* spp. MPS-001 and *Aspergillus* spp. MPS -002). *Process Biochem.* 40(1):445-451

Miller G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3):426–428

Millet, M.A., Baker, A.J. y Scatter, L.D. (1976) Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification. *Biotech.Bioeng. Symp*. 6: 125–153.

Moldes, A. B., Cruz, J. M., Domínguez, J. M. y Parajó, J. C. (2002). Production of a cellulosic substrate susceptible to enzimatic hydrolysis from prehidrolized barley husks. *Agr. Food Sci. Finland*. 11(1): 51-58.

Murali, H.S., Mohan, M.S., Manja, K.S. y Sankaran, R. (1994). Cellulolytic activity of four *Fusarium* spp. World J. Microbiol. Biotechnol. 10(4): 487

Monterroso, F.O.G. (2007). Efecto de la suplementación de la caña de maíz (*Zea mays L*.) con nitrato de amonio, nitrato de potasio y urea en el cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus* (Cepa ECS- 152). (Tesis de Licenciatura) obtenida de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2546.pdf

Narra, M., Dixit, G., Divecha, J., Madamwar, D. y Shah, A.R. (2012) Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspegillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. *Bioresource Technol.* 121:355-361

Navarro, A.R. (1994). Effects of furfural on ethanol fermentation by *Sacharomyces cerevisiae*: Mathematical models. *Curr. Microbiol.* 29(2): 87-90

Nicholson, D. M., Kajiwara, E. M., Ducharme, J., Paul, E., McAllister, M. E. y Walta, R. J. (1997). Aparatos para la fabricación de carcasa de alimentos de celulosa. Patente de Estados Unidos # 5597587 Chicago IL. Oficina de Patentes y Marcas Registradas de los Estados Unidos.

Nicholson, M. D. (2006) Recycling cellulosic casing. European patent office EP-0692194-B2. Boletín 42.

Niño, L.L., Acosta, C. A. y Gelvez, Z. R. (2013). Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (Manihot esculenta Crantz). *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia* 69: 317-326.

Novelli, P.K., Barros, M.M. y Fleuri, L.F., (2016). Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid-state fermentation and characterization. *Food Chemistry* 198: 119-124

Oei, P. (2003) Mushroom Cultivation: Appropiate Technology for mushroom growers. Leiden, Países Bajos. Backhuys Publishers.

Organic Materials Review Institute (2001). Cellulose Processing. National Organic Standards Board Technical Advisory Panel Review, 1-17.

Ovando-Chacón, S.L. y Waliszewski, K.N. (2005) Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21(42): 111-120.

Paredes, D. Álvarez, M. y Silva, M. (2010). Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo de banano. *Revista tecnológica ESPOL-RTE* 23(1): 81-88.

Pérez, J., Muñoz-Dorado, A., De la Rubia, T. y Martínez, J. (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol*. 5(2): 53–63.

Prado, F.C., Vandenberghe, L.P.S., Woiciechowski, A.L., Rodríguez, L.J.A. y Soccol, C.R. (2005) Citric acid production by solid-state fermentation on a semi-pilot scale using different percentages of treated cassava bagasse. *Braz. J. Chem. Eng.* 22(4): 547-555

Prawitwong, P., Waconukul, R., Tachaapaikoon, C., Pason, P., Ratanakhanokchai, K., Deng, L., Sermsathanaswadi, J., Septiningrum, K., Mori, Y. y Kosugi, A. (2013) Direct glucose production from lignocellulose using *Clostridium thermocellum* cultures supplemented with a thermostable β-glucosidase. *Biotechnology for Biofuels* 184(6): 1-11

Quiroz-Castañeda, R.E., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., Martinez, A., Folch- Mallol, J.L. y Martínez-Anaya, C. (2009) Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium. *Electron. J. Biotechnol.* 12(4):1-8.

Radhika, R.G., Jebapriya, R. y Gnanadoss, J.J. (2013) Production of cellulase and laccase using *Pleurotus* sp. under submerged and solid-state fermentation. *Int. J. Curr. Sci.* 6: E 7-13

Raimbault, M. (1998) General and Microbiological Aspects of Solid-Sustrate Fermentation [versión electrónica] *EJB Electronic Journal of Biotechnology* 1(3): 174-188.

Rezende, M.I., Barbosa, A. de M., Vasconcelos, A.F.D. y Endo, A.S. (2002) Xylanase production by *Trichoderma harzianum rifai* by solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Braz J. Microbiol.* 33(1): 67-72

Rodrigues da Luz, J.M., Dias-Nunes, M., Paes, S.A., Pereira-Torres, D., Soares-da Silva, M.C. y Megumi Kasuya, M.C. (2012) Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. *Braz. J. Microbiol.* 43(4): 1508-1515.

Rodríguez, C. S., y SanRomán, M.A. (2006) Application of Solid-State Fermentation to Food Industry – A review *J. Food Eng.* 76, 291-302

Rodríguez, F.D.E., Rodríguez L.J.E., de Carvalho J.C., Thomas, S.V., Parada, J.L. y Soccol, C.R. (2010) Recovery of phytase produced by solid-state fermentation on citrus peel. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53 (6): 1487-1496

Rodríguez, L.A., Toro, M.E., Vazquez, F., Correa-Daneri, M.L., Gouiric, S.C. y Vallejo, M.D. (2010) Bioethanol production from grape and sugar beet pomaces by solid-state fermentation. *Int. J. Hydrogen Energ.* 35(11): 5914-5917

Rojan, P.J., Nampoothiri, K.M., Nair, A.S. y Pandey, A. (2005) L(+) Lactic acid production using *Lactobacillus casei* in solid state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 27(21): 1685-1688

Rojan, P. J., Nampoothiri, K.M. y Pandey, A. (2006) Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochem.* 41(4):759-763

Rytioja, J., Hildén, K., Yuzon, J., Hatakka, A., de Vries, R.P. y Mäkela, M.R. (2014) Plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetes. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 78(4): 614-649

Sabu, A., Sarita, S., Pandey, A., Bogar, B., Szakacs, G. y Soccol, C.R. (2002). Solid-state fermentation for production of phytase by *Rhyzopus oligosporus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102-103 (1-6): 251-260

Sannigrahi, P. y Ragauskas, A. (2011). Characterization of Fermentation Residues from the Production of Bio-ethanol from Lignocellulosic Feedstocks. *J. Biobased Mater. Bioenergy* 5: 514-519

Saval, S. (2012) Aprovechamiento de los residuos agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. *BioTecnología* 16(2): 14-46.

Silva, D., Tokuioshi, K., da Silva, M.E., Da Silva, R. y Gomes, E. (2005) Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. *Process Biochemistry* 40: 2885-2889

Singh, M.K., Singh, J., Kumar, M. y Thakur, I.S. (2015) Immobilized lipase from Schizophyllum commune ISTL04 for the production of fatty acids methyl esters from cyanobacterial oil. *Bioresour. Tecnol.* 188:214-281

Sreenath, H.K. y Koegel, R.G. (2008). Bioconvertion of spent cellulose sausage casings. *Enzyme Microb. Technol.* 43: 226-232.

Stamets, P. (1993). Growing gourmet and medicinal mushrooms. Berkeley, CA: Ten Speed Press.

Strunk, P., Lindgren, A., Eliasson, B. y Agnemo, R. (2012) Chemical changes of cellulose pulps in the processing to viscose dope. *Cellulose Chem. Technol.* 46 (9-10): 559-569.

Subramaniyam R. y Vimala, R. (2012) Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *Int. J. Sci. Nat.* 3(3):480-486.

Sumner, J. B. y Sisler, E. B. (1944) A simple method for blood sugar. *Arch. Biochem.* 4:333

Sun, X. F., Xu, F., Sun, R.C., Fowler, P., y Baird, M. S. (2005) Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw. *Carbohydr. Res.* 340(1): 97-106.

Sun, Y. y Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83: 1–11.

Suryawati, L., Wilkins, M. R., Bellmer, D., Huhnke, D. y Maness, N.O. (2009). Effect of hydrothermolysis process conditions on pretreated switchgrass composition and ethanol yield by SSF with *Kluyveromyces marxianus* IMB4. *Process Biochem.* 44(5): 540-545

Swain, M.R., Mishra, J. y Thatoi, H. (2013) Bioethanol production from sweet potato (*Ipomea batatas* L.) flour using co-culture of *Trichoderma sp.* and *Saccharomyces cerevisiae* in solid-state fermentation. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 56(2): 171-179

Thanapimmetha, A., Vuttibunchon, K., Titapiwatanakun, B. y Srinophakun, P. (2012). Optimization of Solid State Fermentation for Reducing Sugar Production from Agricultural Residues of Sweet Sorghum by *Trichoderma harzianum. Chiang Mai J. Sci*. 39(2): 270-280.

Vidal, P.F. y Molinier, J. (1988) Ozonolysis of lignin, improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass* 16: 1–17.

Vogel, H.C. y Todaro, C.L. (1997) *Fermentation and Chemical Engineering Handbook*. Westwood, NJ: Noyes Publications.