

**UTILIZACIÓN DE CELULASAS OBTENIDAS POR FERMENTACIÓN EN ESTADO
SÓLIDO DE *Pleurotus ostreatus*, EN LA SACARIFICACIÓN DE PAPEL**

**ROBINSON BYRON MUESES MAFLA
LEIDY JOHANNA ROMO CHAMORRO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO**

2018

**UTILIZACIÓN DE CELULASAS OBTENIDAS POR FERMENTACIÓN EN ESTADO
SÓLIDO DE *Pleurotus ostreatus*, EN LA SACARIFICACIÓN DE PAPEL**

ROBINSON BYRON MUESES MAFLA

LEIDY JOHANNA ROMO CHAMORRO

Trabajo de grado para obtener el título de Ingeniero Agroindustrial

DIRECTORA:

OLGA LUCIA BENAVIDES CALVACHE

Ing. Química, M.Sc.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

SAN JUAN DE PASTO

2018

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en el presente trabajo de grado son de responsabilidad exclusiva de los autores”.

Artículo 1o del acuerdo No.324 del 11 de octubre de 1966, emanado del honorable consejo directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

MSc. Diego Fernando Mejía España

Jurado.

MSc. Veronica Fernanda Jarrin

Jurado

MSc. Olga Lucia Benavides Calvache

Asesor

San Juan de Pasto, 03 de Mayo de 2018

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus sinceros agradecimientos a:

Grupo de Investigación Biotecnología Agroindustrial y Ambiental (BIOTA) por facilitar materiales, reactivos y el uso del laboratorio de bioquímica en el edificio de laboratorios especializados de la Universidad de Nariño.

M.Sc. Olga Benavides Calvache por su apoyo, dirección y colaboración para hacer posible que esta investigación haya culminado con éxito

VoBo LUIS ALEJANDRO GALEANO, PhD. director del Grupo de Investigación en Materiales Funcionales y Catálisis (GIMFC) por facilitar el uso de los equipos del laboratorio de catálisis, y por su colaboración brindada.

M.Sc. Jesus Adriano Romo, director del Grupo de Investigación de Bioquímica-Estudios Genéticos (BIOGEN) por facilitar el uso de los equipos del laboratorio de Bioquímica y Genética.

PhD. William Albarracín Hernández por sus recomendaciones y asesoría brindada.

M.Sc. Ana María García Mora por su colaboración brindada en el desarrollo de la investigación

M.Sc. Diego Mejía España y M.Sc. Verónica Jarrin por sus recomendaciones y correcciones brindadas.

A las personas que de alguna manera colaboraron en la realización y culminación de este trabajo de grado.

DEDICATORIA

Al haber alcanzado mi carrera profesional, dedico este trabajo a mi madre María Graciela Mafla por su amor, consejos y su apoyo incondicional, siempre me has impulsado a seguir adelante. A mi padre Jose Guillermo Mueses por sus consejos, paciencia y tiempo dedicado para hacer posible alcanzar esta meta, lo que he logrado en mi vida ha sido gracias a Ustedes. A mis hermanos Wilmer Alexander Mueses, Jose Camilo Mueses y Andrés Fernando Mueses, en especial a Wilmer gracias por apoyarme en todo momento. A mi familia, mi abuela Rosa Ituyan y en especial a mis tías Isabel, Patricia y Zoila Mafla, gracias por creer y confiar en mí. A mis compañeros de la Universidad por los gratos e inolvidables momentos compartidos y en especial a Carolina Vallejo, gracias por el apoyo, por todo lo compartido y ser esa gran persona que llena de cosas buenas en mí vida.

Robinson Byron Mueses

DEDICATORIA

A DIOS por brindarme luz a cada día de mi vida

A mis padres, HILARIO Y ALBA

Por ser fuente de inspiración y fortaleza en los momentos más difíciles, por creer en mí, por brindarme su apoyo siempre, y por hacer de mí una mejor persona cada día.

A mis hermanos SANDRA Y JESUS,

Por ser más que hermanos, mis amigos del alma, compañeros de aventuras, alegrías y tristezas.

A CHRISTIAN, por estar pendiente de mí, darme su amor a pesar de las dificultades, y permitirme aprender de él y crecer a su lado.

A DANILO, por su amistad incondicional.

A BYRON por su compañía y apoyo en esta etapa y por ser motivo de muchos aprendizajes.

Leidy Romo Chamorro

RESUMEN

Los residuos agroindustriales, en los últimos años han adquirido cada vez mayor importancia debido a su uso en procesos fermentativos para producir diversos productos que tiene valor por su importancia biológica y en su aplicación en la industria de alimentos. Por lo tanto, en los últimos años, centros de investigación y universidades en el mundo han realizado múltiples investigaciones a escala de laboratorio en obtención de enzimas lignocelulolíticas a partir de hongos de la podredumbre blanca empleando como sustratos residuos lignocelulósicos, ya que la utilización de éstos ha resultado ser atractivo para la producción de enzimas.

En cuanto a los hongos de la podredumbre blanca se encuentra *Pleurotus ostreatus* que es capaz de crecer sobre sustratos muy económicos como los residuos lignocelulósicos, y producir enzimas lignolíticas y celulolíticas con numerosas aplicaciones. Sin embargo, aún hay poca información acerca de la obtención de celulasas a partir de este hongo, ya que la mayor parte de las investigaciones se centran en su producción aprovechando residuos lignocelulósicos para su crecimiento, pues este es un hongo comestible que además de su facilidad de cultivo es de gran calidad nutricional, por lo tanto, la mayor parte de las investigaciones se centran en su producción con residuos dejando aparte la producción de extractos enzimáticos producidos por este hongo durante su desarrollo micelial.

En el presente trabajo se determinó espectrofotométricamente la actividad enzimática (celulasas) de *P. ostreatus* en bagazo de fique como sustrato. Los ensayos enzimáticos se realizaron sobre papel filtro y CMC según los métodos establecidos por la IUPAC. La actividad celulasa total (FPasa, actividad sobre papel filtro) fue determinada por la medición de azúcares reductores producidos de la acción enzimática sobre el papel filtro; la actividad endoglucanasa fue determinada por la medición de azúcares reductores liberados de una solución de CMC al

2%. Los ensayos fueron realizados con buffer de citrato 0.05 M a pH 4.8 e incubados a 50 °C por 30 min para CMC y 60 min para papel de filtro. El contenido de azúcares reductores fue determinado usando el método de ácido 5-dinitrosalicílico. Se compararon las actividades enzimáticas para seis tiempos de producción (9, 16, 20, 26, 32, 36 días). De estos se encontró que *P. ostreatus* colonizó por completo el sustrato a los 20 días, etapa en donde se dio la mayor actividad para FPasa con un valor de 0.9978 FPU/ml. Luego de esto a los 26 días se dio la aparición de primordios, periodo en el que la actividad de CMCasa, fue máxima con un valor de 0.5989 IU/ml. Estos periodos de producción del hongo en donde se dio la mayor actividad enzimática fueron tomados para la respectiva optimización de las condiciones de extracción de celulasas con soluciones buffer a diferente pH y evaluadas a diferentes temperaturas de hidrólisis con el fin de obtener la mayor actividad enzimática. La máxima actividad enzimática para FPasa y CMCasa se dio a 69 y 64 °C respectivamente, indicando que estas enzimas fueron termófilas; para el caso del pH para CMCasa y FPasa no varió, en ambos casos se encontró una mayor actividad enzimática a un pH de 6. Finalmente se estudió de la degradación de residuos de papel con las celulasas de *P. ostreatus* bajo las condiciones óptimas encontradas; se encontró que a las 9 horas de hidrólisis hubo una producción de glucosa (mg/ml) con valores de 1.29mg/ml para el papel control(A), 1.11mg/ml para papel previamente tratado(B) y 0.58 mg/ml para papel con tinta(C), después de las 9 horas la producción de glucosa tiende a ser constante en el tiempo para (A), (B), y (C), encontrando un aumento poco significativo a las 12 horas.

Palabras Claves: Celulasas, *Pleurotus Ostreatus*, pH, Temperatura, Fermentación en estado sólido.

ABSTRACT

Agroindustrial waste in recent years have become increasingly important because of its use in fermentation processes to produce various products that have value for their biological importance and its application in the food industry. Therefore, in recent years, research centers and universities in the world have conducted multiple investigations at laboratory scale as obtaining lignocellulolytic enzymes from fungi of white rot using as waste substrates lignocellulosic, since the use of these has proved attractive to the production of enzymes.

As for the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* is that it is able to grow on substrates such as very economical agricultural and agroindustrial waste, and producing lignolytic and cellulolytic enzymes with numerous applications. However, there is still little information about obtaining cellulases from this fungus, since most of the research focuses on production taking advantage of lignocellulosic residues for growth, as this is an edible fungus that besides its ease culture is of great nutritional quality, therefore, most of the research focuses on production residues apart from the production of enzymatic extracts produced by this fungus during mycelial growth.

In the present study enzyme activity (cellulases) *P. ostreatus* bagasse sisal as substrate was determined spectrophotometrically. Enzyme assays were performed on filter paper and CMC according to the methods established by IUPAC. Cellulase activity Total (FPase, activity on filter paper) was determined by measurement of reducing sugars produced enzyme action on the filter paper; endoglucanase activity was determined by measuring reducing sugars released from a solution of 2% CMC. The tests were performed with 0.05 M citrate buffer at pH 4.8 and incubated at 50 ° C for 30 min to 60 min for CMC and filter paper. The content of reducing sugars was determined using the method of 5-dinitrosalicylic. (9, 16, 20, 26, 32, 36). Of these *P. ostreatus* it found that completely colonized the substrate at 20 days, stage where most FPase

activity gave a value of 0.9978 to FPU / ml. After 26 days it began to appear primordia, period in which CMCase activity was highest with a value of 0.5989 IU / ml. These periods of mushroom production where higher enzyme activity was given were taken to respective optimization of extraction conditions cellulases with buffer solutions at different pH and evaluated at different temperatures of hydrolysis in order to obtain the highest enzymatic activity. Maximal enzyme activity and CMCase FPase gave 69 and 64 ° C respectively, indicating that these enzymes were thermophilic, for the case of pH for CMCase and FPase not vary, in both cases a greater enzyme activity was found at pH 6. Finally studied the degradation of waste paper with cellulases *P. ostreatus* under optimum conditions encountered; was found at 9 hours of hydrolysis was a production of glucose (mg / ml) with values of 1.29mg / ml for the control paper (A), 1.11mg / ml pretreated paper (B) and 0.58 mg / ml paper with ink (C), after 9 hours glucose production tends to be constant over time for (a), (B) and (C), finding a highly significant at 12 hours increased.

Keywords: Cellulases, *Pleurotus Ostreatus*, pH, Temperature, Fermentation in solid state

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	16
1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	18
1.1. Planteamiento del problema	18
1.2. Formulación del problema	20
1.3. Justificación	21
2. ESTADO DEL ARTE	24
2.1. Residuos lignocelulósicos	24
2.1.1. Composición de los residuos lignocelulósicos	26
2.2. Bagazo de Fique	29
2.3. Degradación del material lignocelulósico	30
2.3.1. Pretratamientos	31
2.4. <i>Pleurotus ostreatus</i>	35
2.4.1. Clasificación y morfología	35
2.4.2. Cultivo del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>	37
2.4.3. Sustratos utilizados para el cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	39
2.4.4. Degradación de residuos lignocelulósicos por <i>Pleurotus ostreatus</i>	39
2.5. Antecedentes del tema	40
2.5.1. Generalidades de las Enzimas	40
2.5.2. Celulasas	41
2.5.3. Aplicación de celulasas	43
2.5.4. Sistema de Producción de Celulasas	47
2.6. Microorganismos productores de celulasa en SSF	48
2.7. Microorganismos Productores de Celulasas	49
2.8. Residuos Lignocelulósicos en la producción de Bioetanol	52
2.9. Sacarificación del papel	54
3. OBJETIVOS	56
3.1. Objetivo General	56
3.2. Objetivos Específicos	56
4. METODOLOGÍA	57
4.1. Localización de la investigación	57
4.2. Recolección del sustrato	57

4.3. Preparación del sustrato	57
4.4. Cultivo del hongo <i>P. ostreatus</i>	59
4.4.1. Inoculación	59
4.4.2. Incubación	60
4.5. Muestreo para la determinación de la actividad enzimática	60
4.6. Obtención del extracto enzimático.....	61
4.7. Medición de la actividad del extracto enzimático.....	62
4.8. Optimización de condiciones de reacción de las celulasas	63
4.9. Hidrólisis de celulosa a partir de las celulasas obtenidas.....	64
4.10. Diseño experimental	65
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
5.1. Determinación de la actividad enzimática	67
5.2. Optimización de condiciones de reacción de las celulasas	74
5.2.1. Determinación de condiciones óptimas para FPasa	74
5.2.2. Determinación de condiciones óptimas para CMCasa.....	79
5.3. Hidrolisis enzimática de papel reciclado	86
CONCLUSIONES	94
RECOMENDACIONES	96
BIBLIOGRAFÍA.....	98
ANEXOS.....	117

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos	29
Tabla 2. Métodos de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol	33
Tabla 3. Algunas aplicaciones actuales y potenciales de enzimas celulasas.....	45
Tabla 4. Matriz experimental con valores de las variables codificadas de acuerdo con el Diseño Central compuesto	64
Tabla 5. Matriz de ensayos para determinar el punto óptimo para FPasa.....	74
Tabla 6. Resultados del Análisis de Varianza para FPasa.....	75
Tabla 7. Combinación de factores para optimizar la actividad FPasa de extracto enzimático de <i>P. ostreatus</i>	79
Tabla 8. Matriz de ensayos para determinar el punto óptimo para CMCasa	79
Tabla 9. Resultados del análisis de varianza para CMCasa	80
Tabla 10. Combinación de factores para optimizar la actividad CMCasa de extracto enzimático de <i>P. ostreatus</i>	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la pared celular de la planta	26
Figura 2. Recolección del Bagazo de fique.....	57
Figura 3. Pretratamiento del Bagazo de Fique	58
Figura 4. Preparación del Sustrato	59
Figura 5. Inoculación del sustrato	59
Figura 6. Inoculación de <i>P. ostreatus</i>	60
Figura 7. Muestreo para la determinación enzimática	61
Figura 8. Preparación del extracto enzimático	62
Figura 9. Medición Actividad Enzimática	63
Figura 10. Pretratamiento residuo de papel.....	65
Figura 11. Producción de Celulasas [IU/ml] de <i>P. ostreatus</i> en bagazo de fique durante su crecimiento	67
Figura 12. Diagrama de Pareto del efecto estandarizado de las variables de estudio sobre la actividad FPasa del extracto enzimático de <i>P. ostreatus</i>	76
Figura 13. Efectos de las variables de estudio sobre la actividad FPasa.....	77
Figura 14. Superficie de Respuesta para actividad FPasa.....	78
Figura 15. Diagrama de contorno del efecto del pH y Temperatura sobre la actividad FPasa .	78
Figura 16. Diagrama de Pareto del efecto estandarizado de las variables de estudio sobre la actividad CMCasa del extracto enzimático de <i>P. ostreatus</i>	81
Figura 17. Efectos principales sobre la actividad CMCasa.....	82
Figura 18. Superficie de Respuesta para actividad CMCasa.....	82
Figura 19. Diagrama de contorno del efecto del pH y Temperatura sobre la actividad CMCasa	83
Figura 20. Degradación del papel con celulasas de <i>P. ostreatus</i>	87
Figura 21. Hidrolisis enzimática de celulasas de <i>P. ostreatus</i> en Papel con tinta.....	88

INTRODUCCIÓN

Colombia por su posición geográfica y variedad de climas, ofrece condiciones favorables para el desarrollo de actividades agropecuarias. El país cuenta con una superficie continental de 114.174.800 hectáreas, de las cuales el 44.77% se estima que se destina a la actividad agropecuaria. Esto evidencia que en Colombia el sector agropecuario es una fuente importante de biomasa residual agrícola. La biomasa de este sector está conformada por los subproductos que se generan por los procesos de recolección como residuos agrícolas de cosecha y residuos agroindustriales (Hernández, Prada, Zapata, Cardona & Duarte, 2011). Y si estos no son reciclados o procesados apropiadamente genera una alta tasa de contaminación debido a la problemática de su disposición final, provocando una acumulación de estos y finalmente la contaminación de los recursos naturales: suelo, agua y aire, además de plantas y animales de los alrededores; también lastimosamente, a nivel global muchos de estos residuos son generalmente eliminados mediante la quema de biomasa (Vallejos, 2013).

Sin embargo, en los últimos años ha habido un interés significativo en el uso eficiente de los residuos agrícolas y agroindustriales, por lo tanto, varios procesos se han desarrollado con estos materiales como sustratos en bioprocesos para la producción de proteínas, ácidos orgánicos, etanol, hongos comestibles, enzimas y metabolitos secundarios biológicamente importantes (Reddy, Babu, Komaraiah, Roy & Kothari, 2003).

Entre los diferentes residuos agroindustriales se encuentra el bagazo de fique, un residuo tipo lignocelulósico, compuesto en mayor proporción de celulosa, seguido de hemicelulosa y lignina (Castro, Guzmán & Escalante, 2014). Estos materiales lignocelulósicos son sustratos eficientes para hongos de la podredumbre blanca, que produce enzimas ligninolíticas y celulolíticas que

tienen numerosas aplicaciones en procesos industriales para el uso de alimentos, medicamentos, textiles y tintes (Reddy et al., 2003).

En cuanto a las enzimas celulolíticas (celulasas) son empleadas a nivel industrial en procesos de hidrolisis de celulosa a glucosa (Rangel, 2012). Las celulasas son el medio tecnológico más prometedor en la conversión de la biomasa lignocelulósica, para la producción de etanol celulósico (Khalil, Hoque, Basunia, Alam & Khan, 2011), esto ha llevado que las celulasas sean enzimas de gran importancia industrial, además de que se espera la demanda de esta enzima este altamente motivada por las industrias de producción de biocombustibles. Por ello, la producción y eficiencia de las celulasas se ha convertido en uno de los principales puntos de atención a enfocar a escala industrial (Srivastava et al., 2017).

Por lo anterior el presente estudio se centró en determinar la actividad enzimática (celulasas), del hongo de la podredumbre blanca *Pleurotus ostreatus*, cultivado en bagazo de fique y la vez se evaluó su potencial mediante el estudio de las celulasas en la hidrólisis en papel y de esta forma determinar sus posibilidades industriales, lo cual impulsa la gestión ecológica de los residuos y la importancia de su buen aprovechamiento.

1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

Colombia es el primer productor de fibra de fique a nivel mundial, esta planta es utilizada desde tiempos inmemoriales para artesanías y empaques (Hoyos, Velasco & López, 2012). No obstante, la aplicación de las fibras del fique solo es aprovechado el 4%; el 96% restante es subutilizado y frecuentemente desechado. Esta fracción no utilizada corresponde, en menor parte (aproximadamente 25%), a los biosólidos (bagazo) generado del proceso de extracción de la fibra; este bagazo se dispone frecuentemente sobre los suelos sin control alguno, generando malos olores y atracción de vectores (Lozano, 2011).

Dado que el bagazo de fique casi siempre es desechado como residuo (Lozano, 2011), surge la necesidad de encontrar mayores y mejores aplicaciones para éste; ya que al ser un residuo tipo lignocelulósico, se puede emplear como sustrato para el cultivo de hongos filamentosos, capaces de producir enzimas extracelulares con importantes aplicaciones industriales, como las celulasas, que pueden ser empleadas en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica para la producción de etanol (Medina, Núñez & Ordoñez, 2010).

Además, las celulasas juegan un papel importante en las economías emergentes de varios procesos biotecnológicos como alimentos, textiles, papel, agricultura y la bioenergía. Sin embargo, el coste de producción de estas enzimas es muy alta, representan el 40-60% del coste total de la producción, igualmente las celulasas de fuentes comerciales para la producción de etanol celulósico contribuyen con el 22.5-43.4% del costo total; esto constituye en un obstáculo importante en su comercialización, por esta razón en los últimos años las investigaciones se han centrado en la reducción del costo de esta enzima, mediante el empleo de abundante biomasa

lignocelulósica, especialmente de residuos agrícolas o agroindustriales como sustratos para ayudar a reducir su precio (Dhillon, Oberoi, Kaur, Bansal & Brar, 2011).

Por lo anterior, el presente estudio plantea y evalúa la obtención de celulasas, empleando como sustrato bagazo de fique y con el hongo de la podredumbre blanca *P. ostreatus*, debido a que este hongo produce una amplia gama de enzimas lignocelulolíticas extracelulares, también denominadas enzimas fibrolíticas, que incluyen: xilanasas, celulasas y lacasas (Membrillo, Sánchez, Meneses, Favela & Loera, 2008), además hasta el momento no se han realizado investigaciones en cuanto a la obtención de celulasas con este residuo y con este tipo de hongo, por lo tanto, la investigación da la posibilidad de dar un mayor valor agregado a este residuo utilizándolo en fermentación en estado sólido como soporte y fuente de carbono para inducir la producción de celulasas y de esta forma ofrecer una alternativa de manejo a los residuos para el pequeño agricultor. Además *P. ostreatus* es uno de los hongos comestibles más estudiado y cultivado durante los últimos años por su facilidad de cultivo y su calidad nutricional (López, Hernández, Suárez & Borrero, 2008); el cual lo convierte aún más como una de las mejores alternativas para aprovechar los residuos lignocelulósicos.

Al mismo tiempo, se evaluó las celulasas de *P. ostreatus* en la hidrólisis de celulosa sobre residuos de papel, con el fin de determinar su efectividad en la hidrólisis sobre dicho residuo, ya que con la investigación no solo se buscó aprovechar uno de los residuos lignocelulósicos como lo es el bagazo de fique sino también aprovechar residuos sólidos municipales; dentro de estos el papel que se ha convertido en un serio problema de contaminación ambiental; ya que por una parte, la tecnología de reciclado de papel presenta limitaciones; por ejemplo, se necesita una tecnología eficaz para la eliminación de tinta para la producción de productos de papel de alta calidad; la fibra de papel solo se puede reciclar a través de un número limitado de ciclos y el

reciclaje del papel es muy difícil si este se ha mezclado con otros residuos orgánicos (residuos de cocina, jardín, etc) (Wang, Sharifzadeh, Templer & Murphy, 2012). En este sentido la aplicación de las celulasas sobre residuos de papel se ve como la búsqueda de nuevas alternativas y desarrollo de procesos industriales con bajo impacto ambiental y a su vez que contribuyan la investigación de biocombustibles con bajos costos de producción.

1.2. Formulación del problema

¿Cuáles son las condiciones óptimas de reacción de las celulasas obtenidas de *Pleurotus ostreatus* a partir de fermentación sólida y su potencial en la sacarificación del papel?

1.3. Justificación

El beneficio del fique en Colombia genera alrededor de 20.800 Kg de residuos por hectárea sembrada, conformados por jugo y bagazo; estos residuos actualmente son desechados al medio ambiente sin ningún tratamiento (Castro, Escalante, Quintero & Guzmán, 2009). Teniendo en cuenta que el cultivo de esta planta es el único medio de subsistencia de cerca de 13000 familias campesinas en Colombia y genera más de 60000 empleos directos (Lozano, 2011), surge la necesidad de buscar usos alternativos para estos residuos, de esta forma se evitaría el desperdicio de grandes cantidades de materia prima (bagazo de fique), que son considerados por muchos fiqueros como un residuo sin valor.

Por otra parte, hoy en día la búsqueda de materias primas de bajo coste y fácil adquisición que puedan ser utilizados como sustratos fermentables, constituye uno de los retos más interesantes de la biotecnología, es por ello que los residuos lignocelulósicos son considerados cada vez más como recursos potenciales, pues además del interés económico que tienen por la producción de productos de mayor valor agregado (enzimas, proteínas, pigmentos, etc), la utilización de estos residuos tienen incidencia en la preservación de la calidad del medio ambiente, al considerar el desarrollo de tecnologías orientadas a la transformación sustentable de los recursos naturales (Barragán, Téllez & Laguna, 2008). El uso de estos residuos en los bioprocesos puede proporcionar sustratos alternativos y a su vez ayudar a resolver los problemas ambientales, que de otro modo son causados por su eliminación (Reddy et al., 2003).

Igualmente, la biomasa lignocelulósica no es sólo un recurso renovable, sino también la fuente más abundante de componentes orgánicos de gran abundancia en la tierra. Hasta la fecha, se han realizado varias investigaciones sobre la utilización eficaz de los materiales lignocelulósicos (Taniguchi et al., 2005), según el cual los residuos agroindustriales, son una

gran opción económicamente factible para la producción de enzimas celulolíticas (Arteaga, Garza, Villarreal, Gómez & Cantú, 2014).

Según estudios previos, los hongos de pudrición blanca como *P. ostreatus* son capaces de crecer sobre sustratos muy económicos como los residuos lignocelulósicos (Manjarrés, Castro & Rodríguez, 2010), y producir enzimas lignolíticas y celulolíticas que tienen numerosas aplicaciones (Reddy, et al., 2003). Además, *P. ostreatus* tiene ventajas adaptativas que son: la rápida colonización de los sustratos y una eficiente remoción de los productos de hidrólisis, estas características los distinguen de los demás organismos como los principales descomponedores de materiales celulósicos (Paredes, 2010). También, los hongos de la podredumbre blanca crecen en la naturaleza en condiciones de estado sólido, lo cual puede ser ventajoso para el desarrollo de bioprocesos (Reddy et al., 2003), ya que uno de los sistemas más baratos de producción de enzimas es la fermentación en estado sólido, debido a que se requiere menos capital, el medio de fermentación es simple, no requiere de un riguroso control de parámetros de fermentación y produce menos aguas residuales (Bansal, Tewari, R. Soni, & S. Soni, 2012). Además, la fermentación en estado sólido da lugar a una preparación enzimática que es más concentrada y por tanto más adecuada para aplicaciones de conversión de la biomasa (Dhillon et al., 2011).

La importancia de la producción de celulasas utilizando hongos con capacidad de degradar celulosa se basa en que esta constituye una de las moléculas orgánicas renovables más importantes del planeta, pues al usar residuos lignocelulósicos que son una materia prima accesible, son sustratos aptos para un proceso de fermentación en estado sólido y además se puede obtener la micro flora nativa que presente actividad celulósica. Igualmente, el uso de hongos filamentosos para la producción industrial de importantes metabolitos ha aumentado rápidamente en los últimos años, por el potencial de secreción de enzimas hidrolíticas, que se

caracterizan por la formación de hifas que les permiten ser más eficientes y competitivos al colonizar matrices sólidas (Mora, 2015).

Por lo tanto, el desarrollo de esta propuesta de trabajo de grado contribuyó a obtener un conocimiento aplicado de los hongos de pudrición blanca sobre la evaluación de la actividad enzimática de celulasas presentes. Con los resultados obtenidos, por un lado, permitió comprobar las ventajas del sistema de fermentación sólida que se ha venido manejando por el grupo de investigación BIOTA en cultivos de este hongo, y por otra parte ampliar el conocimiento de la actividad enzimática de *P. ostreatus* durante su desarrollo, y a su vez sus posibles aplicaciones biotecnológicas, como el estudio de degradación de residuos de papel para su evaluación de su potencial en la producción de bioetanol. Asimismo, el uso de residuos de papel que además de la alta disponibilidad, este tiene un contenido de carbohidratos de hasta el 80% en los papeles usados y el cartón, el cual lo convierte en un potencial considerable como materia prima para la conversión a bioetanol, igualmente la utilización de residuos de papel para la producción de bioetanol puede ofrecer una vía alternativa útil y valiosa para el manejo de estos además de complemento al reciclaje (Wang et al., 2012).

2. ESTADO DEL ARTE

2.1. Residuos lignocelulósicos

Los residuos lignocelulósicos son el conjunto de residuos y subproductos que provienen de diversos sectores y que son de naturaleza orgánica, tal como los residuos de la agricultura, la industria agroalimentaria, la silvicultura y residuos sólidos municipales incluidos la pulpa y el papel. Su estructura consiste en un esqueleto de celulosa recubierto por hemicelulosa y lignina en una estructura tridimensional amorfa, con una composición relativa diferente dependiendo del tipo de residuo. Comúnmente, los componentes de celulosa y hemicelulosa representan aproximadamente el 70-80% del peso seco total, mientras que la lignina representa el polímero más pequeño de lignocelulosa, con un porcentaje entre el 10-25% (Liguori & Faraco, 2016). Estos residuos representan la mayor fuente renovable de carbono en el suelo, pero esta materia orgánica ocasiona inconvenientes en el ambiente ya que ocupa mucho espacio y su degradación natural es muy lenta y su almacenamiento es casi imposible por los volúmenes en que estos se generan (Redin, 2010).

La expansión de las actividades agroindustriales dio lugar a la gran cantidad de acumulación de residuos lignocelulósicos derivados de la agricultura, aserraderos, residuos sólidos urbanos y residuos industriales en todo el mundo. La biomasa lignocelulósica es por lo general una fuente de bajo costo y abundante, el cual tiene el potencial para la producción de energía que simplemente puede ser quemada para generar calor y electricidad. Pero también se ha visto como una fuente prometedora para la producción de biocombustibles líquidos (Bisinella, 2012), así como también se han desarrollado varios procesos biotecnológicos que utilizan los residuos para la producción de enzimas, ácidos orgánicos y hongos comestibles, generando productos con valor económico y contribuyendo de esta manera a cuidar al medio ambiente (Redin, 2010).

En la actualidad los procesos biotecnológicos han ganado un lugar importante en el desarrollo tecnológico mundial, debido a que presentan buenas características económicas y operativas que proporcionan ventajas sobre los procesos químicos convencionales, de esta forma los residuos lignocelulósicos agroindustriales han dado lugar a la plataforma de biorefinería de segunda generación, en la que se generan productos biológicos (alimentos, piensos, productos químicos) y bioenergía (biocombustibles, energía y calor) mediante procesos integrados y sostenibles (Liguori & Faraco, 2016). Esto ha abierto el camino al desarrollo de las llamadas fuentes de energías renovables, entre las que se encuentran los biocombustibles (Lopretti, López, Rey, Ottati & Damboriarena, 2007), que han surgido de la necesidad de proteger el medio ambiente, y de este modo preservar los recursos tanto renovables como no renovables y maximizar el potencial de uso de productos agrícolas, y en especial de los subproductos (Sánchez, Gutiérrez, Muñoz & Rivera, 2010).

El material lignocelulósico es atractivo por su bajo costo y alta disponibilidad en diversos climas y localidades, sin embargo, el principal impedimento para su utilización es la falta de una tecnología de bajo costo para degradar la fracción recalcitrante de la biomasa. Aunque existen métodos fisicoquímicos que permiten utilizar la biomasa en la producción de biocombustibles, una alternativa prometedora son los métodos biológicos que utilizan organismos celulolíticos para obtener azúcares fermentables (Cuervo, Folch, & Quiroz, 2009).

Pero para la conversión de la biomasa lignocelulósica y la obtención de varios bioproductos, un cuello de botella significativo es la hidrólisis enzimática de los residuos lignocelulósicos a azúcares solubles. Estos azúcares se metabolizan a través de diversas vías naturales o dirigidas hacia productos de interés. El éxito de los procesos de biorrefinería proyectados depende en gran

medida de la economía de la producción de las enzimas hidrolíticas (Celulasas, xilanasas, entre otras) (Biswas, Persad & Virendra, 2014).

2.1.1. Composición de los residuos lignocelulósicos

Los residuos lignocelulósicos se componen principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura. 1) y cantidades más pequeñas de pectina, proteína, extractos y cenizas. La celulosa, hemicelulosas y la lignina están presentes en cantidades variables en las diferentes partes del residuo, y están íntimamente asociadas para formar el marco estructural de la pared celular del material lignocelulósico (Jørgensen, Kristensen & Felby, 2007). A continuación, se describirá la estructura de los constituyentes principales de los residuos lignocelulósicos.

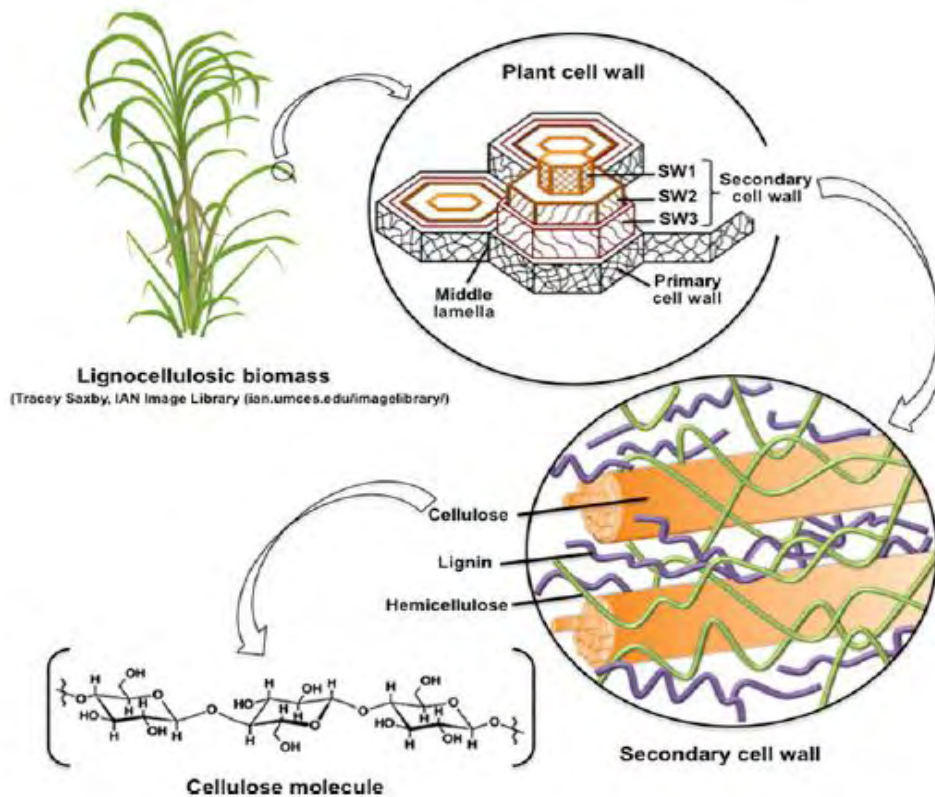


Figura 1. Estructura de la pared celular de la planta. Recuperado de “Cellulose from Lignocellulosic Waste” por M. Michelin, H. A. Ruiz, Silva, D. S. Ruzene, J. A. Teixeira & M. L. Polizeli, 2014. Springer International Publishing Switzerland. p. 4.

2.1.1.1. Celulosa

La celulosa, es el constituyente más abundante de la pared celular del material lignocelulósico, es un homo-polisacárido compuesto enteramente de D-glucosa unida por enlaces β -1,4-glucosídicos (Jørgensen et al., 2007), lo que hace que su estructura sea plana, y permite el empaquetamiento de varios filamentos de celulosa en fibrillas cristalinas (Bhowmick, Sarmah & Sen, 2017). Además, la estructura de la celulosa junto con los enlaces de hidrógeno intermoleculares proporciona a la celulosa alta resistencia a la tracción, la hace insoluble en la mayoría de los solventes y es en parte responsable de la resistencia a la degradación microbiana (Jørgensen et al., 2007).

En cuanto a la degradación de la celulosa, los hongos basidiomicetos y las bacterias aerobias degradan el material celulósico a través de la producción de celulasas extracelulares. Entre este grupo se encuentran las bacterias del género *Cellulomonas* y *Streptomyces*, así como los hongos basidiomicetos responsables de la pudrición de la madera que son los organismos más estudiados en esta área porque producen celulasas y actualmente dominan las aplicaciones industriales (Cuervo et al., 2009).

2.1.1.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polisacárido que se encuentra en abundancia en las paredes celulares de las plantas. Es un heteropolímero ramificado complejo de azúcares que forman una red altamente ramificada. Consiste en alrededor de 100-200 unidades de azúcar típicamente compuestas de diferentes azúcares como D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-xilosa, L-arabinosa, y/o ácidos grasos como ácido D-glucurónico ácido 4-O-metil-D-glucurónico (Michelin, Ruiz, Silva, Ruzene, Teixeira & Polizeli, 2014). Las interacciones de Vander Waal son las fuerzas principales entre las láminas planas de celulosa, mientras que las hemicelulosas se unen de forma no

covalente a la superficie de las fibrillas de celulosa que actúan como un material de matriz amorfa que se mantiene unida (Bhowmick et al., 2017).

2.1.1.3. Lignina

Es un complejo biopolímero aromático reticulado hidrofóbico, esta se produce cuando cesa el crecimiento de la planta, es insoluble en agua y proporciona el refuerzo estructural y la resistencia al tejido vegetal (Bhowmick et al., 2017).

La lignina en la pared celular no solo incrusta las microfibrillas de celulosa en forma de vaina, sino que también está unida física y químicamente a las hemicelulosas. Físicamente, la lignina forma una barrera contra la penetración de celulasas y hemicelulasas (Michelin et al., 2014).

Su proporción varía entre diferentes plantas, tejidos de madera y capas de pared celular. Las plantas más viejas y más leñosas contienen niveles más altos de lignina depositados en las paredes celulares para proporcionar rigidez y resistencia, confiriendo impermeabilidad a las paredes celulares y formando una barrera fisicoquímica efectiva contra el ataque microbiano y el estrés oxidativo (Jørgensen et al., 2007).

Las causas por las cuales la lignina es tan resistente al ataque de las enzimas microbianas, se debe a que los anillos aromáticos son generalmente más difíciles de degradar, la variedad de enlaces entre las unidades constitutivas de la lignina y la naturaleza hidrofóbica requiere un sistema de rompimiento no específico, que para la mayor parte debe ser tanto no hidrolítico como extracelular (Quevedo, 2011).

La degradación efectiva de la lignina natural es realizada exclusivamente por los hongos de podredumbre blanca (HPB). Muchos HPB producen fenol oxidasas extracelulares, pero solo el 40% produce la combinación de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa, mientras que la combinación manganeso peroxidasa y lacasa es mucho más común (Schmidt, 2006).

La distribución de celulosa, hemicelulosa y lignina varía considerablemente entre los diferentes residuos lignocelulósicos esto se puede observar en la Tabla 1, la cual muestra la composición química de diferentes residuos lignocelulósicos.

Tabla 1

Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos

Material lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera suave	45-50	25-35	25-35
Cáscara de nuez	25-30	25-30	30-40
Olote de maíz	45	35	15
Desechos de pastos	25-40	35-40	18-30
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	80-85	0
Algodón	80-95	0	0
Papel periódico	40-55	25-40	18-30
Desecho de papel de pulpas químicas	60-70	10-20	5-10
Desechos sólidos de aguas residuales	8-15	no disponible	24-29

Nota: Adaptado de “Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review” por Ye Sun, Jiayang Cheng, 2002. Bioresource technology, p. 2.

2.2. Bagazo de Fique

El fique es una planta fibrosa que crece en varias regiones de América tropical, perteneciente a la familia *Agavaceae*, siendo los géneros *Agave* y *Furcraea* los más representativos de esta familia. En Colombia, se denomina fique a las plantas pertenecientes al género *Furcraea* que comprende, aproximadamente, unas 20 especies que crecen de manera espontánea por todo el país y se cultiva en las zonas andinas tropicales. El fique ha sido empleado desde hace varios siglos como fuente de fibra, conocida como “cabuya” para la fabricación de empaques, lo que

ha mantenido un cultivo permanente en Colombia. Actualmente, la cabuya se emplea como empaque de productos agrícolas como papa (patata) y café, también para la fabricación de artesanías (Lozano, 2011).

No obstante, en la obtención de la fibra del fique, un volumen considerable es desechado como residuos de aproximadamente el 90 %, representado en jugo, estopa y bagazo, a pesar de que estos se puedan utilizar de distintas formas como sustrato para la producción de hongos comestibles, lombricultura, alimentación de rumiantes, y como abono orgánico para los residuos sólidos (Criollo H, Criollo J & Parra, 2008). Otra opción para disminuir la contaminación ambiental ocasionada por los subproductos de la industria del fique es realizar tratamientos físicos, químicos y/o biológico con el fin de generar compuestos de interés industrial (Castro et al., 2014).

Las características fisicoquímicas del bagazo de fique indican que este residuo posee una fracción soluble (carbohidratos no estructurados y ácidos grasos volátiles “AGV”) y una fracción particulada (celulosa, hemicelulosa, proteínas y lípidos) que permite considerarlo como un residuo de tipo lignocelulósico (Castro et al., 2014), ideal para emplearlo como sustratos para el cultivo de hongos capaces de producir enzimas extracelulares, como *P. ostreatus*

2.3. Degradación del material lignocelulósico

Existen tres pasos principales en el proceso de conversión de la materia lignocelulósica:

- 1) Pretratamiento: mejora el acceso de las enzimas a la celulosa.
- 2) Sacarificación enzimática: uso de celulasas y ocasionalmente hemicelulasas.
- 3) Fermentación de los azúcares liberados.

La finalidad del pre-tratamiento es remover la lignina y la hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa e incrementar la porosidad del material, mejorando la liberación de

azúcares evitando la degradación o pérdida de carbohidratos así como la formación de compuestos inhibitorios para la posterior fermentación (Sun & Cheng, 2002).

2.3.1. Pretratamientos

El pretratamiento de cualquier tipo de biomasa lignocelulósica es fundamental antes de la hidrólisis enzimática; el objetivo es remover la lignina y disminuir la cristalinidad de la celulosa con lo cual mejora la hidrólisis de la celulosa por parte de las celulasas (Taherzadeh & Karimi, 2008).

El pretratamiento permite que los rendimientos en la hidrólisis de celulosa aumenten del 20 al 90%. Se han propuesto y desarrollado diferentes métodos físicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos, pero estos pretratamientos no se pueden aplicar de forma genérica por la diversidad de las diferentes materias primas (Sun & Cheng, 2002).

Varios pretratamientos clasificados como físicos, químicos o fisicoquímicos se han usado para fraccionar, solubilizar, hidrolizar y separar los componentes de la celulosa, hemicelulosa y lignina, e incluyen la utilización de ácidos concentrados o diluidos, SO₂, álcalis, peróxido de hidrógeno, oxidación húmeda, explosión con vapor, explosión de fibras por amoníaco (Ammonia Fiber expansion “AFEX”, por sus siglas en inglés), explosión con CO₂, agua líquida caliente y tratamientos con solventes orgánicos. En cada opción se reduce el tamaño y se abre la estructura física de la biomasa; sin embargo, estos tratamientos consumen gran cantidad de energía y frecuentemente generan compuestos tóxicos, por lo que son poco viables económicamente y de alto impacto ambiental (Quevedo, 2011).

Dentro de este grupo de pretratamientos, la explosión con CO₂ en condiciones supercríticas (SC-CO₂ por las siglas en inglés) representa una alternativa interesante porque puede operar a temperaturas más bajas que las usadas en los tratamientos térmicos, así se elimina el problema de

la formación de inhibidores con la degradación de la hemicelulosa y la lignina. El comportamiento del SC-CO₂ en la estructura de la biomasa no es bien conocido, sin embargo, si se sabe que este trabaja más fácilmente en la biomasa rígida y húmeda que en materiales lignocelulósicos más flexibles. También se ha reportado que disminuye la cristalinidad de la celulosa mejorando la hidrólisis enzimática (Ferreira, Fausta, & Vieira, 2011)

Otro tipo de pretratamiento es el biológico, que busca mejorar la accesibilidad a la celulosa, este ha sido de gran interés por parte de varios investigadores. El potencial de los pretratamientos biológicos se basa en la habilidad de ciertos microorganismos para descomponer la pared celular de la planta por un rompimiento parcial de la lignina/complejo carbohidratos. Entre los microorganismos más prometedores para el pretratamiento biológico se encuentran los basidiomicetos, y entre ellos los hongos de podredumbre blanca tienen gran importancia (Gupta, Mehta, Khasa, & Kuhad, 2011).

Aunque se han desarrollado muchos métodos para el tratamiento de la biomasa, aún se requieren pretratamientos más eficientes y económicamente competitivos. Una combinación de pretratamientos físicos, químicos y/o biológicos han resultado ser más eficientes para mejorar la digestión enzimática de la biomasa lignocelulósica (Quevedo, 2011).

En la Tabla 2 se presenta un resumen de los diferentes pretratamientos con sus ventajas y desventajas y los materiales que han sido utilizados.

Tabla 2

Métodos de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol.

METODO	PROCEDIMIENTO/AGENTE	OBSERVACIONES	EJEMPLOS DE MATERIALES PRETRATADOS
Pretratamientos físicos			
pulverizado mecánico	Reducción a astillas, trituración, molienda	molinos: vibratorio de bolas, de cuchillo o martillo	residuos de madera y forestales (paja, madera dura), desechos de maíz, bagazo de caña
pirólisis	T>300°C	Formación de productos volátiles y carbón. Residuos de la pirólisis pueden someterse a hidrólisis ácida suave (1N H ₂ SO ₄ , T= 97°C, 2.5h) para producir 80-85% AR (>50% de glucosa)	madera, algodón de desecho
Pre-tratamientos fisico-quimicos			
Explosión con co ₂	Dosis de 4kg CO ₂ /kg de fibra p=5,62Mpa	Conversión a glucosa durante la hidrólisis de celulosa>75%. No forma compuestos inhibidores	Alfalfa, mezcla de papel reciclado, bagazo de caña
Pretratamientos físico-quimicos			
Explosión a vapor	Vapor saturado a 160-260°C, p=0,69-4,85 Mpa por varios segundos o minutos, luego descompresión hasta presión atmosférica.	Hidrólisis del 80-100% de la hemicelulosa, destrucción de parte de la xilosa obtenida, formación de inhibidores, se requiere posterior lavado con agua. Al combinarse con H ₂ SO ₄ , SO ₂ , o CO ₂ mejora la eficiencia de la posterior hidrólisis enzimática, disminuyendo inhibidores.	Bagazo, madera blanda, paja de arroz, madera de aspen, madera de eucalipto.
Explosión de fibra con amoníaco (AFEX)	Dosis 1-2kg de amoníaco/ kg de biomasa seca, 90°C, 30min.	Se requiere recuperación de amoníaco, no produce inhibidores. Conversión durante la hidrólisis de celulosa >90% (bagazo y hierba de Bermuda). Para biomasa con alto contenido de lignina no es muy eficiente (conversión de celulosa <50%).	Materiales herbáceos (paja de trigo y cebada, cascarilla de arroz, desechos de maíz, residuos sólidos urbanos, papel periódico, alfalfa, bagazo.

(Continúa)

Tabla 2. (Continuación)

METODO	PROCEDIMIENTO/ AGENTE	OBSERVACIONES	EJEMPLOS DE MATERIALES PRETRATADOS
Pretratamientos químicos			
Hidrólisis con ácido diluido	H ₂ SO ₄ , HCl, HNO ₃ al 1-5%. Procesos de flujo continuo para baja carga de sólidos (5-10% peso sustrato/peso mezcla) a T=160-200°C;	Hidrólisis del 80-100% de la hemicelulosa, altas conversiones de xilano a xilosa. La alta temperatura es favorable para la hidrólisis de celulosa. Se requiere neutralizar el pH para la posterior hidrólisis enzimática.	Desechos de maíz, bagazo de caña, madera de álamo, paja de trigo, astillas de álamo
Hidrólisis con ácido concentrado	H ₂ SO ₄ al 10-30%, 170-190°C, relación 1:1,6 sólido-líquido. Ácido peracético 21-60%, sistema tipo silo	Se requiere la recuperación del ácido. Tiempos de residencia mayores que en la hidrólisis con ácido diluido	Bagazo de caña, aserrín de madera dura
Hidrólisis alcalina	NaOH diluido, 24 h, 60°C	Remoción de lignina 24-55% para madera dura con contenido inicial de lignina del 20%, difícil remoción para maderas blandas con contenidos de lignina >26%. Hidrólisis de >50% de la hemicelulosa.	Madera dura, pajas con bajo contenido de lignina (10-18%), desechos de maíz, bagazo de caña, hojas de caña de azúcar.
Deslignificación oxidativa	Peroxidasa y H ₂ O ₂ al 2%, 20°C, 8h	Solubilización del 50% de la lignina y de casi la totalidad de la hemicelulosa. Conversión durante la hidrólisis de celulosa: 95% (aserrín)	Bagazo de caña
Pretratamiento biológico			
Pretratamiento con hongos	Hongos de la pudrición blanca, blanda y parda. Producción de celulosas por fermentación en sustrato sólido.	Los hongos producen celulosas, hemicelulasas y enzimas degradadoras de lignina: ligninasas, lignin-peroxidasas, polifenoloxidasas, lacasas y enzimas reductoras de quinonas.	Paja de trigo, desechos de maíz.

Nota: Adaptado de "Producción biotecnológica de alcohol carburante i: obtención a partir de diferentes materias primas", por Óscar Julián Sánchez y Carlos Ariel Cardona. Interciencia, p. 674-675.

2.4. *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus ostreatus es un hongo saprofito, del grupo de la podredumbre blanca que crece de forma natural en múltiples materiales lignocelulósicos. En ambiente natural crece sobre árboles, tocones, arbustos y otras plantas leñosas, alimentándose de su madera y destruyéndola. Puede descomponer eficientemente materiales lignocelulósicos sin químicos o pretratamientos adicionales, debido a que posee un sistema enzimático complejo que incluye enzimas ligninolíticas y celulolíticas (Rangel, 2012), por ello tiene, la habilidad de descomponer troncos y crecer en un amplio número de residuos, más que ninguna otra especie de cualquier otro grupo. Crecen bien en la mayoría de maderas duras sobre los productos secundarios de industrias madereras, en la paja de todos los cereales, la caña de azúcar y bagazos, residuos de café, hojas de plátano y cáscaras de semillas oleaginosas. Estos hongos crecen como parásitos o como saprófitos en trozos de plantas vivas o muertas que generalmente son pobres en nutrimentos y vitaminas. En ambos casos el micelio crece y forma cuerpos fructíferos utilizando los nutrimentos a partir de los complejos lignocelulósicos (Rodríguez & Jaramillo, 2006).

2.4.1. Clasificación y morfología

P. ostreatus se encuentra clasificado taxonómicamente de la siguiente manera:

- Reino: Fungí
- Subreino: Fungí Superior
- División: Basidiomycota
- Subdivisión: *Basidiomycotina*
- Clase: *Himenomycetes*
- Orden: *Agaricales*
- Familia: *Tricholomataceae*

- Género: *Pleurotus*
- Especie: *ostreatus*

La morfología del *Pleurotus ostreatus* es la típica de un hongo agarical. Suele encontrarse a menudo recubierto de una capa miceliar en la base, su carne es delgada, blanquecina y elástica, aunque tenaz al envejecer (Redin, 2010).

Al principio de su desarrollo, el píleo tiene forma de lengua, y cuando madura adquiere forma de concha. Su forma es excéntrica cuando crece en superficies verticales, y central cuando lo hace en camas. La superficie es seca, lisa y brillante, un poco viscosa en tiempo húmedo.

Su coloración varía en función de la luz, generalmente adquiere un gris muy pálido, aunque también puede ser gris acero o gris azul. El tamaño varía de los 5 a 20 cm de diámetro, raras veces puede presentar tamaños mayores en función de las condiciones de fructificación. Su margen es suave, ondulado y ocasionalmente enrollado (Redin, 2010).

El micelio de este hongo puede crecer en una temperatura entre 0 y 35 °C, con temperatura óptima de 30 °C y en un rango de pH entre 5.5 y 6.5 y se ha observado que después de cosechar los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*, en los materiales usados como sustratos las cantidades finales de hemicelulosa, celulosa y lignina se han reducido en un 80% sugiriendo que todos los materiales que contienen estos compuestos, pobres en nitrógeno pueden ser usados como sustratos para *Pleurotus spp.* La relación C/N óptima del sustrato depende de la fase en la que se encuentra el hongo, altas relaciones C/N favorecen el crecimiento micelial y bajas relaciones favorecen el desarrollo de cuerpos fructíferos. El contenido de humedad en el sustrato para el desarrollo de los hongos debe estar entre el 50 y el 80%, la fructificación suele darse en condiciones normales cuando se tiene un 20% de oxígeno y una concentración de CO₂ no mayor de 800 ppm en el ambiente que circunda al hongo y la humedad relativa óptima para la

fructificación de *P. ostreatus* es de 85 a 90%. Si bien la fase de incubación del hongo debe ser en la oscuridad, se ha demostrado que la eficiencia biológica (relación entre peso fresco de los hongos y peso seco del sustrato utilizado) y el rendimiento de *P. ostreatus* cultivado sobre residuos de cacao disminuyen entre un 68% y 63% respectivamente, cuando el hongo en su fase de fructificación está expuesto a la luz en tiempos menores de 12 horas (Garzón & Cuervo, 2008).

2.4.2. Cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*

2.4.2.1. Preparación de la semilla

La semilla es la expansión de masa de micelio que busca potenciar metabólicamente al hongo para que se encuentre en condiciones ideales y así poder crecer eficientemente en los sustratos de producción. Se realiza en dos etapas:

Inóculo primario, es la propagación del micelio en semillas a partir de una cepa crecida en medio de cultivo, se inocula de 25-28°C en oscuridad hasta que el micelio cubra totalmente la semilla; 15 o 29 días después, el inóculo primario está listo.

Inóculo secundario, es la propagación del micelio en semillas a partir del inóculo primario, es el que se usa para la siembra y fructificación de las setas. Se puede emplear en semillas de sorgo, trigo, cebada, entre otros (Córdoba & Cultid, 2015).

2.4.2.2. Preparaciones del sustrato

Lavado: se debe realizar suficientes lavados con agua para poder eliminar azúcares que no son de interés.

Picado: un tamaño de partícula aproximadamente de 2 a 5cm, son los valores más citados y los que sugieren la mejor estabilidad y proporciones puesto que tiende a aumentar

considerablemente la actividad enzimática, posiblemente debido a que se aumenta el área expuesta del material lignocelulósico y esto favorece el ataque enzimático.

Humectación: la humedad debe ser del 70-80%

Pasteurización: se debe aplicar un tratamiento previo, que consiste en aplicar calor para disminuir la flora microbiana nociva, que está presente en ellos y de esta manera evitar que los microorganismos compitan por espacio y nutrientes con el micelio de *P. ostreatus*

siembra: La siembra es la fase más importante ya que en ésta se mezcla el micelio (o semilla) con los sustratos los cuales sirven como medio de desarrollo, el sustrato pasteurizado debe tener una temperatura de 20-25°C y una humedad del 70%, porque el hongo necesita para su crecimiento de ciertos espacios porosos, esto le permite que el intercambio de gases sea el óptimo para su crecimiento, tanto dióxido de carbono (CO₂) como de oxígeno (O₂), evitando así la aparición de organismos que puedan vivir sin oxígeno O₂ y que ocasionen pudrición del sustrato (Córdoba & Cultid, 2015; Hernández & López, 2007).

2.4.2.3. Etapas del cultivo

Inoculación: consiste en adicionar la semilla del hongo al sustrato ya preparado y estéril, se debe realizar en un lugar cerrado sobre un mesón previamente desinfectado para evitar que se presente contaminación en la fase del establecimiento micelial (Córdoba & Cultid, 2015).

Incubación: es necesario que la temperatura en el sitio de incubación permanezca alrededor de 20 a 20°C, con una humedad relativa del 70 a 80% y poca iluminación.

Fructificación: comienza una vez el sustrato es invadido por el micelio del hongo y se logran observar primordios o pines los cuales formarán el cuerpo fructífero. Es necesario cambiar las condiciones del cultivo aumentando la humedad relativa y luminosidad.

Cosecha: se realiza la recolección de los cuerpos fructíferos, evitando contaminaciones posteriores en los puntos del sustrato donde creció el hongo (Hernández & López, 2007)

2.4.3. Sustratos utilizados para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*

Se han utilizado una gran cantidad de sustratos para el cultivo de *P. ostreatus*. Los materiales más comúnmente utilizados como fuente de carbono incluyen paja de trigo, de avena, de centeno, de sorgo y de algodón, virutas de madera y cortezas, subproductos de algodón, heno, tallos de plantas de maíz, plantas y desperdicios de café, tusa de mazorca, hojas de té, cáscaras de maní, harina de soya, cáscaras de semillas de girasol, desperdicios de alcaucil, desperdicios de yuca, residuos de la industria papelera, hojas de plátano, cactus, fibra de coco, hojas de limón, tallos de menta, paja de arroz, bagazo de caña, entre otros. También se pueden realizar cultivos sobre bloques o troncos sintéticos. Las ventajas principales de utilizar estos sustratos en lugar de la producción en troncos naturales, es que los tiempos se acortan y la eficiencia aumenta (Hernández & López, 2007).

2.4.4. Degradación de residuos lignocelulósicos por *Pleurotus ostreatus*

La composición química de *P. ostreatus* es muy variable y depende del estado de desarrollo y la cepa utilizada; la variabilidad es ocasionada por diferencias en el contenido de humedad, temperatura y la presencia de nutrientes. Esta especie constituye un alimento altamente proteico, posee un elevado contenido de vitaminas (tiamina (B1), Riboflavina (B2), Piridoxina (B6) y Cobalamina (B12)); y actúa como una fuente importante de calcio y fósforo. Además de su valor nutritivo, *P. ostreatus* posee enzimas específicas capaces de degradar lignina, fenoles y polifenoles hasta un 60% del contenido original, por lo que es una de las especies más utilizada en la investigación de residuos aptos para su cultivo (Varnero, Quiroz, & Álvarez, 2010).

Se ha encontrado que *P. ostreatus* es capaz de utilizar residuos agrícolas y agroindustriales, como sustrato para convertirlos en su alimento, mediante un sistema enzimático compuesto de celulasas y ligninasas, por lo que, durante su crecimiento, puede degradar selectivamente la lignina, sacarificar e hidrolizar la celulosa (Eras, 2012). El complejo enzimático de *P. ostreatus* incluyen enzimas oxidativas como lacasa y manganeso peroxidasa (MnP), que están involucradas en la degradación de lignina, y las enzimas hidrolíticas, xilanasas y celulasas, que están involucradas en hemicelulosa y degradación de celulosa (Luz, Nunes, Paes, Torres, Silva & Kasuya, 2012), sin embargo, existen pocos estudios sobre el control de las actividades enzimáticas lignocelulolíticas de *P. ostreatus* durante su proceso de cultivo (Bánfi et al., 2015).

2.5. Antecedentes del tema

2.5.1. Generalidades de las Enzimas

Todos los procesos de la vida, ya sea en plantas, animales o microorganismos, dependen de una red compleja de reacciones químicas catalizadas por enzimas, para el crecimiento celular y el mantenimiento de estas. Las enzimas son proteínas que refuerzan o acelera las reacciones químicas, estas son capaces de realizar muchas composiciones químicas diferentes, se pueden producir a gran escala, y típicamente operan a temperatura ambiente y cerca de pH neutro, lo cual por estas características ha capturado la atención de científicos e ingenieros, lo que ha permitido un gran crecimiento industrial de estas. Todas las enzimas comerciales son proteínas, que se ensamblan en las células vivas de una combinación de los 20 aminoácidos de origen natural, de acuerdo a las secuencias específicas definidas por los genes en el ADN de la célula. Adicionalmente sus características estructurales a menudo están presentes, tales como hidratos de carbono, iones metálicos, y coenzimas que influyen en las propiedades físicas y catalíticas de

las enzimas. Más de 3.000 enzimas diferentes se han aislado y caracterizado, aunque menos de 100 nunca se han utilizado en aplicaciones industriales (Kent, 2012).

En cuanto a la nomenclatura enzimática se define de acuerdo con el número de la Comisión de Enzimas (número EC), desarrollado por primera vez en 1955 en el Congreso Internacional de Bioquímica en Bruselas, las cuales se clasifican por el tipo de reacción química catalizada; oficialmente, se han clasificado en seis grupos: EC 1 oxidorreductasas, que catalizan reacciones de óxido reducción, que generalmente implican la transferencia de electrones. EC 2 transferasas, transfieren un grupo funcional (por ejemplo, un grupo metilo o fosfato) y estos generalmente implican la transferencia de un radical. EC 3 hidrolasas, que catalizan la hidrólisis de diversos enlaces, esta reacción hidrolasa generalmente implica la adición o eliminación de agua. EC 4 liasas, dividen en diversos enlaces por medios distintos de la hidrólisis y oxidación, esta reacción implica la escisión o la formación de un enlace doble. EC 5 isomerasas, catalizan los cambios de isomerización dentro de una sola molécula e implican el cambio de la geometría o estructura de una molécula y las EC 6 ligasas, une dos moléculas con enlaces covalentes (Whitehurst & Oort, 2010).

2.5.2. Celulasas

Las celulasas son glicosil hidrolasas, producidas por plantas, hongos, bacterias e incluso por algunos protozoos, moluscos y nematodos. En cuanto a géneros y especies de hongos tales como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora crassa*, incluyendo además hongos comestibles como: *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, *Pleurotus sp*, son productores de celulasas (Paredes, Álvarez, & Ordoñez, 2010).

Esta enzima posee un rol muy importante en la biosfera, ya que es responsable de la degradación de la celulosa, que comprende la fuente de carbono más abundante en la tierra

(Martínez, Balcázar, Dantán & Folch, 2008). El sistema de celulasa incluye tres tipos de enzimas: la endo- β -1,4-glucanasa (C_x) (1,4- β -D-glucan glucanohidrolasa E.C.3.2.1.4), la exo- β -1,4- glucanasa (C_1) (1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa E.C.3.2.1.91) y la β -1,4-glucosidasa (celobiasa) (C_b) (β -D-glucósido glucohidrolasa E.C.3.2.1.21) (Ovando & Waliszewsk, 2005). En cuanto al proceso de degradación que llevan a cabo las celulasas sobre la celulosa la hipótesis más aceptada (Internacional Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1992) sugiere que la hidrólisis comienza con endoglucanasas que hidrolizan los enlaces 1,4- β -glucosídicos en la sección amorfa de la celulosa, esto reduce significativamente el grado de polimerización del sustrato y crea nuevos extremos de cadenas que facilitan el acceso para las celobiohidrolasas que las separan en unidades de celobiosa. Seguido a lo anterior, la β -glucosidasa hidroliza la celobiosa en unidades de glucosa (Marín, 2007).

La biotecnología de celulasas comenzó en principios de 1980, por primera vez en la alimentación animal, después se empezó a utilizar en aplicaciones alimentarias, para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos, extracción de aceites comestibles, etc. Posteriormente, estas enzimas hoy en día han llegado a ocupar un lugar importante en otras industrias tales como la industria textil, de lavandería, así como en las industrias de pulpa y papel. Por lo tanto, desde hace dos décadas, el uso de celulasas, ha aumentado considerablemente, especialmente en textiles, alimentos, fábrica de cerveza y vino, así como en las industrias de pulpa y papel (Wang et al., 2005).

En la actualidad, las fuentes microbianas comunes de celulasas para su producción a escala industrial son cultivadas por mesófilos tales como *Trichoderma reesei* (también conocido como *Hypocrea jecorina*) y *Aspergillus niger*, en intervalos de temperatura de 30-35°C. *Trichoderma reesei* se caracteriza por la efectividad que tiene en la degradación de la celulosa nativa y

crystalina con el complejo celulolítico que produce y secreta, el cual presenta las tres actividades necesarias para la hidrólisis de la celulosa (endo-B-1,4-glucanasa, exo-B-1,4-glucanasa y B-1,4-glucosidasa) (Ovando & Waliszewski, 2005), también, las celulasas de *T. reesei* tienen la ventaja de que estas son resistentes a inhibidores químicos y estables en reactores agitados bajo condiciones de pH 4.8 a 50°C durante 48h. Pero este hongo no tiene la capacidad de degradar lignina y dada la importancia de la degradación de la lignocelulosa, actualmente se está investigando mucho otros hongos que cumplan con las dos funciones como los HPB (Schmidt, 2006). En cuanto los atributos deseables de celulasas para la hidrólisis eficiente de la celulosa y el impacto de estos atributos en la hidrólisis sugieren: Alta actividad específica, pues se busca enzimas con mayor actividad específica (unidades/mg de proteína) en cantidades más bajas para conseguir el mismo grado de hidrólisis. Alta eficiencia catalítica contra la celulosa cristalina, ya que celulasas de alta eficiencia catalítica reducirá el tiempo para hidrolizar la celulosa cristalina. Alta estabilidad térmica, puesto que las enzimas termoestables se pueden utilizar a temperaturas más altas para acelerar las tasas de hidrólisis de la celulosa. La resistencia a la inhibición del producto final, debido a que la mayoría de las celulasas son inhibidas por los productos de la hidrólisis de la celulosa (es decir, glucosa y celobiosa). Estabilidad frente a fuerzas de cizallamiento, dado a que las celulasas resistentes al cizallamiento son útiles a la hora de proporcionar agitación para suspender la celulosa sólida en un reactor de hidrólisis (Biswas et al., 2014).

2.5.3. Aplicación de celulasas

El uso de celulasas a nivel industrial es extensamente estudiado y ofrece gran diversidad de usos en donde industrias tales como la de textiles, papeles, aditivos para comida animal, clarificación de jugos de frutas, entre otras han aplicado este tipo de enzimas a sus procesos. De

manera reciente y expansiva el uso de celulasas para la producción de biocombustibles como el bioetanol ha sido estudiado y ha cobrado gran interés debido a la búsqueda de nuevas fuentes de energía no fósil. Las celulasas al degradar residuos agrícolas pueden producir azúcares fermentables como la glucosa que en procesos posteriores puede ser transformada a etanol (Fuentes & Garzón, 2013).

Las aplicaciones exitosas de materiales celulósicos como fuentes de carbono renovables dependen del desarrollo de tecnologías de proceso económicamente viables para la producción de celulasa. Los investigadores han demostrado que la producción de celulasa fue el paso más costoso durante la producción de etanol a partir de la biomasa lignocelulósica, que representa aproximadamente el 40% del costo total. Se requiere una reducción significativa del costo a fin de mejorar la viabilidad comercial del rendimiento de celulasa (Behera & Ray, 2016).

Aunque muchos esfuerzos de investigación se han dirigido hacia el desarrollo de un proceso de hidrolisis enzimática eficiente de residuos celulósicos para productos útiles, principalmente glucosa y etanol, este objetivo aún no se ha materializado, pero sigue siendo objeto de intensa investigación y desarrollo académico (Martin, 1998).

Las celulasas encuentran una serie de aplicaciones de diversas industrias que aprovechan su acción limitada o extensa sobre los componentes celulósicos y hemicelulósicos de los residuos. Algunas de las aplicaciones actuales y potenciales de celulasas se describen en la Tabla 3. Se puede mencionar que pocas aplicaciones industriales pueden requerir el uso de otras enzimas además de celulasas para obtener la máxima ventaja. Actualmente, esta enzima encuentra el mayor uso en la eliminación de fibras brutas de las paredes celulares para diversos usos finales en diferentes industrias. Las celulasas, en muchos casos, se usan junto con enzimas de separación de células (CSE) que poseen actividad protopectinolítica. Esta enzima elimina la

protopectina presente como una sustancia intercelular en tejidos vegetales y expone las paredes celulares que pueden degradarse por celulasas (Martin, 1998).

Tabla 3
Algunas aplicaciones actuales y potenciales de enzimas celulasas.

INDUSTRIA	APLICACIÓN
Alimentos	<ul style="list-style-type: none"> • Para aumentar la eficiencia de remojo y la absorción de agua homogénea del arroz. • La eliminación de la capa de soja externa para producir soja unicelular. Aislamiento de proteínas de soja y coco. Aislamiento de almidón de maíz y batata. Gelatinización de algas marinas (como Laminaria) para aumentar la digestibilidad. • Extracción de agar-agar de algas marinas (como <i>Rhodophycaea, Gelidium</i>). • Extracción de varios componentes del té verde como el tanino, la cafeína, la saponina y el aroma. • Para digerir la lignocelulosa molturada con bolas para obtener lignina con una superficie muy grande, que puede usarse como aditivo alimentario
Fabricación de cerveza	<ul style="list-style-type: none"> • Purificación de α-glucano soluble en agua de cebada molida.
Vino y jugo de fruta	<ul style="list-style-type: none"> • Descomponer celulosa y otros materiales vegetales insolubles en pulpas de fruta.

(Continua)

INDUSTRIA	APLICACIÓN
Papel y pulpa	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminación de la tinta durante el procesamiento secundario de la fibra Para una mayor eliminación del agua en la máquina de papel.
Como alimento	<ul style="list-style-type: none"> • Como suplemento en alimento para ganado y aves de corral.
Alcohol / solvente	<ul style="list-style-type: none"> • Para hidrolizar la celulosa en glucosa que puede fermentarse en etanol, 2,3-butanodiol, butanol, etc.
Textil	<ul style="list-style-type: none"> • En reducción de pilling, ablandamiento y envejecimiento utilizados en el procesamiento textil. • Para impartir efectos de lavado de piedras en jeans
OTROS USOS	<ul style="list-style-type: none"> • Para eliminar las fibrillas que sobresalen de la ropa
Lavandería	<ul style="list-style-type: none"> • Elucidar la estructura de polisacáridos complejos
Investigación y desarrollo	<ul style="list-style-type: none"> • Para producir protoplastos de plantas superiores
Médico	<ul style="list-style-type: none"> • Como ayudas digestivas en tabletas contra flatulencia
Reducción de la contaminación	<ul style="list-style-type: none"> • Aclaración de lodo para mejorar la eficiencia de la digestión en un tanque séptico

Nota: Adaptada de “Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products” por A: M. Martin, 1998. Springer sciencebusiness media, p. 4

2.5.4. Sistema de Producción de Celulasas

El sistema de producción de las celulasas se ha producido tradicionalmente por fermentación sumergida, debido a la facilidad de manejo y buen control de los factores ambientales tales como la temperatura, aireación, agitación y pH. Sin embargo, las técnicas de fermentación en estado sólido (SSF, por sus siglas en inglés “solid state fermentation”) se han adaptado mejor en cuanto a su rendimiento, lo que reduce el costo de producción de la enzima debido a la capacidad de los hongos filamentosos por crecer bien en sustratos sólidos. Las otras ventajas de SSF incluyen la máxima productividad; baja inversión de capital, bajo requerimiento de energía y menos agua de salida, una mejor recuperación del producto (Bansal et al., 2012). Por lo tanto, los estudios científicos se han dirigido en la economía de la producción de las celulasas, por lo que el sistema de producción en estado sólido está siendo ampliamente estudiado para la producción de las celulasas, debido a la posibilidad de utilizar residuos agrícolas y agroindustriales como sustrato para el crecimiento microbiano y de esta forma reducir el coste de producción.

2.5.4.1. Fermentación sólida y sumergida

La tecnología de fermentación en estado sólido (SSF) se está expandiendo con una importancia creciente para la producción de productos de alto valor agregado, por ejemplo, enzimas, a partir de subproductos agroindustriales. SSF implica el crecimiento de microorganismos en sustratos sólidos húmedos en ausencia de agua que fluye libremente. Recientemente ha ganado considerable atención debido a varias ventajas sobre la fermentación sumergida (SmF) (Behera & Ray, 2016)

La estrategia exitosa para producir enzimas celulolíticas incluye tanto la selección de microorganismos, entendiendo la fisiología básica de los microorganismos celulolíticos como los

principios de ingeniería aplicados a la SSF y las condiciones mejoradas del proceso de fermentación (Thomas, Larroche, & Pandey, 2013).

SSF se puede definir como la fermentación en ausencia o casi ausencia de agua libre e íntimamente proporciona el hábitat natural para el crecimiento de microorganismos en la superficie del material sólido (o sustrato) (Behera & Ray, 2016).

Por otro lado, el sistema de Fermentación Sumergida (SmF) implica la fermentación en presencia de agua excedente. Se cree que la mayor producción de enzimas en SSF es la principal ventaja sobre SmF y se ha asociado con una mayor biomasa y una menor degradación del producto. El gasto de energía es menor para SSF en comparación con SmF ya que hay menos requisitos de agua, no la mezcla mecánica y el procesamiento posterior también requieren menos energía. Una ventaja significativa de la SSF sería, de hecho, utilizar preparaciones crudas de enzimas húmedas o secas sin lixiviación. Esto también facilita un menor costo operativo de capital, por lo tanto, los procesos de SSF se pueden considerar más económicamente factibles en comparación a SmF (Hansen, Lübeck, Frisvad, Lübeck, & Andersen, 2015).

2.6. Microorganismos productores de celulasa en SSF

La mayoría de los microorganismos empleados en la producción de celulasa en SSF son hongos, bacterias y, en menor medida, actinomicetos, que actúan bajo condiciones específicas (aeróbicas y anaeróbicas). En cuanto a hongos, varios de estos, como *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium solani*, *Hemicolla insolens*, *Penicillium brasilianum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Trametes versicolor*, etc. han sido cultivados en SSF para la producción de celulasa, donde se agrega medio de sales minerales basales para la humectación el sustrato (Behera & Ray, 2016)

Quiroz, et al, (2011) analizó el crecimiento y la producción de enzimas celulolíticas por dos hongos basidiomicetes, *Bjerkandera adusta* y *Pycnoporus sanguineus* cultivados con materiales lignocelulósicos (paja de trigo, cáscara de arroz, rastrojo de maíz, cáscara de semilla de jatropha y serrín de cedro y roble), y tasas de composición y crecimiento y niveles de actividades celulolíticas y xilanolíticas se compararon. Similarmente, se desarrolló un proceso de SSF en orujo de tomate, con los hongos blanco-podredumbre (basidiomiceto) *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*, utilizando tallos de sorgo como soporte y condiciones para la producción de lacasa, xilanasa y actividad de proteasa (Iandolo, Piscitelli, Sannia, & Faraco, 2011).

2.7. Microorganismos Productores de Celulasas

Las celulasas son producidas por varios microorganismos, comúnmente por bacterias y hongos, pero también se ha reportado pocos informes de producción por levaduras (Bocchini et al., 2005). No obstante, se prefieren los hongos filamentosos para su producción, porque el nivel de enzimas producidas por estos es mayor a las que son obtenidas a partir de bacterias. (Sharada, G. Venkateswarlu, S. Venkateshwar & Rao, 2013).

Varios organismos han sido estudiados para la producción de celulasas, por ejemplo, *Trichoderma viride* y *Trichoderma reesei* producen celulasa activa cuando crecen en cultivos sumergidos, *Aspergillus niger* produce celulasa altamente activa cuando se cultivan en medios líquidos. Algunas especies de *Penicillium* como *Penicillium iriensis* y *P. citriviride* producen cantidades significativas de celulasa, cuando se cultiva en diferentes condiciones. Hongos como *Stachy*, *Botsysatra*, *Pesalotia*, *Palmarum*, *Merulius*, *Lnerymans*, *Polyspores*, *Neuraspora* incluyendo además hongos comestibles como *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, *Pleurotus sp*, han sido reportados como productores de celulasas (Sharada et al., 2013).

En cuanto a los sistemas bacterianos están siendo objeto de estudio para la sacarificación de la biomasa y podrían tener ventaja debido a la rápida tasa de crecimiento de las bacterias. También se ha encontrado que la preparación de enzima de bacterias celulolíticas puede sacarificar eficazmente diferentes sustratos celulósicos, por ejemplo, *Cytophaga hutchinsonii*, reveló que puede atacar la celulosa cristalina, demostrando una buena formación y regulación de la biosíntesis de celulasas, sobre diferentes sustratos celulósicos; *Acetivibrio cellulolyticus*, ha atraído un interés especial debido a las altas actividades específicas para endo y exo glucanasa. *A. cellulolyticus*, su complejo enzimático tiene la capacidad de sacarificar celulosa. *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* y *Serratia marcescens*, bacterias productoras de celulasa se han aislado a partir del suelo para la producción máxima de celulasa encontrando que *Pseudomonas fluorescens* es la mejor productora de celulasas. Las enzimas celulolíticas de especies de *Bacillus* han sido el foco de atención de muchos debido a su uso potencial en la conversión de residuos agrícolas en productos útiles (Sharada, et al., 2013).

A pesar de que las bacterias han sido ampliamente estudiadas para la producción de celulasas, se ha puesto un gran énfasis en los hongos debido a su capacidad de producir grandes cantidades de celulasas y hemicelulasas que secretan al medio en que se encuentran lo que hace fácil su extracción y purificación (Otajevwo & Aluyi, 2010). Las especies de hongos celulolíticos más frecuentemente estudiados pertenecen al género *Trichoderma* por ser los mejores productores de celulasas. Pero, otros géneros y especies de hongos como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora crassa*, incluyendo además hongos comestibles como *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, *Pleurotus sp.*, también han sido estudiados para la producción de celulasas (Paredes, 2010). En un estudio realizado por Paredes. (2010), analizó la actividad de enzimas celulasas (UI/g de residuo seco) obtenidas por fermentación en estado sólido sobre los residuos

de banano pseudotallo, hojas y raquis con los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*, en 24 días de incubación, encontró que la máxima actividad enzimática de celulasas fue producida por *Lentinula edodes* en pseudotallo con valores de 8,14 UI/g de residuo seco, por consiguiente, se lo consideró como el mejor tratamiento. Además, determinó que a una temperatura de 50°C y a pH 5,3 son las condiciones óptimas para que las celulasas actúen en la hidrólisis de sustratos celulósicos, condiciones en las que las celulasas alcanzan su máximo valor de actividad.

La mayoría de los hongos ya mencionados se han investigado en una amplia variedad de sustratos, por ejemplo, en tubérculos, semillas o granos trigo. Pero, la mayor parte de hongos reportados en la literatura han sido aislados de sustratos de residuos de cereales o del suelo de diferentes campos agrícolas (Abdullah, Greetham, Pensupa, Tucker & Du, 2016), y algunas cepas más prometedoras aisladas en laboratorio han sido aislados del heno, paja, cascara de cereales y compost (Sharada, et al., 2013).

En cuanto a la actividad de la celulasa, esta permanece baja hasta el inicio de la formación de primordios; luego, durante la fase de fructificación, la actividad de la celulasa se incrementa notablemente; esta se mantiene alta durante la fructificación y declina después de la cosecha. Cuando las fructificaciones no se cosechan, los niveles de celulasa se mantienen altos durante algunos días; esto ha sido reportado para *P. cornucupiae* var. *Citrinopileatus* (Mata, Hernández, & Andreu, 2005).

Chrapkowska & Podyma (2000), determinaron la actividad del complejo de celulasas en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes sustratos (paja de trigo, paja más *Reynouria japónica*). Los resultados obtenidos por estos autores mostraron que esta especie se desarrolló bien en los dos tipos de sustrato, biosintetizando celulosa. De este modo se observa que las

investigaciones sobre los microorganismos y hongos productores de celulasas siguen siendo cada vez más amplia ya que aún se siguen realizando más investigaciones sobre los residuos agrícolas y los residuos de las industrias procesadoras de alimentos por su gran potencial para la producción de estas enzimas.

2.8. Residuos Lignocelulósicos en la producción de Bioetanol

En los últimos años se han desarrollado proceso de bio-conversión empleando cultivos de hongos. Numerosos microorganismos capaces de degradar los componentes del complejo lignocelulósicos, han sido considerados como agentes degradadores de la lignina en la naturaleza (Ortega, García, Betancourt, & Gonzáles, 2005).

Los residuos agrícolas y agroindustriales son ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina; teniendo en cuenta su estructura, pueden usarse como sustrato para el cultivo de hongos filamentosos capaces de producir enzimas extracelulares con actividades celulasas, con importantes aplicaciones industriales, como la hidrólisis de biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol (Paredes et al., 2010), por tanto, la biomasa celulósica, incluyendo los residuos agrícolas (tales como la hojarasca de maíz, la paja de arroz y trigo y el bagazo de caña de azúcar), los residuos municipales (tales como desechos de papel y papel) y los desechos industriales de las fábricas de papel, han mostrado ser una materia prima atractiva para la producción de bioetanol, debido a que este tipo de biomasa no sólo es renovable y está disponible en la mayoría de los países sino también porque son de muy bajo costo y se encuentran en gran abundancia. (Ho, Chen, Brainard & Sedlak, 1999).

Por otro lado, se han realizado varias investigaciones de las enzimas celulolíticas debido a que han tomado gran importancia, ya que han sido ampliamente utilizadas para reemplazar la hidrólisis ácida como método de conversión de celulosa en azúcares fermentables, especialmente

glucosa para la producción de bioetanol y otros alcoholes de importancia industrial, asimismo, la glucosa obtenida es utilizada como materia prima para la manufactura de diferentes alimentos para animales, humanos y productos químicos (Montoya, 2012).

Pero la viabilidad económica de la producción de bioetanol se basa en dos factores de coste principales: el sustrato y las enzimas. La identificación de un material más barato, abundante y fácilmente hidrolizable ha asumido un papel crítico para una producción más económica de azúcares fermentables. Recientemente, una mayor utilización de diferentes tipos de residuos ha sido una interesante alternativa a los sustratos lignocelulósicos tradicionales, lo que ha permitido una considerable reducción en el costo del sustrato y también una valorización adicional para algunos de estos materiales. La reducción del coste está asociado principalmente a las enzimas, por lo que la mayoría de las investigaciones se han centrado en tres estrategias principales: aumentar la eficacia de las enzimas; reducción de los costes de producción de las enzimas; y la reutilización de las enzimas. Durante los últimos años (incluso décadas), la mayor parte de la atención se ha prestado a las dos primeras estrategias, a través de intensa y constante investigación operada tanto por la industria y universidades (Gomes, Domingues & Gama, 2016). Pues, el proceso para la utilización de materia prima lignocelulósica por hidrólisis enzimática hasta ahora no es económico, debido a la falta de complejos enzimáticos suficientemente adecuados como para un proceso de pretratamiento que permita utilizar económicamente el contenido de hidratos de carbono para la producción de bioetanol. La hidrólisis enzimática de lignocelulosa en sacáridos fermentables es una de las etapas más costosas en la producción de bioetanol (Steffien, Aubel & Bertau, 2014). Por lo tanto, a pesar de que existen alternativas de desarrollo para realizar los pretratamientos de estos materiales lignocelulósicos utilizando enzimas comerciales. Falta más investigación para el desarrollo de

estas tecnologías de transformación de los materiales lignocelulósicos, en azúcares fermentables con extractos crudos de enzimas lignocelulolíticas para el proceso de producción de etanol a escala industrial (Montoya, 2012).

2.9. Sacarificación del papel

El uso de papel reciclado y residuos de fabricación de papel son potencialmente materia prima grande, concentrada y conveniente para la producción de etanol mediante hidrólisis enzimática y fermentación. Sin embargo, muchos estudios previos en el área han investigado cargas enzimáticas imprácticamente altas (Chen, Venditti, Jameel, & Park, 2012). Es posible que, debido a los problemas que genera la alta temperatura, resulte apropiado separar la holocelulosa de la lignina en vez de someter todo el material a un tratamiento (Franco, Martínez, & Valencia, 2009).

La conversión a etanol a partir de biomasa lignocelulósica incluye dos procesos: la hidrólisis de la celulosa a celobiosa y otros productos solubles por la acción de enzimas exoglucanasas y endoglucanasas presentes en la preparación de la celulasa, conversión de la celobiosa a glucosa por la acción de la enzima β -glucosidasa y conversión de la glucosa a etanol por fermentación empleando levaduras. El proceso de hidrólisis enzimática puede ser combinado con el de fermentación microbial en una sola unidad llevando a cabo el llamado proceso de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) (Albernas, Pedraza, & Corsano, 2016)

La Sacarificación y Fermentación Simultánea es un proceso de bioconversión incluyendo la hidrólisis de los polisacáridos en monosacáridos en presencia de organismos fermentativos que consumen los azúcares simples. Comparado con la sacarificación y fermentación secuencial, la SSF reduce la inhibición por producto de la enzima hidrolítica mientras reduce la inhibición por sustrato de los organismos fermentativos (Takagi, Suzuki, & Gauss, 1976).

En el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF) los azúcares producidos en la hidrólisis son fermentados inmediatamente por microorganismos, por lo que la formación de los productos inhibidores de la hidrólisis disminuye. El microorganismo más utilizado para la fermentación es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura puede fermentar hexosas pero no la xilosa; produce etanol con altos rendimientos (Balat, 2011)

Investigaciones han demostrado que la sacarificación simultánea de la celulosa a glucosa y fermentación de la glucosa a etanol mejoran la cinética, así como la economía de la conversión de biomasa por productos de la inhibición enzimática en la hidrólisis, minimización de los riesgos de contaminación por la presencia de etanol y reducción de los requerimientos de capital invertido (Wright, Wyman, & Grohmann, 1988).

Por otra parte, se han realizado varias investigaciones en tecnologías para la conversión de papel y materiales derivados del papel en bioetanol; en ellas se ha encontrado rendimientos de azúcar de la sacarificación de papel de oficina en el intervalo de 65-80%, también se ha reportado rendimientos de glucosa del 56% para el cartón y 59% para el lodo de papel en la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). La SSF ha permitido que la liberación de azúcar y la producción de bioetanol ocurran simultáneamente, pero el bioetanol afecta el crecimiento de microorganismos y la temperatura es a menudo subóptima tanto para las enzimas como para los microorganismos de fermentación; además, también se ha encontrado que el coste de la hidrólisis enzimática es un obstáculo importante para la aplicación comercial. Por lo tanto, las estrategias para reducir el coste de la etapa de hidrólisis incluyen aumentar la carga del sustrato, disminuir la carga de la enzima, acortar los tiempos de residencia y aumentar las actividades enzimáticas (Wang et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Producir enzimas celulasas por fermentación en estado sólido con *Pleurotus ostreatus*, usando como sustrato bagazo de fique, y su aplicación en el proceso de sacarificación de papel

3.2. Objetivos Específicos

- Producir enzimas celulasas por fermentación en estado sólido con *Pleurotus ostreatus*, usando residuos de bagazo de fique como sustrato.
- Determinar la actividad de las enzimas celulasas a diferentes tiempos de fermentación y evaluar sus condiciones óptimas de reacción
- Estudiar la cinética de papel empleando las celulasas obtenidas de *P. ostreatus*

4. METODOLOGÍA

4.1. Localización de la investigación

Las pruebas de laboratorio de medición de la actividad enzimática se realizaron en el laboratorio de catálisis del grupo de Investigación en Materiales Funcionales y Catálisis (GIMFC). Los cultivos de los hongos y demás ensayos de obtención de celulasas y el estudio de su aplicación se llevaron a cabo en el laboratorio del grupo de Investigación en Biotecnología Agroindustrial y Ambiental (BIOTA) de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de Nariño.

4.2. Recolección del sustrato

El bagazo de fique de la especie negra común (*Furcraea gigantea*) se recolectó de un cultivo ubicado en el municipio de El Tambo (Nariño), Vereda Llano Largo, Finca Bella Loma. Se tomaron muestras secas del residuo (Figura 2), para facilitar su preparación como sustrato para el cultivo *Pleurotus ostreatus*.



Figura 2. Recolección del Bagazo de fique. (Fuente: Esta investigación)

4.3. Preparación del sustrato

El bagazo de fique se transportó en sacas, para realizar el correspondiente pretratamiento. Al material se realizaron varios lavados con agua caliente con el fin de eliminar el jugo de fique

para evitar que sus componentes químicos actuaran como fungicida, inhibiendo el crecimiento de *P. ostreatus* (Benavides, Arango, Hurtado & Rojas, 2013). Posteriormente, se escurrió y dejó secar al ambiente. El material seco se cortó manualmente usando tijeras, hasta obtener un material con tamaño promedio de partícula de 2 cm (Figura 3).



Figura 3. Pretratamiento del Bagazo de fique. a) Lavado. b) Secado. c) Picado. (Fuente: Esta investigación)

La preparación y condición del sustrato se basó en la metodología de Benavides (2013). Los sustratos se empacaron en bolsas de polipropileno hasta completar 50 g por cada bolsa; para esta investigación se elaboraron 18 unidades productivas. Todos los materiales para el cultivo del hongo fueron acondicionados con carbonato de calcio (CaCO_3) grado analítico (Merck), al 2% en peso y con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ grado analítico (Merck), al 1% en peso, finalmente se incorporó agua hasta obtener el 70% de humedad. Posteriormente se cubrió cada bolsa con papel craft y se esterilizaron en autoclave Sterilof Mod. AUT/40/IPGR por una hora a 121°C (Figura 4) y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente para ser inoculados.



Figura 4. Preparación del Sustrato. a) Sustratos empacados en bolsas de polipropileno y papel craft. b) Esterilización del material. (Fuente: Esta investigación)

4.4. Cultivo del hongo *P. ostreatus*

4.4.1. Inoculación

Los sustratos se inocularon en cámara de flujo laminar, empleando micelio comercial de *P. ostreatus* (WC923) adquirido de la Universidad de Pennsylvania. Una vez realizada la siembra en razón del 5% por kg de sustrato se cerraron las bolsas en la parte superior (Figura 5) (Benavides, 2013).

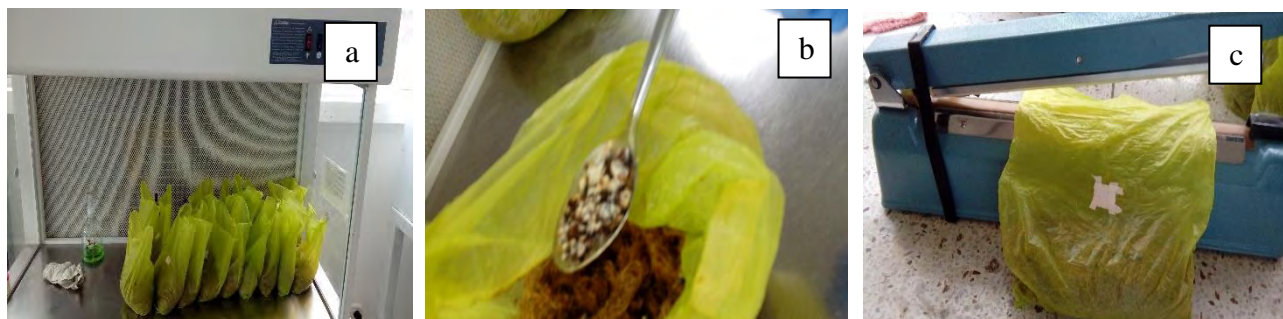


Figura 5. Inoculación del sustrato. a) Cámara de flujo laminar. b) Micelio de *P. ostreatus* para su inoculación. c) Cierre de las bolsas de polipropileno. (Fuente: Esta investigación)

4.4.2. Incubación

Esta etapa se realizó en un espacio aislado, libre de contaminaciones, para ello se construyó una incubadora adaptada a escala de laboratorio; para el control de la temperatura se empleó un termostato digital w1-209 (Figura 6). El periodo de incubación de *P. ostreatus* se mantuvo a 25 ± 0.5 °C hasta la formación de los primordios. A diario se permitió la ventilación del sistema, para evitar la acumulación de gases, a la vez se inspeccionaron las bolsas para determinar el crecimiento del micelio (Figura 6) y evaluar la posible aparición de contaminantes.



Figura 6. Inoculación de *P. ostreatus*. a) Sustratos en proceso de invasión micelial. b) 26 Días de invasión micelial. (Fuente: Esta investigación)

4.5. Muestreo para la determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática se realizó en 6 tiempos de producción micelial del hongo *P. ostreatus* correspondiente a los días 9, 16, 20, 26, 32, 36, esto con el fin de monitorear el avance de la fermentación para la producción de celulasas. Para ello, en los días correspondientes se tomaron muestras al azar de tres bolsas; con una pinza esterilizada se

tomaron muestras de 5 g de sustrato (Figura 7), los cuales se depositaron en bolsas herméticas previamente esterilizadas y se almacenaron a temperatura de refrigeración hasta las correspondientes mediciones de la actividad enzimática, al finalizar el muestreo las bolsas de polipropileno se sellaron con cinta. Para cada muestreo del sustrato se contó con tres repeticiones, una muestra por bolsa, para un total de 18 bolsas.

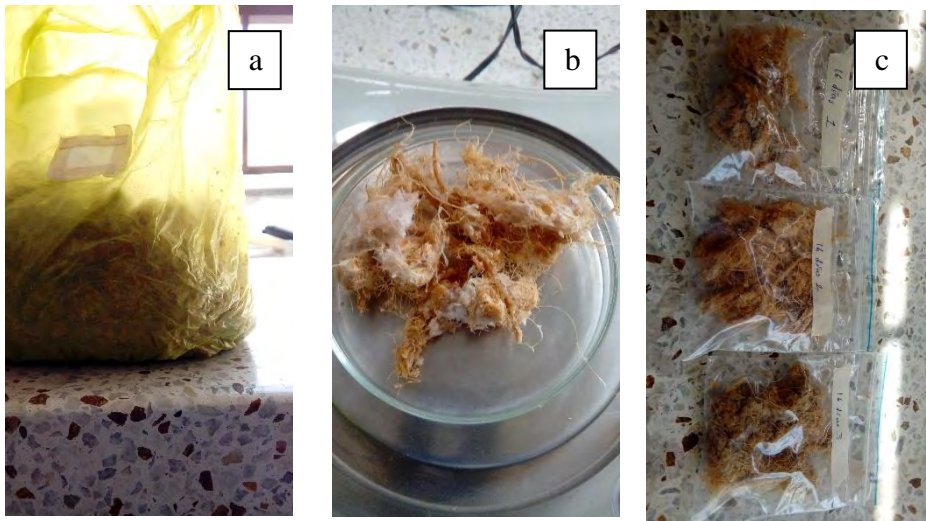


Figura 7. Muestreo para la determinación enzimática. a y b) Muestreo día 16. c) Muestras puestas en bolsas herméticas listas su almacenamiento. (Fuente: Esta investigación)

4.6. Obtención del extracto enzimático de celulasas

Para cada muestra tomada en los diferentes tiempos de producción micelial, se adicionaron 20 ml de solución amortiguadora de citrato 0.05 M, pH 4.8 para 5 g de sustrato; las muestras se agitaron durante 15 minutos, en un agitador recíproco IKA-WERKE HS 501 digital a 200 osc/min, posteriormente se filtraron a través de tela de muselina (Figura 8), el volumen recogido del filtrado se distribuyó en tubos falcon, y se centrifugaron a 6000 rpm por 30 min en una centrífuga Hettich Zentrifugen universal 320, para separar el sobrenadante o extracto enzimático (Paredes, 2010).

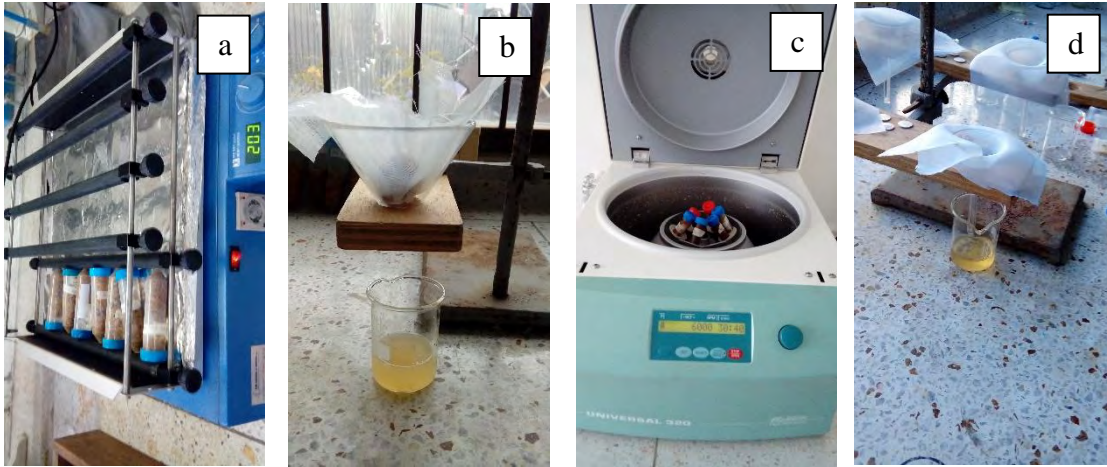


Figura 8. Preparación del extracto enzimático. a) Agitación. b) Filtrado. c) Centrifugación. d) Filtración Extracto enzimático. (Fuente: Esta investigación)

4.7. Medición de la actividad del extracto enzimático

La actividad enzimática de los extractos se determinó con papel filtro (celulasas totales, (FPasa)) y carboximetilcelulosa (endoglucanasa (CMCasa)) (Dashtban, Maki, Leung, Mao & Qin, 2010), de acuerdo al método de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) (Ghose,1987) y se expresaron como unidades internacionales (UI), por mililitro (ml) de extracto enzimático. Una unidad internacional de actividad de celulasa es la cantidad de enzima que forma 1 mol de glucosa (azúcares reductores como glucosa) por minuto durante la reacción de hidrólisis. Los ensayos fueron realizados con buffer de citrato 0.05 M a pH 4.8 e incubados a 50 °C por 30 min para CMC y 60 min para papel de filtro (Figura 9). El contenido de azúcares reductores fue determinado usando el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico usando D-glucosa como estándar (Ghose, 1987). Las lecturas se registraron a una longitud de onda de 540 nm, en un espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu UV-1280 120V.



Figura 9. Medición Actividad Enzimática. a) Reacción FPasa y CMCasa de los extractos. b) Reacción DNS. c) Medición de las muestras en el espectrofotómetro UV-1280. (Fuente: Esta investigación)

4.8. Optimización de condiciones de reacción de las celulasas

Después de determinar el tiempo de producción micelial del hongo que presenta la mayor actividad enzimática se procedió al respectivo estudio de puntos óptimos de las condiciones de reacción de las celulasas, para ello se estudiaron dos factores, pH (pH del buffer de extracción) y temperatura de hidrólisis evaluando 4 puntos axiales y 6 puntos centrales tomando como variable de respuesta la actividad enzimática (FPasa y CMCasa), que fueron medidas según los métodos establecidos por la IUPAC. La actividad de la celulasa se analizó mediante el método de DNS. El efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de celulasa se determinó incubando el extracto enzimático con 1% de CMC para CMCasa y papel filtro para FPasa ambos preparados en diferentes buffers e incubados a diferentes temperaturas acorde a la matriz experimental (Tabla 4).

Tabla 4

Matriz experimental con valores de las variables codificadas de acuerdo con el Diseño Central compuesto

Ensayos	Factor 1 [pH]	Factor 2 [T °C]	Variables Codificadas	
			X1	X2
1	3	35	-1	-1
2	7	35	1	-1
3	3	65	-1	1
4	7	65	1	1
5	2.17	50	-1.41	0
6	7.83	50	1.41	0
7	5	28.78	0	-1.41
8	5	71.21	0	1.41
9	5	50	0	0
10	5	50	0	0
11	5	50	0	0
12	5	50	0	0
13	5	50	0	0
14	5	50	0	0

Fuente. Esta Investigación

4.9. Hidrólisis de celulosa a partir de las celulasas obtenidas

Para el estudio de la degradación de residuos de papel con celulasas de *P. ostreatus* se realizó un previo pretratamiento para remover la tinta de estos. El pretratamiento consistió en colocarlos en agua con jabón de marca LAVA durante 2 horas, posteriormente se procedió a remover la tinta del papel de forma manual, y de manera inmediata fueron lavados con agua destilada, secados a temperatura ambiente y cortados a un tamaño de partícula de 3,9 x 5,0 mm (Wyk, 1999).

La hidrólisis enzimática se realizó sobre residuos de papel previamente pretratados, con celulasas de *P. ostreatus*; bajo las condiciones de pH y temperatura óptimos previamente obtenidas, durante un tiempo de 12 horas, tomando muestras a intervalos de 3, 6, 9 y 12 horas.

Se realizó una carga de papel al 15.5% p/v (Nishimura et al., 2017) y se tomó como tratamiento control papel de oficina impreso reciclado y no reciclado marca Reprograf 75 g. La reacción de las celulasas se llevó a cabo en beaker de 50 ml y una carga enzimática de 5 ml de las celulasas y una agitación de 100 rpm (Khobragade, Sureshkumar, Borkar & Sagar, 2004). El contenido de azúcares reductores fue determinado usando el método de ácido 5-dinitrosalicílico registrando a una longitud de onda de 540 nm, en un espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu UV-1280 120V.

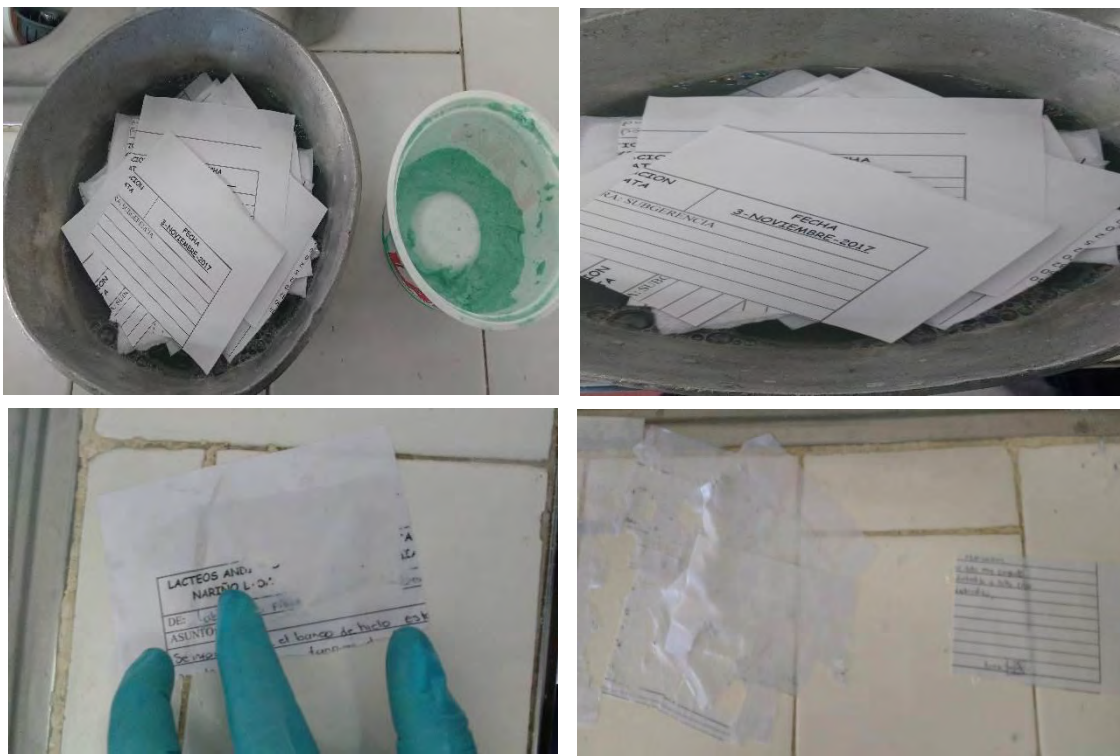


Figura 10. Pretratamiento residuo de papel. a) materiales. b) papel en agua y jabón. c) des-tintado manual d) papel sin tinta. (Fuente: Esta investigación)

4.10. Diseño experimental

Para determinar las condiciones óptimas de reacción de las celulasas de *P. ostreatus*, se desarrolló un diseño central compuesto 2^2 con base en la metodología de superficie de respuesta evaluando los factores de pH y Temperatura con 6 puntos centrales y tomando FPasa y CMCasa

como variable respuesta. Los resultados fueron analizados de acuerdo a los valores obtenidos en el ANOVA, mediante el empleo del paquete estadístico (STATGRAPHICS CENTURION XV) con un nivel de significancia menor o igual a un 5%.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Determinación de la actividad enzimática

El crecimiento de los hongos del género *Pleurotus* está asociado a un perfil de producción de enzimas oxidativas e hidrolíticas (Valadares, 2013). Sin embargo, en este trabajo no se determinaron las actividades de enzimas oxidativas sintetizadas durante el período de crecimiento de *P. ostreatus*; se evaluó la producción de endoglucanasas (CMCasa) y celulasas totales (FPasa), (Dashtban et al., 2010), que fueron evaluadas durante 36 días de crecimiento, con el fin de determinar el periodo de mayor actividad de celulasas. Las curvas de la actividad enzimática de CMCasa y FPasa se muestran en la Figura 11. La actividad de celulasas se determinó midiendo la cantidad de azúcar reducida, esta se calculó mediante la ecuación de regresión, cuyos datos se obtuvieron de una curva patrón con D-glucosa anhidra (Anexo B).

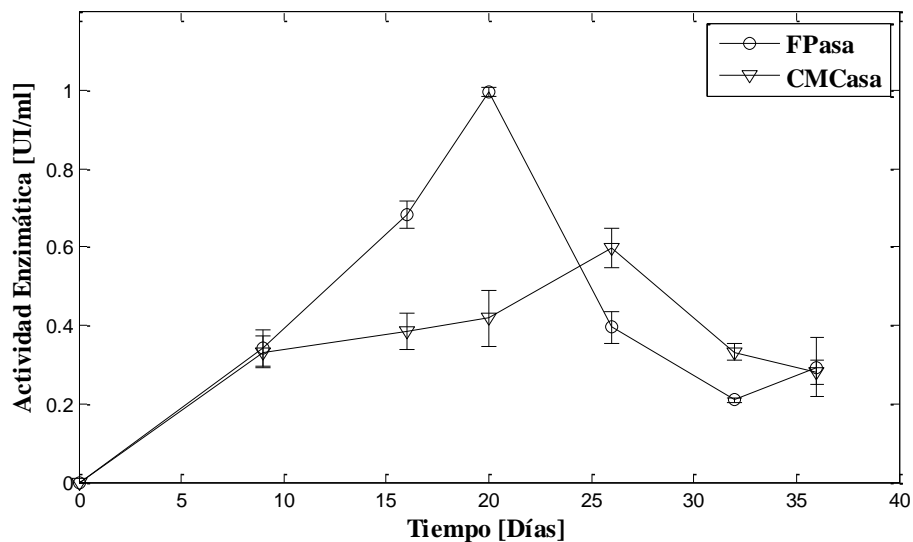


Figura 11. Producción de Celulasas de *P. ostreatus* en bagazo de fique durante su crecimiento. (Fuente: Esta investigación)

La colonización del sustrato (bagazo de fique) por *P. ostreatus* se desarrolló a los 16 días con la formación del micelio blanquecino (masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo) sobre la superficie del sustrato (Anexo A), este punto puede visualizarse en la Figura 11,

a partir del cual se da la última fase de incremento la actividad FPasa. Sin embargo, el punto máximo de generación de FPasa (0.9978 FPU/ml) se dio a los 20 días tiempo en el cual el micelio ha colonizado por completo el sustrato. Las actividades enzimáticas cambian considerablemente durante el cambio entre la colonización del sustrato y las etapas de fructificación del crecimiento de hongos (Kües & Liu, 2000). En diferentes especies del género *Pleurotus*, se ha demostrado que las celulasas, producidas por el micelio vegetativo, están implicadas en el proceso de formación de basidiomas. Durante las primeras etapas del crecimiento micelial, las celulasas mantienen un nivel de producción bajo y este va incrementado cuando aparecen los primordios (cuerpos fructíferos en las primeras etapas de desarrollo) y durante el desarrollo de los basidiomas; al terminar la cosecha de los hongos, la producción de celulasas disminuye drásticamente (Mata, Salmones & Savoie, 2017). No obstante, los perfiles de enzimas pueden diferir dependiendo de la especie del hongo y probablemente, del sustrato de crecimiento (Elisashvili, Chichua, Kachlishvili, Tsiklauri & Khardziani, 2003). Para este caso se observó que la mayor actividad enzimática (FPasa) por *P. ostreatus* aumenta considerablemente cuando el micelio coloniza por completo al sustrato, resultados positivos, ya que la alta actividad enzimática encontrada indica una buena asimilación del hongo hacia el sustrato, pues la baja actividad de FPasa limita la velocidad a la cual los hongos de podredumbre blanca degradan la celulosa nativa. Su acción es necesaria para la degradación de formas altamente ordenadas (cristalinas) de celulosa donde actúa sinérgicamente con enzimas activas de CMCasa (Reddy et al., 2003).

Se observa que en los valores de la actividad celulolítica de *P. ostreatus* la tendencia es creciente durante el periodo de crecimiento del micelio para FPasa. Este decrece al día 26 que es cuando comienzan a aparecer los primordios, periodo en el que la actividad de endoglucanasa

(CMCasa), es máxima (0.5989 IU/ml). La producción de endoglucanasa se ha asociado con las etapas de formación y fructificación de los primordios, en los que se han registrado aumentos significativos de la actividad enzimática, disminuyendo en la etapa de cultivo (Mata, Hernández & Andreu, 2005). Kavivarasan y Natarajan (1997) han reportado que las celulasas se incrementan durante la formación de los primordios y en ocasiones se mantiene durante la fructificación del hongo para luego disminuir en la cosecha. Pero las especies de basidiomicetos superiores parecen diferir en momentos de alta producción de enzimas y no existe una imagen clara sobre la relevancia funcional de las enzimas en la fructificación (Muthangya, Mshandete, Hashim, Amana & Kivaisi, 2013).

En esta investigación se encontró que la mayor actividad celulolítica de *P. ostreatus*, se presentó durante el crecimiento micelial y la formación de los primordios, luego esta comienza a disminuir después de 26 días, e inicia el periodo de desarrollo de los basidiomas. En la literatura, se ha reportado que las enzimas lignocelulíticas de *P. ostreatus* se producen para el crecimiento de hifas vegetativas, pero no para el desarrollo del cuerpo fructífero (Muthangya et al., 2014). Esto apoya los resultados encontrados en el presente estudio al igual que otros estudios, donde se ha encontrado altos valores de celulasas durante el crecimiento micelial y formación de los primordios; la mayor actividad de celulasas antes del periodo de fructificación de *P. ostreatus* han sido reportadas. Isikhuemhen y Mikiashvilli (2009) estudiaron la actividad enzimática lignocelulolítica, de *P. ostreatus* cultivado en sustratos con sólidos de digestor anaeróbico de desechos de la producción comercial de pollos de engorde; registraron que las actividades de CMCasa fueron mayores antes de la fructificación, después de esto (58 días), las actividades enzimáticas disminuyen considerablemente. También se ha encontrado una alta producción de CMCasa antes del periodo de fructificación de *P. ostreatus*, cultivado en aserrín y paja de arroz,

después de la fructificación del hongo la actividad CM Casa disminuye considerablemente; la máxima actividad se encontró a los 30 días en aserrín y 45 días en paja de arroz encontrando una menor producción en este sustrato (Sherief, Tanash & Temraz, 2010).

Kurt y Buyukalaca (2010) evaluaron el rendimiento y los cambios en las actividades enzimáticas de *Pleurotus spp.* (*P. ostreatus* y *P. sajor-caju*) cultivados en diferentes residuos agrícolas (paja de trigo, paja de arroz, paja de sésamo, aserrín) y residuos de viticultura, así como las mezclas de estos desechos con salvado de trigo; las actividades más altas de CM Casa para todos los sustratos estudiados, se detectaron a los cinco días del crecimiento micelial. Las actividades más altas se dieron en: paja de sésamo: salvado (2: 1), paja de arroz: salvado (2: 1) y paja de trigo: salvado (2: 1). Por otra parte, se ha reportado picos máximos de generación de celulasas tanto para CM Casa como FPasa en el décimo día de fermentación en estado sólido con biomasa lignocelulósica, las máximas actividades de celulasas fueron con 1% de paja de arroz como sustrato (Khalil et al., 2011). Por su parte Luz et al., (2012) encontraron la mayor actividad de celulasas durante la formación de los primordios en dos cepas de *P. ostreatus* (PLO 2 y PLO 6), en fermentación en estado sólido con cáscaras de café, aserrín de eucalipto con o sin 20% de salvado de arroz; la mayor actividad de celulasas se dio para ambas cepas en la formación de los primordios (15 días), encontrando los valores más altos de celulasas para la cepa PLO6 y para los sustratos en el que se agregaron salvado de arroz.

Sin embargo, en otros estudios se ha encontrado que la producción de celulasas (endoglucanasa y celobiohidrolasa) está asociada no solo con la formación de los primordios si no también con el desarrollo de cuerpos fructíferos, debido a que en la formación de cuerpos fructíferos implica la movilización acelerada de nutrientes para producir nueva biomasa, esos nutrientes deberán estar presentes en el micelio antes de la formación de los cuerpos fructíferos,

por lo tanto, la producción de celulasas puede estar asociada con el reabastecimiento de nutrientes durante la fase de fructificación (Cedeño, Mata & Savoie, 2002). Además, la alta actividad de las enzimas celulolíticas como hemicelulolíticas durante el desarrollo del cuerpo fructífero se debe al hecho de que las hifas necesitan gran cantidad de energía para formar primordios y cuerpos fructíferos, por lo que las células fúngicas comenzaron a procesar los polisacáridos (Bánfi et al., 2015) para movilizar grandes cantidades de carbono para la formación del hongo (Muthangya et al., 2014).

Pero cabe señalar que pocos son estudios donde se reporte la mayor actividad enzimática de *P. ostreatus* en los días de su cosecha. En un estudio realizado por Vaca, Izurieta & Espín (2014) determinaron los días de máxima generación de tres actividades enzimáticas celulolítica, manganeso peroxidásica y lignino peroxidásica de extractos obtenidos durante fermentación sólida en rastrojo de maíz de las cepas 404 y 2171 de *P. ostreatus*. La mayor actividad enzimática que encontraron fue la celulolítica, esta actividad tuvo sus máximos valores en los días de la cosecha del hongo, entre los días 20 y 22 para la cepa 404, y entre los días 28 y 30 para la cepa 2171. Además, se ha encontrado un segundo pico de mayor actividad de celulasas de *P. ostreatus* sobre rastrojo de cebada, el máximo pico de celulasas se presentó al octavo día de la fermentación, este descendió a los 12 días, luego alcanzo un segundo pico de actividad a los días 20 de fermentación y cosecha (Lunas et al., 2007).

Ghosh, Mukherjee y Nandi (1998) utilizaron biomasa lignocelulósica (pseudotallo de banano) como sustrato para la fermentación en medio sólido de dos especies de *Pleurotus* (*P. ostreatus* y *P. sajor-caju*), encontraron la máxima actividad de CMCasa (1.1 IU/ml) a los 16 días en *P. ostreatus*, y un segundo pico de CMCasa en la etapa posterior a la degradación para ambas

especies, para el caso de *P. ostreatus* el segundo pico de CMCasa (0.06 IU/ml) se dio a los 24 días de su crecimiento.

Eras (2012) evaluó la actividad celulolítica y ligninolítica en extractos obtenidos durante el crecimiento de los hongos *P. ostreatus* 202 y 896 en fermentación sólida con rastrojo de maíz, realizando tres corridas de fermentación; las mayores actividades celulolíticas se dieron a los 27 días para la primera corrida, 25 días para la segunda corrida y a los 24 días para la tercera corrida. Sin embargo, Malaya y Nandi (1995) encontraron actividades altas de endoglucanasa y β -glucosidasa a los 8, 16 y 40 días de crecimiento respectivamente, en la degradación de la biomasa lignocelulósica del jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) por *P. ostreatus* y *P. sajor-caju*, en ambos casos, las actividades de celulasas fueron altas en dichos días.

Valadares (2013) evaluó la actividad endoglucanasa en cultivos sumergidos, sin agitación de *P. ostreatus*, con cuatro sustratos diferentes (bagazo de caña molida, CMC, Avicel y un medio combinado de bagazo más CMC), encontró que las mayores actividades fueron de 0.72 IU/ml a los 42 días en Avicel; 2.33 IU/ml a los 13 días en CMC; 1.72 IU/ml a los 38 días en bagazo de caña y 3.43 IU/ml a los 20 días en bagazo de caña más CMC.

La producción de complejos enzimáticos a partir del cultivo de basidiomicetos como *P. ostreatus* generalmente requiere tiempos prolongados, tanto en fermentación sólida como líquida (Rangel, 2012). Con base en los estudios citados anteriormente, se puede inferir que la generación de la actividad celulolítica de *P. ostreatus* no es arbitraria y está relacionada con el crecimiento y desarrollo del hongo, es decir, se generan en periodos específicos durante la fermentación, sin embargo, los tiempos de fermentación en que se obtengan los máximos valores de actividad enzimática dependerán principalmente del sustrato utilizado y la cepa con la que se trabaje. Ya que varios estudios demuestran que la naturaleza del sustrato lignocelulósico, así

como la cepa y especie de hongo son de gran importancia en la producción de enzimas hidrolíticas, la secreción de estas enzimas es influenciada principalmente por la fuente de carbono utilizado para el crecimiento del hongo (Valadares, 2013), ya que la producción de enzimas por el micelio fúngico es una parte crucial de la hidrólisis de materiales lignocelulósicos complejos en monómeros, que facilitan el proceso de colonización y en última instancia, determinan el rendimiento de los hongos (Raymond, Mshandete & Kivaisi, 2015). Por lo tanto, es muy importante conocer los requisitos para optimizar su producción, en ese sentido, el tipo y la concentración de la fuente de carbono, el pH del medio de cultivo y otros factores determinan qué enzima y la cantidad que se produce (Cervantes, Sánchez, Díaz & Godínez, 2016).

Teniendo en cuenta que autores como Kurt y Buyukalaca (2010); Khalil et al., (2011); Lunas et al., (2007), encontraron las mayores actividades celulolíticas de *P. ostreatus* en tiempos más cortos de su crecimiento que fueron de 5, 10 y 12 días respectivamente. Los resultados obtenidos en este trabajo, presentan la misma tendencia creciente de la actividad celulolítica conforme avanza el proceso de fermentación, pero encontrando que los días en que se produce la mayor actividad son mayores a los citados anteriormente, los días corresponden a los 20 y 26 días para FPasa y CMCasa, por lo que se puede afirmar que los tiempos de fermentación en los que se obtienen los máximos valores de actividad enzimática dependerán principalmente del sustrato utilizado y la cepa con la que se trabaje. A pesar de esto, uno de los objetivos del presente trabajo fue optimizar las condiciones de reacción de las celulasas de *P. ostreatus* obtenidas en fermentación sólida con bagazo de fique, por ello, se tomaron los puntos en que presentó mayor actividad enzimática (20 y 26 días) y a partir de estos se obtuvo nuevamente las celulasas, las cuales se extrajeron con soluciones buffer a diferente pH para luego ser evaluadas a diferentes temperaturas de hidrólisis con el fin de evaluar la mejor condición para obtener la mayor

actividad enzimática y de este modo evaluar su factibilidad y su posible aplicación industrial en la degradación de desechos de papel, para la obtención de azúcares reductores.

5.2. Optimización de condiciones de reacción de las celulasas

5.2.1. Determinación de condiciones óptimas para FPasa

Dado que los extractos enzimáticos de *P. ostreatus* obtenidos por fermentación sólida en bagazo de fique en 20 y 26 días se produjo la mayor actividad enzimática (FPasa y CMCasa) estos fueron elegidos como parámetros en los experimentos del análisis estadístico para su optimización. A continuación, se presentan los resultados del diseño experimental para la actividad de FPasa del extracto enzimático de *P. ostreatus*.

Tabla 5

Matriz de ensayos para determinar el punto óptimo para FPasa

Ensayos	pH	T °C	Promedio FPasa [FPU/ml]	Desviación Estándar
1	3	35	0.4508	0.0476
2	7	35	0.5223	0.0111
3	3	65	0.6539	0.1127
4	7	65	1.3752	0.0890
5	5	28.78	0.2289	0.0614
6	5	71.21	1.0502	0.0525
7	2.17	50	0.0928	0.0021
8	7.83	50	0.5488	0.0139
9	5	50	1.0214	0.0573
10	5	50	1.2018	0.0517
11	5	50	0.8422	0.0769
12	5	50	1.1949	0.2118
13	5	50	1.1307	0.0833
14	5	50	1.0233	0.0345

Fuente. Esta investigación

Tabla 6*Resultados del Análisis de Varianza para FPasa*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:pH	0.2583	1	0.2583	13.88	0.0136
B:T	0.6145	1	0.6145	33.01	0.0022
AA	0.6943	1	0.6943	37.29	0.0017
AB	0.1055	1	0.1055	5.67	0.0631
BB	0.1601	1	0.1601	8.60	0.0325
Falta de ajuste	0.1498	3	0.0499	2.68	0.1575
Error puro	0.0931	5	0.0186		
Total (corr.)	2.0293	13			

Fuente. Esta investigación

La Figura 12, corresponde al diagrama de Pareto de la influencia de las variables estudiadas y de las combinaciones de segundo orden sobre la actividad FPasa. De acuerdo con el análisis de varianza ANOVA (Tabla 6), indica que existen cuatro efectos con p-valor menores a 0.05 con un nivel de significancia del 95%, lo cual indica que dichas variables a excepción del efecto AB, tienen una significativa influencia sobre la respuesta. El estadístico R^2 del 88%, ($R_{ajd.}^2$ de 80.54%) indica que el modelo es estadísticamente significativo, más del 80% de los resultados están representados en el modelo. El valor de la prueba de falta de ajuste fue mayor a 0.05 confirmando que el ajuste del modelo es adecuado, con un nivel de confianza del 95%. El p-valor del estadístico Durbin Watson fue 0.2698 con lo cual se pudo probar, que no existe autocorrelación o correlación serial significativa. La adecuación del modelo por medio del análisis de los residuos se presenta en el **Anexo C**.

La Ecuación 5.2.1. corresponde al modelo de segundo orden que se ajustó a los datos experimentales.

$$FPasa = -2.5006 + 0.585018 * pH + 0.0568282 * T - 0.076594 * pH^2 + 0.005415 * pH * T - 0.000654273 * T^2 \quad (5.2.1)$$

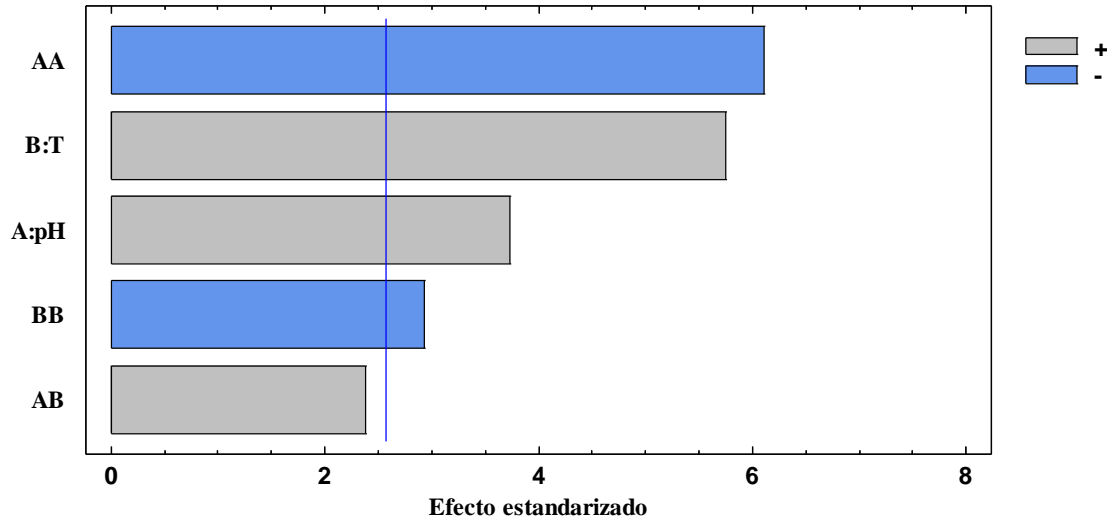


Figura 12. Diagrama de Pareto del efecto estandarizado de las variables de estudio sobre la actividad FPasa del extracto enzimático de *P. ostreatus*. (Fuente: Esta investigación)

En la Figura 12, el Gráfico de Pareto para los efectos principales e interacciones puede observarse que ambos efectos influyen en la actividad de FPasa del extracto enzimático de *P. ostreatus*, la Temperatura y pH, ambos son directamente proporcional a la actividad FPasa (+) y la interacción pH-pH es inversamente proporcional a la variable respuesta (-), la interacción T-T es directamente proporcional a la variable respuesta (+), en cuanto la interacción de pH-T como se puede observar en el gráfico no es significativa. De acuerdo con esto en el diagrama de Pareto se considera que los efectos más importantes en el momento de la obtención de la máxima actividad de FPasa es la Temperatura y la interacción pH-pH.

El comportamiento de los efectos de las variables principales se presenta en la Figura 13, como se puede observar la máxima actividad para FPasa se da a medida que se incrementa la temperatura, sin embargo, esta comienza a ser constante en 65 °C. En cuanto al pH se observa que a medida que este comienza a aumentar la actividad FPasa disminuye considerablemente.

Para examinar la interacción de las variables y determinar el nivel óptimo de cada variable para maximizar la variable respuesta se obtuvo la gráfica de superficie de respuesta (Figura 14). El comportamiento sobre la variable respuesta que tienen la Temperatura y el pH, evidencian que al aumentar la temperatura de hidrólisis enzimática aumenta la actividad FPasa, en cuanto al pH no es muy claro en la superficie de respuesta para ello se observa más claramente en la gráfica de contornos (Figura 15), que el pH óptimo para aumentar la actividad FPasa se localiza a un pH de 6.

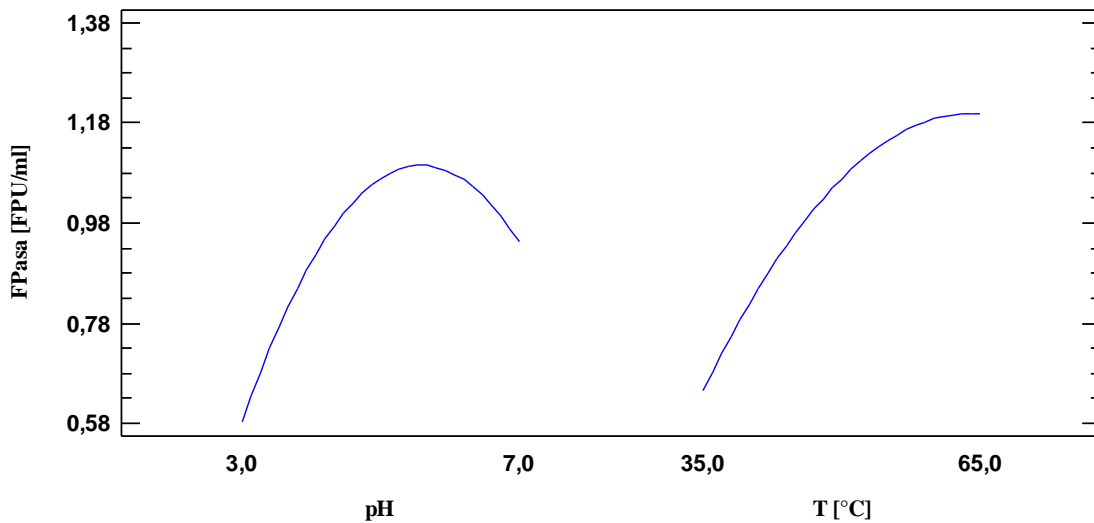


Figura 13. Efectos principales sobre la actividad FPasa. (Fuente: Esta investigación)

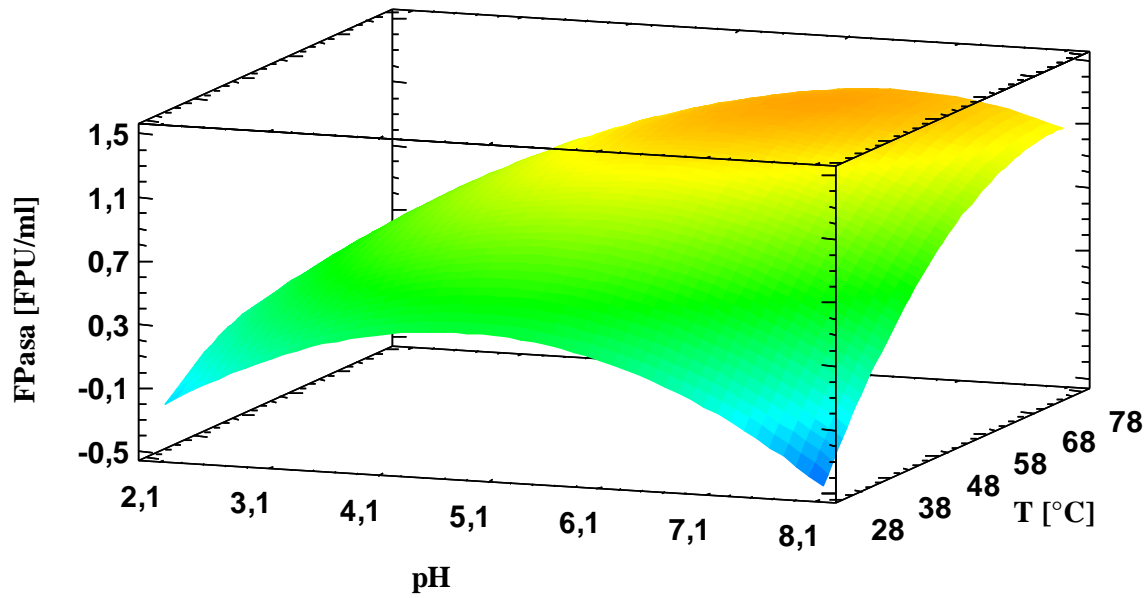


Figura 14. Superficie de Respuesta para actividad FPasa. (Fuente: Esta investigación)

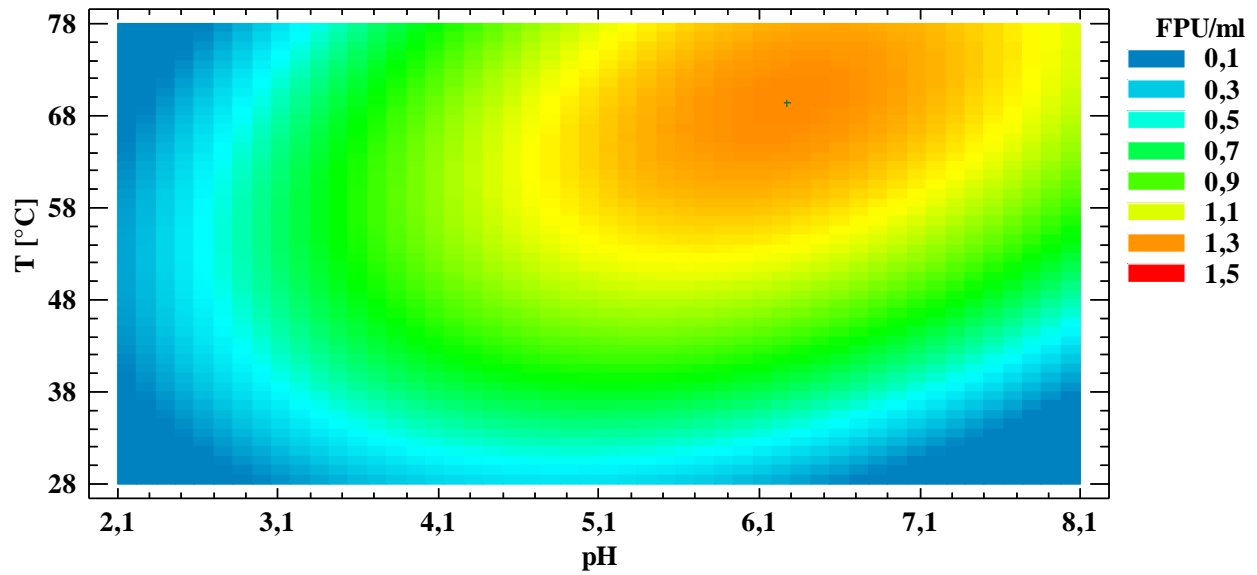


Figura 15. Diagrama de contorno del efecto del pH y Temperatura sobre la actividad FPasa. (Fuente: Esta investigación)

La Tabla 6, muestra la combinación de valores de las variables de estudio que maximiza la actividad enzimática (FPasa) de extracto de *P. ostreatus*. La máxima actividad estimada por el modelo es 1.305 FPU/ml.

Tabla 7

Combinación de factores que maximizan la actividad FPasa de extracto enzimático de P. ostreatus

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
pH	2.17	7.83	6.27149
T	28.78	71.21	69.3823

Fuente. Esta investigación

5.2.2. Determinación de condiciones óptimas para CMCasa

A continuación, se presentan los resultados del diseño de experimentos donde se varió el pH y temperatura para optimizar la actividad enzimática (CMCasa) de extracto enzimático de *P. ostreatus*.

Tabla 8

Matriz de ensayos para determinar el punto óptimo para CMCasa

Ensayos	pH	T °C	Promedio CMCasa [IU/ml]	Desviación Estándar
1	3	35	0.3233	0.0250
2	7	35	0.5108	0.0415
3	3	65	0.4772	0.0186
4	7	65	0.9755	0.0644
5	5	28.78	0.2358	0.0172
6	5	71.21	0.6559	0.0617
7	2.17	50	0.1845	0.0064
8	7.83	50	0.4165	0.0101
9	5	50	0.7847	0.0074
10	5	50	0.7579	0.1041
11	5	50	0.5859	0.0439
12	5	50	0.7661	0.0192
13	5	50	0.7923	0.0562
14	5	50	0.8214	0.0134

Fuente. Esta investigación

Tabla 9**Resultados del análisis de varianza para CMCasa**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón -F	Valor-P
A:pH	0.1284	1	0.1285	18.18	0.0080
B:T °C	0.1837	1	0.1837	26.01	0.0038
AA	0.2284	1	0.2284	32.33	0.0023
AB	0.0241	1	0.0241	3.42	0.1238
BB	0.0786	1	0.0786	11.13	0.0207
Falta de ajuste	0.0947	3	0.0316	4.47	0.0703
Error puro	0.0353	5	0.0071		
Total (corr.)	0.7546	13			

Fuente. Esta investigación

De acuerdo con el análisis de varianza ANOVA (Tabla 9) indica que existen cuatro efectos con p-valor menores a 0.05 con un nivel de significancia del 95%, lo cual indica que dichas variables a excepción de la interacción de AB, tienen una significativa influencia sobre la respuesta. El estadístico R^2 del 82.76%, ($R_{ajd.}^2$ de 71.99%) indica que el modelo es estadísticamente significativo, más del 72% de los resultados están representados en el modelo. El valor de la prueba de falta de ajuste fue mayor a 0.05 confirmando que el ajuste del modelo es adecuado, con un nivel de confianza del 95%. El p-valor del estadístico Durbin Watson fue 0.2026 con lo cual se pudo probar, que no existe autocorrelación o correlación serial significativa. La adecuación del modelo por medio del análisis de los residuos se presenta en el

Anexo C.

La ecuación 5.2.2. corresponde al modelo de segundo orden que se ajustó a los datos experimentales.

$$\text{CMCasa} = -1.6676 + 0.373182 \cdot \text{pH} + 0.0430048 \cdot T \text{ } ^\circ\text{C} - 0.0439337 \cdot \text{pH}^2 + 0.00259 \cdot \text{pH} \cdot T \text{ } ^\circ\text{C} - 0.00045851 \cdot T \text{ } ^\circ\text{C}^2 \quad (5.2.2)$$

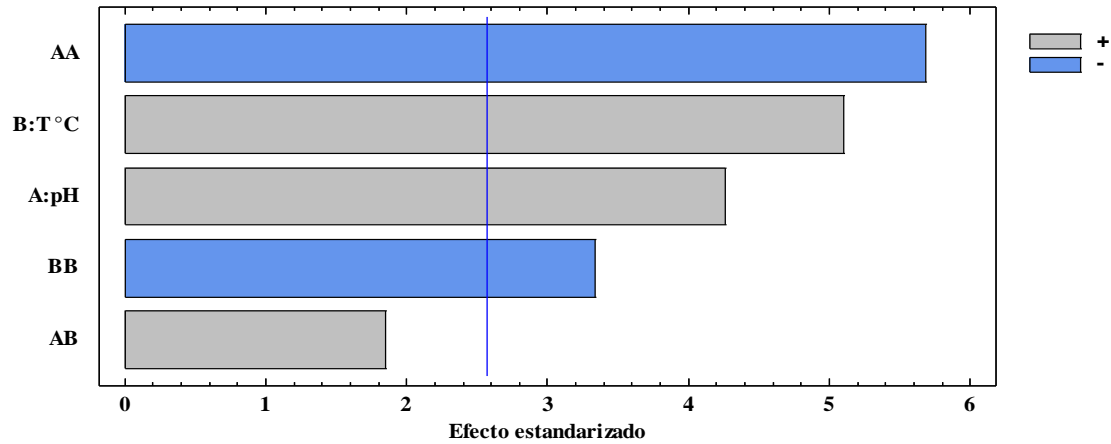
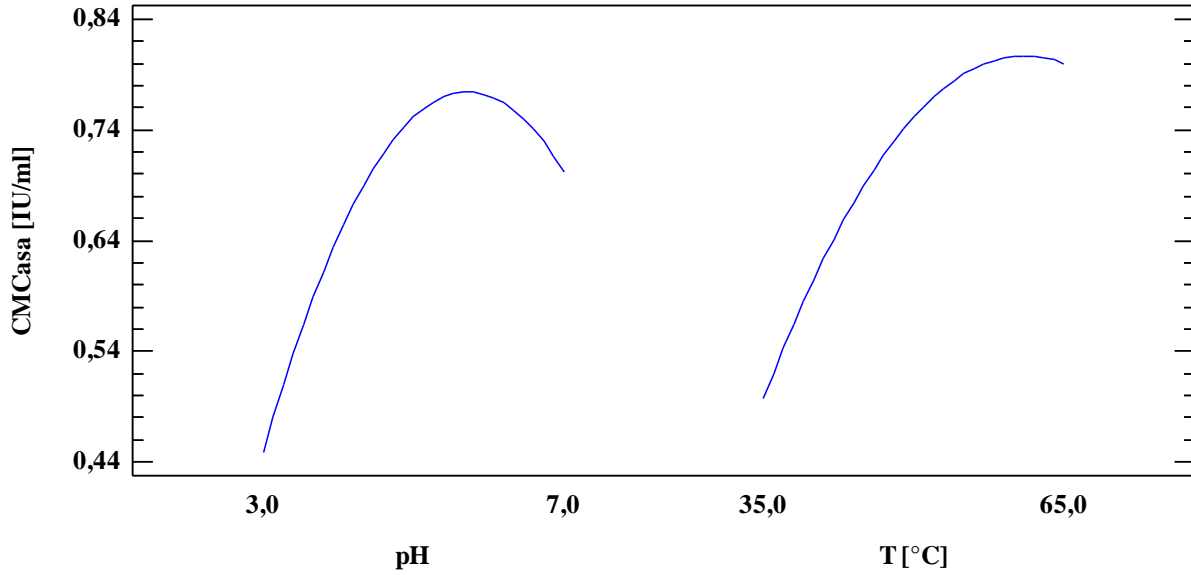


Figura 16. Diagrama de Pareto del efecto estandarizado de las variables de estudio sobre la actividad CMCasa del extracto enzimático de *P. ostreatus*. (Fuente: Esta investigación)

En la Figura 16, el Gráfico de Pareto para los efectos principales e interacciones puede observarse que al igual que en la actividad FPasa sucede lo mismo con la actividad CMCasa de extracto enzimático de *P. ostreatus*, la Temperatura y pH, ambos son directamente proporcional a la actividad FPasa (+) y la interacción pH-pH al igual que T-T es inversamente proporcionales a la variable respuesta (-), para la interacción pH-T no es significativa.

El comportamiento de los efectos de las variables principales se presenta en la Figura 17. Como se puede observar el incremento de la actividad CMCasa se da a medida que se incrementa la temperatura. Sin embargo, para el pH la actividad CMCasa comienza a disminuir cuando este se incrementa. Para determinar el nivel óptimo de cada variable para maximizar la variable respuesta se obtuvo la gráfica de superficie de respuesta (Figura 18). El comportamiento sobre la variable respuesta que tienen la Temperatura y el pH, evidencian que al aumentar la temperatura de hidrólisis enzimática aumenta la actividad CMCasa, en cuanto al pH no es muy

claro en la superficie de respuesta, para ello se observa más claramente en la gráfica de contornos (Figura 19), que el pH óptimo para aumentar la actividad CMCasa se localiza a un pH



de 6 igual que para FPasa.

Figura 17. Efectos principales sobre la actividad CMCasa. (Fuente: Esta investigación)

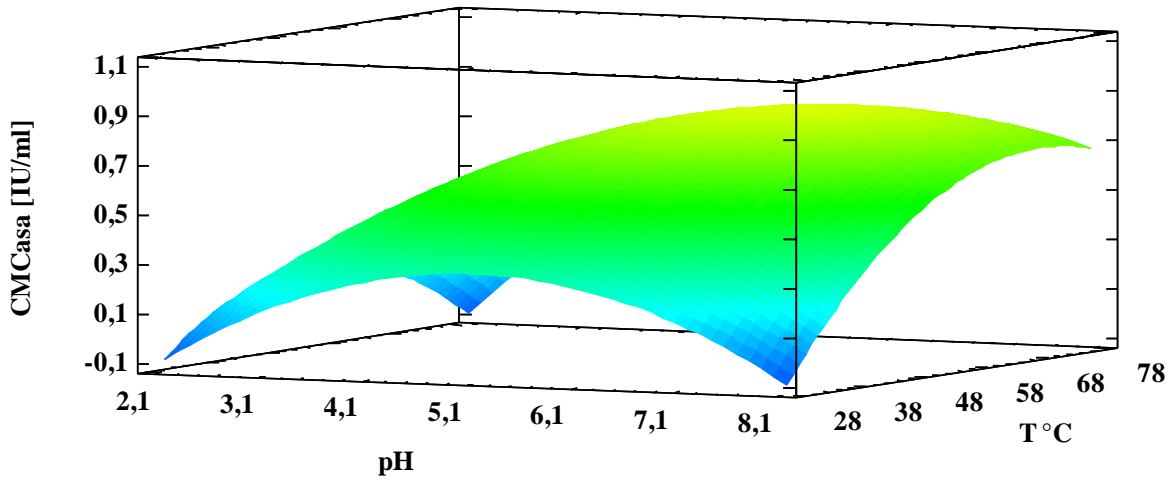


Figura 18. Superficie de Respuesta para actividad CMCasa. (Fuente: Esta investigación)

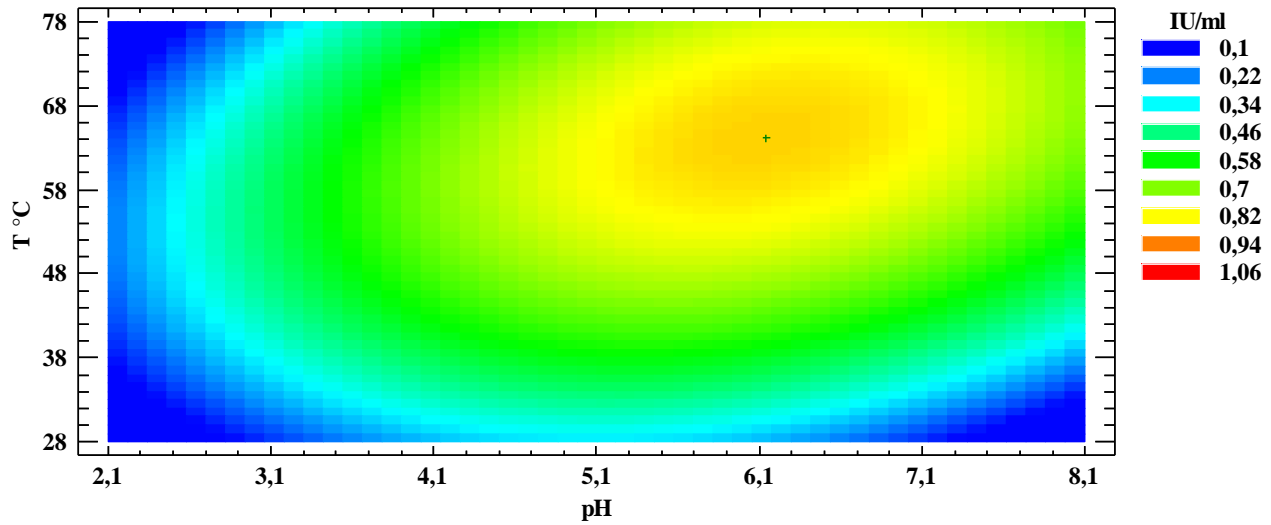


Figura 19. Diagrama de contorno del efecto del pH y Temperatura sobre la actividad CMCasa. (Fuente: Esta investigación)

La Tabla 8, muestra la combinación de valores de las variables de estudio que maximiza la actividad enzimática (CMCasa) de extracto de *P. ostreatus*. La máxima actividad estimada por el modelo es 0.86 IU/ml.

Tabla 10

Combinación de factores que maximizan la actividad CMCasa de extracto enzimático de P. ostreatus

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
pH	2.17	7.83	6.1404
T °C	28.78	71.21	64.2393

Fuente. Esta investigación

La optimización de las dos variables de estudio para maximizar la actividad FPasa y CMCasa de extracto enzimático de *P. ostreatus* como se puede observar en las Tablas 8 y 10; para el caso del pH se da a un valor de 6, pero en cuanto a la temperatura para FPasa y CMCasa es de 69 °C y 64 °C respectivamente.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que modificaciones en las condiciones de extracción (pH del buffer de extracción) y temperatura de hidrólisis afectan significativamente la actividad catalítica de las celulasas de *P. ostreatus* obtenidas por fermentación sólida en bagazo de fique. El pH como se observó para el caso de CMCasa y FPasa no vario, en ambos casos se encontró una mayor actividad enzimática a un pH de 6. Valor que cae dentro del pH de endoglucanasas (CMCasa) fúngicas que han mostrado pH óptimo ácido o neutro (pH 2.5-7.0) (Ding, Ge & Buswell, 2001). Sin embargo, endoglucanasas de basidiomicetos muestran óptimos catalíticos a pH entre 4.0 y 5.0. De forma similar a la mayoría de las endoglucanasas, los óptimos catalíticos de las celobiohidrolasas o exoglucanasa están situados en un estrecho rango de pH entre 4.0 y 5.0 (Baldrian & Valášková, 2008). El pH está directamente relacionado con la estructura de las enzimas y la actividad enzimática de estas, en donde se puede presentar a diferentes pH en menor o mayor proporción dependiendo del hongo que se trabaje (Paredes, 2010), los valores óptimos de pH de celulasas para la mayoría de los hongos están dentro de 4-6 (Hmad & Gargouri, 2017). En cuanto al pH óptimo de celulasas recomendado para procesos industriales generalmente se encuentra en un amplio rango, de 4-8 (Okonkwo, 2014).

En cuanto al pH de celulasas de *P. ostreatus* se ha reportado 4.0 como el pH óptimo. Hong y Kwon (1981), realizaron un estudio sobre enzimas producidas por Basidiomicetos encontraron que el rango de pH estable para las actividades de celulasas de *P. ostreatus* 301 fue de 4.0 a 6.0 pero el óptimo para dicha actividad fue a pH de 4.0 y la temperatura óptima para las actividades de celulasas fue de 40 °C respectivamente. Por su parte, Liguori et al. (2015) Optimizaron las condiciones de sacarificación de biomasa lignocelulósica de *Arundo donax* por enzimas celulolíticas de *P. ostreatus*. En este estudio también encontraron que el pH óptimo de la

actividad de celulasas de *P. ostreatus* fue de 4.0 en buffer McIlvain y en buffer Na-citrato. Pero la temperatura óptima para celulasas fue de 50 °C, temperatura que representa la condición más utilizada para la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica.

Okereke, Akanya y Egwim (2017) aislaron y purificaron una celulasa acidófila extracelular del filtrado del cultivo del hongo *P. ostreatus* cultivado en fermentación sumergida. En este estudio encontraron la actividad más alta de la celulasa purificada a un pH de 4.0. El perfil de temperatura de la celulasa fue estable en un rango de 40 a 65 °C lo que indicó que la enzima era termófila. Además, la celulasa purificada fue capaz de hidrolizar varios residuos (cáscara de yuca, mazorca de maíz, cáscara de arroz y cáscara de cacahuete) sin un pretratamiento químico previo que podría ser el resultado de la alta celulosa y el bajo contenido de lignina de los residuos, con ello han demostrado que celulasas de *P. ostreatus* puede ser una fuente renovable prometedora de estas enzimas que podría explorarse para la degradación de la biomasa y otras aplicaciones industriales.

Por otra parte, Karthikeyan (2015) optimizó la producción de celulasas de *P. ostreatus* y *Calocybe indica*. La actividad de celulasa de *P. ostreatus* tuvo buena actividad entre los rangos de temperatura de 55 y 75 °C respectivamente, sin embargo, la máxima actividad la alcanzó a 70 °C indicando que al igual que la celulasa aislada por Okereke et al. (2017) las enzimas de *P. ostreatus* fueron termófilas, lo que indica que estas celulasas tienen alguna propiedad termoestable (enzimas que mantienen su estructura a temperaturas superiores a 55 °C).

Los resultados encontrados en el presente estudio de la actividad de celulasas de *P. ostreatus* apoya el hallazgo de Karthikeyan (2015), quien encontró que la máxima actividad de celulasa se dio a 70 °C, igual a estos resultados donde la mayor actividad enzimática para celulasas totales (FPasa) se dio a los 69 °C, pero para el caso de CMCasa a los 64 °C. Estos resultados indican

que las celulasas de *P. ostreatus* en este caso fueron termófilas, por lo que se puede decir que estas celulasas tienen gran potencial industrial y por lo tanto puede explorarse para la degradación de la biomasa y otras aplicaciones industriales. Dado que las enzimas celulolíticas termoestables tienen un gran potencial para su uso en procesos industriales como el procesamiento de alimentos, textiles y en la bioconversión de biomasa lignocelulolíticas. La alta termoestabilidad es una propiedad importante de las celulasas, ya que la hidrólisis de la celulosa procederá más rápidamente a temperaturas más altas y además protege tanto el sustrato como los productos de la reacción de la contaminación microbiana y el deterioro (Olajuyigbe & Ogunyewo, 2016), estas enzimas suelen tener una mayor actividad específica y una mayor estabilidad, permitiendo prolongar los tiempos de hidrólisis y disminuir la cantidad de enzima necesaria para la sacarificación (Yeoman et al., 2010).

De acuerdo con lo anterior, y para verificar la efectividad de las celulasas en la hidrólisis de la celulosa del extracto enzimático de *P. ostreatus*, se estudió el comportamiento de degradación de residuos de papel bajo las condiciones óptimas encontradas, pH 6 y temperatura de 69 °C respectivamente. Los respectivos resultados se presentan a continuación.

5.3. Hidrolisis enzimática de papel reciclado

La hidrolisis enzimática se realizó en papel de oficina sin tinta como control (A), papel de oficina con tinta (B) y papel de oficina previamente tratado para remover la tinta (C), con celulasas obtenidas por *P. ostreatus*, bajo las condiciones de pH y temperatura óptimas previamente obtenidas, con un tiempo de hidrólisis de 12 horas. Se tomaron muestras a intervalos de 3, 6, 9 y 12 horas para determinar la producción de Azúcares Reductores Totales (ART) en el tiempo. La Figura 20, muestra los resultados del nivel de glucosa producidos por la hidrolisis enzimática.

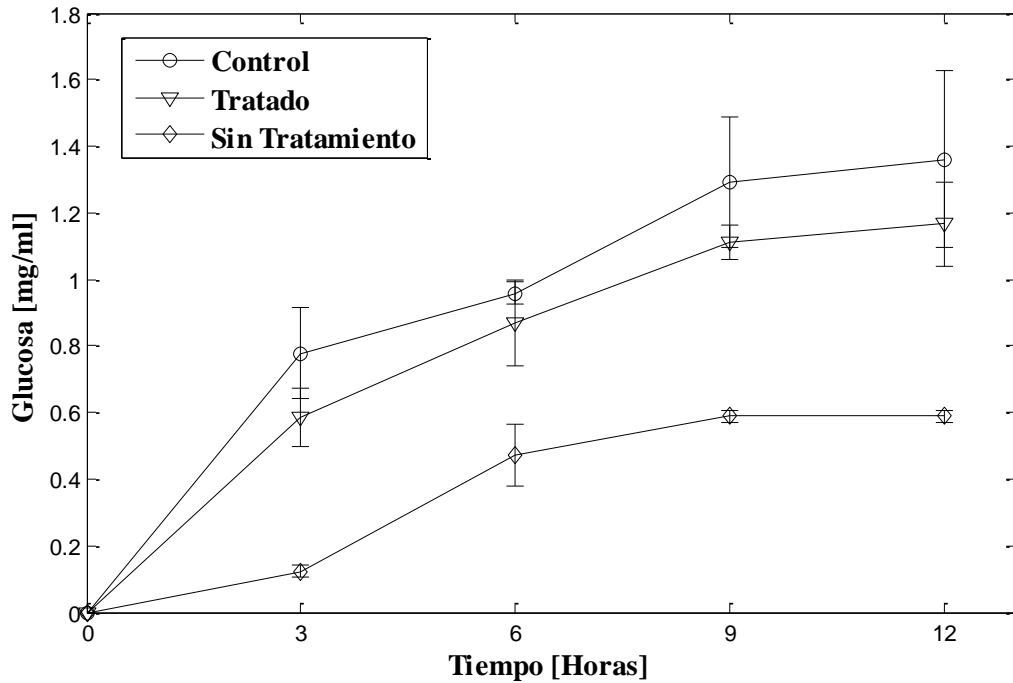


Figura 20. Degradación del papel con celulasas de *P. ostreatus*. (Fuente: Esta investigación)

En la Figura 20, se observa que a las 9 horas de hidrólisis hubo una producción de glucosa (mg/ml) con valores de 1.29 mg/ml para el papel control(A), 1.11 mg/ml para papel previamente tratado(B) y 0.58 mg/ml para papel con tinta(C). Se observa que, después de las 9 horas la producción de glucosa tiende a ser constante en el tiempo para (A), (B), y (C), encontrando un aumento poco significativo a las 12 horas, obteniendo como resultados valores de 1.36 mg/ml, 1.16 mg/ml y 0.58mg/ml respectivamente.

En el papel con tinta, las celulasas realizaron un destintado (Figura 21), ya que estas atacan la estructura de la fibra hidrolizando la celulosa que se encuentra en la región de enlace entre la fibra y las tintas (Sulbarán et al., 2014), esto puede explicar la baja producción de AR obtenidos en comparación al papel sin tinta y papel control.



Figura 21. Hidrolisis enzimática de celulasas de *P. ostreatus* en Papel con tinta. (Fuente: Esta investigación)

En el papel control (A) hubo mayor producción de glucosa (1.36mg/ml) debido a que no hubo la necesidad de realizar un tratamiento para remover la tinta, sin embargo, es importante destacar que el papel previamente tratado (B) obtuvo una concentración de glucosa (1.16mg/ml) cercana al papel control (A), lo que permite afirmar que es importante realizar un pretratamiento para evitar un posible destintado por las celulasas.

En cuanto a la mayor concentración de glucosa se obtuvo a las 12 horas de hidrólisis, tiempo en el cual tiende a ser constante (esto está relacionado a la cantidad de extracto enzimático que se adicionó (5ml para cada tratamiento)) sin embargo, los AR obtenidos son bajos en comparación a otros estudios. Elliston, Collins, Wilson, Roberts, y Waldron, (2013) realizaron una sacarificación y fermentación semi-simultánea de papel de desecho aplicando un pretratamiento con H_2SO_4 durante 3 horas. La sacarificación la realizaron en tres tiempos, 6, 12 y 120 horas; para 6 y 12 horas se obtuvo concentraciones de azúcar de 7.5 mg / ml y 14.4 mg / ml, y rendimientos de 30% y 57% (p / p) respectivamente, mientras que para 120 horas se hizo una adición múltiple de sustrato y enzima, obteniendo como resultado una concentración final de glucosa de 30.8 mg /ml, que equivale a un rendimiento de 61% (p / p). En otro estudio la sacarificación de diferentes materiales de papel (papel filtro, papel periódico, papel de oficina y

papel folio) tratados y no tratados, con diferentes celulasas producidas por *P.funiculosum*, *A.niger*, y *T.viride*, se obtuvo formación de azúcares reductores después de un periodo de 2 horas de sacarificación, siendo las celulasas de *T.viride* más activas en todos los materiales de papel no pre-tratados y pre-tratados, obteniendo valores de AR (mg/mg de proteína) para papel filtro; 2.6 mg/mg, y 3.6 mg/mg; para papel periódico; 1.6 mg/mg y 1.8 mg/mg; papel de oficina; 0.8 mg/mg y 1.7 mg/mg y papel folio; 1.8 mg/mg y 4.3 mg/mg respectivamente (Wyk, Mogale, & Seseng, 2000).

Chu y Feng (2013) evaluaron dos tipos de papel (periódicos y papel de oficina), para la hidrólisis enzimática, utilizando celulasas de *Trichoderma reesei*. Evaluaron y cuantificaron los efectos de cuatro factores (tiempo de hidrólisis (20 h), carga enzimática, adición de surfactante y pretratamiento con ácido fosfórico); obtuvieron rendimientos de azúcar óptimo de 18% con periódico, y 86.6% con papel de oficina. En las condiciones óptimas, se encontró que el rendimiento máximo de azúcar del papel de oficina era de 0.82 g de azúcares reductores por gramo de papel, aproximadamente 4.8 veces mayor que la liberación máxima de azúcar del sustrato del periódico. De la misma manera Guerfali et al. (2015) investigaron la viabilidad de la producción de etanol a partir de periódico y papel de oficina (el papel usado se trató con H_3PO_4 diluido) utilizando la hidrólisis y la fermentación por separado (SHF), con una mezcla de enzimas celulolíticas por *Trichoderma reesei*Rut-C30 y cultivos de *Aspergillus niger*F38; la etapa de hidrólisis la realizaron en condiciones óptimas de hidrólisis, los grados máximos de sacarificación del periódico y el papel de oficina fueron del 67 y el 92%, respectivamente.

Por otra parte, se han realizado investigaciones de sacarificación sobre diferentes residuos lignocelulósicos. Pandit, Lawrence, Singh, y Singh, (2014) realizaron una sacarificación de bagazo, y residuos de papel con celulasas producidas a partir de *Aspergillus flavus*. El papel y

bagazo utilizado realizaron un tratamiento previo con NaOH y H₂O₂. La sacarificación la realizaron con dos concentraciones de sustrato (2.5% y 5.0% p/v). Los resultados de máxima sacarificación de las dos concentraciones fueron de 82% y 62.8% en papel usado y 65% y 55% en bagazo respectivamente, a las 24 h disminuyeron. La disminución en la velocidad de hidrólisis a lo largo del tiempo se puede atribuir a la inhibición por la acumulación de producto final. Lázaro y Arauzo (1994) efectuaron la hidrólisis enzimática de residuos de alcachofa y de espárragos realizando un tratamiento previo con NaOH y sin pretratamiento durante 24 horas; con el pretratamiento obtuvieron jarabes glucosados, con contenido de 1.7 g/L para residuos de alcachofa y 4.5 g/L de glucosa para residuos de espárrago; y rendimientos de reacción entre 3 y 10% respectivamente, sin pretratamiento obtuvieron jarabes glucosados, con contenido de 1.07 g/L para residuos de alcachofa y 2.12 g/L de glucosa para residuos de espárrago. En otros estudios se ha conseguido jarabes glucosados por hidrólisis enzimática con aserrín de pino, con un rendimiento superior en la formación máxima de azúcares reductores del 48%, aplicando un tratamiento previo, con 8% de NaOH, durante 85 minutos, a 120 °C, a un pH de hidrólisis de 4.5 durante 240 h (López et al., 2009). Por su parte, Gonzalez et al. (2011) realizaron una hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades, las cuales se sometieron a pretratamiento con NaOH al 0.1, 0.5 y 1.0%, a 121 °C durante 30, 60 y 90 min. Las pajas pretratadas se analizaron y sometieron a hidrólisis enzimática durante 10 días. La sacarificación máxima (98.95±8.38%) se obtuvo para el pretratamiento con 0.5% de NaOH durante 90 minutos a 121 °C, con un tiempo de hidrólisis de 240 h.

Sangkharak (2011), investigó el desarrollo de producción de azúcar mediante la optimización de un proceso de hidrólisis enzimática, con celulasas de *A. niger* y *T. viride* así como la producción de etanol con residuos de papel (papel de oficina, periódico, volantes y cartón, el

papel de oficina) pre-tratados con explosión de corriente. La producción más alta de azúcar reductor se obtuvo del papel de oficina, con un tiempo de hidrólisis de 53.73 h, y una producción de azúcar de 2.184 mg/L, el porcentaje de conversión de glucosa fue de 43.68% respectivamente.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo presentan la misma tendencia creciente de la formación de azúcares reductores de las investigaciones mencionadas anteriormente, a medida que avanza el tiempo de hidrólisis enzimática, encontrando que a las 12 horas tiende a ser constante. En base a estudios ya mencionados, se puede inferir que es necesario realizar un pretratamiento al papel, puesto que esto aumenta la producción de azúcares reductores, de igual manera el tiempo es una variable importante en el momento de realizar la hidrólisis enzimática, teniendo en cuenta que una extensión del tiempo de hidrólisis puede afectar negativamente al grado de sacarificación, probablemente debido a la desnaturalización enzimática (Guerfali et al., 2015)

Es importante destacar, que al no realizar un pretratamiento, la obtención de azúcares reductores es muy bajo, debido a que la biodegradación de las biomásas lignocelulósicas no tratadas es muy lenta y la extensión de la biodegradación también es baja (Silverstein, Chen, Sharma, Boyette, & Osborne, 2007). Además se debe tener en cuenta que la cristalinidad de las moléculas de celulosa y su asociación con la lignina, constituyen una verdadera barrera física a la penetración de las enzimas, siendo un impedimento a la accesibilidad de la celulosa para desarrollar un proceso de bioconversión de materiales lignocelulósicos (Fan, Lee, & Beardmore, 1980), por lo tanto se requerirá de un pre-tratamiento que permita que la celulosa esté disponible para la acción de las enzimas celulolíticas (Tejeda, Quintana, Pérez, & Young, 2011). Esto, permitirá que los rendimientos en la hidrólisis de celulosa aumenten del 20 al 90% (Fan et al., 1980), y aumente la velocidad de reacción de la hidrólisis enzimática (Khalil et al., 2011); se debe

tener en cuenta que es innecesario eliminar o alterar la lignina para aumentar de forma significativa la susceptibilidad de los materiales lignocelulósicos a la degradación enzimática, dependiendo del tipo de biomasa, es suficiente eliminar del 20 al 60% de la lignina. (Fan et al., 1980).

Se han propuesto y desarrollado diferentes métodos físicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos, que incluyen la utilización de ácidos concentrados o diluidos, SO₂, álcalis, peróxido de hidrógeno, oxidación húmeda, explosión con vapor, explosión de fibras por amoníaco, explosión con CO₂, agua líquida caliente y tratamientos con solventes orgánicos. En cada opción se reduce el tamaño y se abre la estructura física de la biomasa; sin embargo, estos tratamientos consumen gran cantidad de energía y frecuentemente generan compuestos tóxicos, por lo que son poco viables económicamente y de alto impacto ambiental (Quevedo Hidalgo, 2011), además estos pretratamientos no se pueden aplicar de forma genérica por la diversidad de las diferentes materias primas (Sun & Cheng, 2002). Se ha reportado el uso de NaOH para el pretratamiento de materiales lignocelulósicos para aumentar su digestibilidad (Khalil et al., 2011; Silverstein et al., 2007), esto es una buena alternativa frente a otros tipos de pre-tratamientos, ya que el tratamiento con NaOH puede ser el más adecuado para el desarrollo de un proceso de aprovechamiento de residuos agrícolas por hidrólisis, puesto que se trata de un reactivo relativamente barato, no produce sustancias extrañas que puedan interferir en la hidrólisis enzimática y las condiciones de operación son moderadas (Silverstein et al., 2007). Igualmente se enfatiza en los pretratamientos biológicos siendo un enfoque respetuoso con el medio ambiente, el cual ha recibido una atención renovada para mejorar la sacarificación enzimática de la biomasa lignocelulósica en los procesos de bioetanol, estos pretratamientos emplean microorganismos principalmente de hongos marrones, blancos y de pudrición blanca que degradan la lignina y hemicelulosa (Alvira, Tomás-

Pejón, Ballesteros, & Negro, 2010). Lo anterior es particularmente importante, debido a que el costo del pre-tratamiento es uno de los principales factores que encarecen el proceso de producción de etanol (Balat, Balat, & Öz, 2008).

CONCLUSIONES

La mayor actividad enzimática de *P. ostreatus* utilizando bagazo de fique como sustrato se dio a los 20 y 26 días para FPasa y CMCasa con valores de 0.9978 FPU/ml y 0.5989 IU/ml respectivamente.

La generación de la actividad celulolítica de *P. ostreatus* no es arbitraria y está relacionada con el crecimiento y desarrollo del hongo, es decir, se generan en periodos específicos durante la fermentación. En esta investigación se encontró que esta se mantiene hasta la formación de los primordios, luego comienza a disminuir después de los 26 días de su crecimiento que es cuando comienza la formación de los basidiomas.

Las mejores condiciones de extracción (pH del buffer de extracción) y temperatura de hidrólisis de celulasas de *P. ostreatus* cultivado en bagazo de fique fueron pH de 6 y 69 °C.

Tanto el pH como la temperatura de hidrólisis de las celulasas obtenidas presentaron efectos significativos tanto para FPasa como CMCasa y se ajustaron satisfactoriamente a un modelo cuadrático.

El papel como fuente de celulosa, permitió la producción de azúcares reductores, al utilizar las celulasas que se obtuvieron con el hongo *Pleurotus ostreatus*, bajo las condiciones de pH y temperatura óptimas, con un tiempo de hidrólisis de 12 horas, considerándose un sustrato adecuado y eficiente, presentando una tendencia creciente de producción de azúcares reductores.

El estudio de degradación de papel con celulasas de *P. ostreatus* alcanzó la mayor producción de glucosa (mg/ml) a las 9 horas con valores de 1.29mg/ml para el papel control(A), 1.11mg/ml para papel previamente tratado(B) y 0.58 mg/ml para papel con tinta(C). Después de las 9 horas

la producción de glucosa tiende a ser constante en el tiempo, encontrando un aumento poco significativo a las 12 horas.

En el papel control (A) hubo mayor producción de glucosa (1.36mg/ml) debido a que no hubo la necesidad de realizar un tratamiento previo para remover la tinta; es importante destacar que el papel previamente tratado (B) obtuvo una concentración de glucosa (1.16mg/ml) cercana al papel control (A), lo cual permite afirmar que es importante realizar un pretratamiento para obtener mayores rendimientos en la producción de azúcares reductores.

Se concluye que, al realizar un pretratamiento a los residuos lignocelulósicos, se obtendrán mayores rendimientos en la obtención de azúcares reductores, ya que si estos no son previamente tratados la biodegradación es lenta, por lo tanto, se requiere un pretratamiento que permita que la celulosa esté disponible para la acción de las enzimas celulolíticas.

La producción de celulasas de *P. ostreatus* puede ser una fuente renovable prometedora de estas enzimas que pueden ser exploradas para la degradación de la biomasa para la obtención de azúcares reductores y otras aplicaciones industriales.

RECOMENDACIONES

Se recomienda examinar la producción de celulasas de *P. ostreatus* con otras fuentes de carbono, en especial con los residuos lignocelulósicos por ser la mayor fuente renovable de carbono en el mundo.

Se recomienda estudiar las condiciones de cultivo para la producción de extractos enzimático de *P. ostreatus* ya que es muy importante conocer los requisitos para optimizar la producción enzimática que se da durante el desarrollo y crecimiento del hongo, en ese sentido, el tipo y la concentración de la fuente de carbono, el pH del medio de cultivo y otros factores los determinaran qué enzima y la cantidad que se produce.

Se recomienda examinar la estabilidad de las celulasas de *P. ostreatus*, con el propósito de estudiar la actividad enzimática en relación con tiempo de almacenamiento del medio que contiene la enzima.

Se recomienda seguir investigando acerca de la hidrólisis enzimática utilizando como sustrato residuos de papel, teniendo en cuenta la aplicación de un pretratamiento, el cual permitirá que los rendimientos en la hidrólisis de celulosa aumenten, y aumente la velocidad de reacción de la hidrólisis enzimática para obtener mayor producción de AR.

Se sugiere continuar con los estudios que evalúen diferentes factores, como tiempo de hidrólisis, carga enzimática, y diferentes concentraciones de pretratamiento en residuos de papel, con el fin de encontrar condiciones óptimas, para la producción de azúcares reductores y ser utilizados en la producción de bioetanol.

Se recomienda realizar investigaciones en la aplicación de pretratamientos en residuos lignocelulósicos, que sean viables económicamente y no tengan alto impacto ambiental, ya que

muchos pretratamientos físicos, químicos, entre otros, consumen gran cantidad de energía y pueden generar residuos tóxicos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la realización de este trabajo de grado, se recomienda como siguiente paso, realizar un estudio económico a nivel piloto, utilizando los parámetros aquí encontrados, para evaluar la factibilidad económica del mismo y su viabilidad en la economía local.

BIBLIOGRAFÍA

- Albernas, Y., Pedraza, J., & Corsano, G. (2016). Primera aproximación a la cinética de la obtención de etanol mediante sacarificación y fermentación simultánea del bagazo. *Revista de Química Teórica Y Aplicada*, 73(575), 191–196.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858–875. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>
- Baldrian, P., & Valášková, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(3), 501–521. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00106.x>
- Barragán, H. B., Téllez D. Y., & Laguna, T. A. (2008). Utilización de residuos agroindustriales. *Revista Sistemas Ambientales*, 2(1), 44–50.
- Behera, S. S., & Ray, R. C. (2016). Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 656–669. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.090>
- Benavides, O. L., Arango, O., Hurtado, A. M., & Rojas, M. C. (2012). Cuantificación de Sapogeninas del Jugo Fresco y Fermentado de Fique (*Furcraea gigantea*) mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC-PDA). *Informacion Tecnologica*, 23(3), 67–76. <http://doi.org/10.4067/S0718-07642012000300009>
- Benavides, O. (2013). Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos para el cultivo de orellanas (*Pleurotus ostreatus*). Trabajo de Grado Maestría en Ciencias Agrarias. Énfasis en Producción de cultivos. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto, Colombia.

- Benavides Calvache, L., Cabrera Hidalgo, É. V., Villota Muñoz, A. O., & Perdomo, O. D. A. (2015). Ácidos Grasos Del Hongo Funcional *Pleurotus Ostreatus* Cultivado En Residuos Sólidos Agroindustriales. *Producción Más Limpia*, 10(1), 73–81. Retrieved from <http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/pl/article/view/776>
- Biswas, R., Persad, A., & Virendra, V. S. (2014). Production of Cellulolytic Enzymes. In *Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts* (pp. 105–132). <http://doi.org/10.1002/9781118845394.ch5>
- Castro, L., Escalante, H., Quintero, M., & Guzmán, C. (2009). Producción De Biogás a Partir Del Bagazo Generado Durante El Beneficio De Fique. Retrieved from <http://blade1.uniquindio.edu.co/uniquindio/eventos/siquia/siquia2009pon21.pdf>
- Castro, L., Guzman, C., & Escalante, H. (2014). Estabilización Del Bagazo De Fique: Digestión Anaerobia De Una Biomasa Lignocelulosica En Colombia. In *Aprovechamiento de biomasa lignocelulosica, algunas experiencias de investigación en Colombia* (Fundación U. Jorge T. Lozano). Fundación Universitaria Jorge Tadeo Lozano.
- Cervantes, J., Sánchez, C., Díaz, R., & Godínez, G. (2016). Characterization of production of laccases, cellulases and xilanases of *Pleurotus ostreatus* grown on solid-state fermentation using an inert support. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(2), 323331. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62046829003>
- Córdoba, R., & Cultid, G. (2015). Estudio comparativo de la actividad enzimática de lacasa (Lac), LIGNINA PEROXIDASA (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP) de „*Pleurotus*

ostreatus” cultivado en residuos lignocelulósicos de raquis de palma de aceite, bagazo de fique y pulpa de café. Universidad de Nariño.

Cuervo, L., Folch, J., & Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Bio Tecnología*, 13(3), 11–25. Retrieved from http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Lignocelulosa.pdf

Chen, H., Venditti, R. A., Jameel, H., & Park, S. (2012). Enzymatic hydrolysis of recovered office printing paper with low enzyme dosages to produce fermentable sugars. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(5), 1121–1136. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9498-2>

Chrapkowska, K. J., & Podyma, W. I. E. S. Ł. A. W. (2000). Effect of culture conditions of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm. on cellulases complexes activity in post-cultivated substrates. *Acta Microbiologica Polonica*, 49(2), 149–156. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/11093677>

Chu, K. H., & Feng, X. (2013). Enzymatic conversion of newspaper and office paper to fermentable sugars. *Process Safety and Environmental Protection*, 91(1–2), 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2011.12.003>

Criollo, H. A. P., Criollo, J. A. P., & Parra, A. S. (2009). Respuesta del frijol lima (*Phaseolus vulgaris* L.) a la aplicación de abono orgánico a base de residuos sólidos de fique, Tambo, departamento de Nariño. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 26(1), 46-66.

- Dashtban, M., Maki, M., Leung, K. T., Mao, C., & Qin, W. (2010). Cellulase activities in biomass conversion: Measurement methods and comparison Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical Reviews in Biotechnology*, (July 2016), 1–8. <http://doi.org/10.3109/07388551.2010.490938>
- Dhillon, G. S., Oberoi, H. S., Kaur, S., Bansal, S., & Brar, S. K. (2011). Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 1160–1167. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.001>
- Ding, S. J., Ge, W., & Buswell, J. A. (2001). Endoglucanase I from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*: Purification, characterization, cloning and expression. *European Journal of Biochemistry*, 268(22), 5687–5695. <http://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02503.x>
- Elisashvili, V., Chichua, D., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., & Khardziani, T. (2003). Lignocellulolytic enzyme activity during growth and fruiting of the edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm. (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 5(2), 193–198. <http://doi.org/10.1615/InterJMedicMush.v5.i2.80>
- Elliston, A., Collins, S. R. A., Wilson, D. R., Roberts, I. N., & Waldron, K. W. (2013). High concentrations of cellulosic ethanol achieved by fed batch semi simultaneous saccharification and fermentation of waste-paper. *Bioresource Technology*, 134, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.084>

- Eras, E. (2012). Estudio de la generación de extractos enzimáticos con actividad celulolítica y ligninolítica, obtenidos durante la producción de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896 en rastrojo de maíz. escuela politécnica nacional. Recuperado de <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/14623/1/CD-6793.pdf>
- Fan, L. T., Lee, Y.-H., & Beardmore, D. H. (1980). Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 22(1), 177–199. <https://doi.org/10.1002/bit.260220113>.
- Ferreira Santos, A. L., Fausta Kawase, K., & Vieira, G. L. (2011). Enzymatic saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 56(3), 277–282. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.10.044>
- Franco, An., Martínez, P., & Valencia, H. (2009). Pretratamiento de la celulosa y biomasa para la sacarificación. Biomass and cellulose pretreatments for saccharification. *Scientia et Technica Año XV*, 589(42), 284–289. Retrieved from http://fjartnmusic.com/Personal/8o_Semestre_files/BioEtOH.pdf
- Fuentes Rojas, J. L., & Garzón Castillo, J. F. (2013). Evaluación de la actividad y estabilidad de extractos enzimáticos obtenidos de hongos celulolíticos en fermentación líquida. Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11825/GarzonCastilloJavierFernando2013.pdf?sequence=1>
- García, A., & Torres, R. (2003). Producción de enzimas lignolíticas por Basidiomycetes mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido Solid substrate fermentation for

lignolytic enzyme production using Bas ... *Revista Colombiana de Biotecnología*, V,(1), 56–64.

Garzón Gómez, J. P., & Cuervo Andrade, J. L. (2008). Producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia. *NOVA Publ. Cient*, 6(10), 126–140.

Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), 257–268. <http://doi.org/10.1351/pac198759020257>

Ghosh, M., Mukherjee, R., & Nandi, B. (1998). Production of extracellular enzymes by two *Pleurotus* species using banana pseudostem biomass. *Acta Biotechnologica*, 18(3), 243–254. <http://doi.org/10.1002/abio.370180309>

Gomes, D., Domingues, L., & Gama, M. (2016). Valorizing recycled paper sludge by a bioethanol production process with cellulase recycling. *Bioresource Technology*, 216, 637–644. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.004>

Gonzalez, S. M., Soto, N. O., Rutiaga, O. M., Medrano, H., Quiñones, J. G., & López, J. (2011). Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades (Pinto villa, Pinto Saltillo, Pinto Mestizo y Flor de mayo). *Revista Mexicana de Ingeniera Química*, 10(1), 17–28.

Guerfali, M., Saidi, A., Gargouri, A., & Belghith, H. (2015). Enhanced enzymatic hydrolysis of waste paper for ethanol production using separate saccharification and fermentation.

Applied Biochemistry and Biotechnology, 175(1), 25–42. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1243-1>

Gupta, R., Mehta, G., Khasa, Y. P., & Kuhad, R. C. (2011). Fungal delignification of lignocellulosic biomass improves the saccharification of celluloses. *Biodegradation*, 22(4), 797–804. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9404-6>

Hansen, G. H., Lübeck, M., Frisvad, J. C., Lübeck, P. S., & Andersen, B. (2015). Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 50(9), 1327–1341. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.017>

Hernández, R., & López, C. (2007). Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. Pontificia Universidad Javeriana.

Hernández, H., Prada, J., Zapata Lesmes, H. J., Cardona Ruiz, M. C., & Duarte Ortega, M. (2007). Atlas del potencial energético de la biomasa residual en Colombia. *Bucaramanga: Ministerio de Minas y Energía*.

Ho, W.Y., Chen, Z., Brainard, A.P., & Sedlak M. (1999). Successful Design and Development of Genetically Engineered *Saccharomyces* Yeasts for Effective Cofermentation of Glucose and Xylose from Cellulosic Biomass to Fuel Ethanol. *Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology*, Vol. 65

- Hong, J. S., & Kwon, Y. J. (1981). Studies on the enzymes produced by Basidiomycetes, 2: properties of cellulase and xylanase. *Journal of the Korean Agricultural Chemical Society (Korea R.)*.
- Hmad, I., & Gargouri, A. (2017). Neutral and alkaline cellulases: Production, engineering, and applications. *Journal of Basic Microbiology*, 57(8), 653–658. <http://doi.org/10.1002/jobm.201700111>
- Iandolo, D., Piscitelli, A., Sannia, G., & Faraco, V. (2011). Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163(1), 40–51.
- Isikhuemhen, O. S., & Mikiashvili, N. A. (2009). Lignocellulolytic enzyme activity, substrate utilization, and mushroom yield by *Pleurotus ostreatus* cultivated on substrate containing anaerobic digester solids. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(11), 1353–1362. <http://doi.org/10.1007/s10295-009-0620-1>
- Kaviyarasan, V., & Natarajan K. (1997). Changes in extracellular enzyme activities during growth and fruiting of *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus*. In: Rai RD, Dhar BL, Verma NR (eds) *Advances in mushroom biology and production*. National Research Centre for Mushroom, Solan, 309-320
- Kent, J. A. (2012). *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*. (J. A. Kent, Ed.) (Springer.). USA.

- Khalil, M. I., Hoque, M. M., Basunia, M. A., Alam, N., & Khan, M. A. (2011). Production of cellulase by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* in solid state fermentation of lignocellulosic biomass. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35(4), 333–341. <http://doi.org/10.3906/tar-1002-684>
- Khobragade, C. N., Sureshkumar, K., Borkar, P. S., & Sagar, A. D. (2004). Enzymatic saccharification of cellulosic waste by cellulase system of *Cellulomonas uda* immobilized on tri(4-formyl phenoxy) cyanurate. *Indian Journal of Chemical Technology*, 11(6), 816–819.
- Karthikeyan, P. (2015). Optimization of Cellulase Enzyme Production From *Pleurotus Ostreatus* and *Calocybe Indica*. *Pharmacogenomics*, 5(1), 11–16. <http://doi.org/Article>
- Kües, U., & Liu, Y. (2000). Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(2), 141–152. <http://doi.org/10.1007/s002530000396>
- Kurt, S., & Buyukalaca, S. (2010). Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus spp.* (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes. *Bioresource Technology*, 101(9), 3164–3169. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.011>
- Lázaro, L., & Arauzo, J. (1994). Aprovechamiento de residuos de la industria de conservas vegetales. Hidrólisis enzimática. *Zubía*, 12, 227–240.
- Liguori, R., Ionata, E., Marcolongo, L., Vandenberghe, L. P. D. S., La Cara, F., & Faraco, V. (2015). Optimization of *Arundo donax* Saccharification by (Hemi)cellulolytic Enzymes

from *Pleurotus ostreatus*. *BioMed Research International*, 2015, 14.
<http://doi.org/10.1155/2015/951871>

Liguori, R., & Faraco, V. (2016). Biological processes for advancing lignocellulosic waste biorefinery by advocating circular economy. *Bioresource Technology*.
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.054>

López, J., Soto, N. O., Rutiaga, O. M., Medrano, H., & Arévalo, N.K. (2009). Optimización del proceso de obtención enzimática de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 25(2), 95–102.

Lopretti, M., López, A., Ottati, C., & Damboriarena, A. (2007). Implementación de una línea de evaluación para subproductos agroindustriales como sustrato para la producción de Bioetanol. Presacarificación - sacarificación / fermentación simultánea. *Publicación Anual Del Laboratorio Tecnológico de Uruguay*, (2), 2005–2008.

Lozano, W. (2011). Uso Del Extracto De Figue (*Furcraea Sp.*) Como Coadyuvante De Coagulación En El Tratamiento De Aguas Residuales Industriales Y Como Disruptor Del Proceso De Nitrificación De Cuerpos De Agua Hipereutrofizados (Tesis Doctoral). Universidad Internacional de Andalucía, La Rábida, España

Luz, J. M. R., Nunes, M. D., Paes, S. A., Torres, D. P., da Silva, M. de C. S., & Kasuya, M. C. M. (2012). Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1508–1515.
<http://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400035>

- Manjarrés, K., Castro, A., & Rodríguez, E. (2010). Producción de lacasa utilizando *Pleurotus ostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña. *Revista lasallista de Investigación*, 7(2), 9–15.
- Malaya, G., & Nandi, B. (1995). Dynamics of extracellular enzymes during lignocellulose degradation of water hyacinth biomass by *Pleurotus spp.* *Mushroom Research*, 4(2), 53-58.
- Marín Alvarado, R. M. (2007). *Caracterización Y Expresión Recombinante De Una Celulasa De Origen Antártico* (Tesis de Pregrado). Universidad de Chile. Santiago de Chile
- Martin, A. M. (1998). *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products* (segunda ed). SPRINGER SCIENCE+BUSINESS MEDIA, LLC. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5821-7>
- Mata, G., Salmones, D., & Savoie, J. (2017). Las enzimas lignocelulolíticas de *Pleurotus spp.* Lignocellulolytic enzymes of *Pleurotus spp.* In J. Sánchez & D. Royse (Eds.), *La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas Pleurotus spp* (1ra. Edici, p. 355). Chiapas.
- Mata, G., Murrieta Hernández, D. M., & Iglesias Andreu, L. G. (2005). Changes in lignocellulolytic enzyme activites in six *Pleurotus spp.* strains cultivated on coffee pulp in confrontation with *Trichoderma spp.* *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(2), 143–150. <http://doi.org/10.1007/s11274-004-3041-3>

- Medina, D., Núñez, M., & Ordoñez, S. (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.
- Membrillo, I., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E., & Loera, O. (2008). Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology*, 99, 7842–7847.
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.083>
- Michelin, M., Ruiz, H.A., Silva, D.P., Ruzene, D.S., Teixeirad, J.A., & Polizelia, T.M. (2014). Cellulose from Lignocellulosic Waste. *Polysaccharides: Bioactivity and biotechnology*, 475-511.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid and reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* 31, 426–428.
- Montoya Barreto, S. (2008). Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto *grifola frondosa*. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.
- Montoya, S. (2012). Obtención de enzimas lignocelulolíticas y polisacáridos a partir de residuos lignocelulósicos del departamento de caldas empleando macromicetos de pudrición blanca por fermentación sumergida y fermentación en estado sólido (Tesis de Pregrado). Universidad de Caldas, Caldas, Colombia.

- Muthangya, M., Mshandete, A. M., & Hashim, S. O. (2013). Evaluation of enzymatic activity during vegetative growth and fruiting of *Pleurotus* HK 37 on *agave sisalana* saline solid waste. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 4(1), 247–258.
- Okereke, O. E., Akanya, H. O., & Egwim, E. C. (2017). Purification and characterization of an acidophilic cellulase from *Pleurotus ostreatus* and its potential for agrowastes valorization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12(October), 253–259. <http://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.10.018>
- Okonkwo, I. F. (2014). Original article Effect of temperature and pH on activity of purified cellulase obtained from *Aspergillus flavus*. *Journal of Biological Sciences*, 3(6), 47–58. <http://doi.org/10.14196/sjbs.v3i6.1535>
- Olajuyigbe, F. M., & Ogunyewo, O. A. (2016). Enhanced production and physicochemical properties of thermostable crude cellulase from *Sporothrix carnis* grown on corn cob. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 110–117. <http://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.012>
- Ortega Arias, G. M., García, G., Betancourt, D., & Gonzáles, A. (2005). Biotransformación de Residuos Lignocelulosicos con Hongos *Pleurotus*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 36.
- Otajevwo, F. D., & Aluyi, H. S. A. (2011). Cultural conditions necessary for optimal cellulase yield by cellulolytic bacterial organisms as they relate to residual sugars released in broth medium. *Modern Applied Science*, 5(3), 141–151. <http://doi.org/10.5539/mas.v5n3p141>

- Ovando, S. L., & Waliszewski, K. N. (2005). Commercial cellulase preparations and their applications in extractives processes. *Universidad Y Ciencia*, 21(42), 113–122.
- Pandit, S., Lawrence, K., Singh, A., & Singh, S. (2014). Saccharification of Baggase , Paper waste by cellulase produced from *Aspergillus flavus*. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 2(3), 16–22.
- Paredes, D. A. (2010). Obtención de enzimas celulasas a partir de hongos (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*) utilizando como sustratos los residuos del cultivo del banano (*Musa cavendish*). Tesis para optar al Título de Ingeniero de Alimentos, Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Ambato-Ecuador
- Paredes Medina, D., Álvarez Núñez, M., & Silva Ordoñez, 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, 81–88.
- Quevedo Hidalgo, B. E. (2011). Evaluación de la degradación de residuos de floricultura para la obtención de azúcares con el uso de tres hongos lignocelulolíticos.
- Quiroz Castañeda, R. E., Pérez Mejía, N., Martínez Anaya, C., Acosta Urdapilleta, L., & Folch Mallol, J. (2011). Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. *Biodegradation*, 22(3), 565–572. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9428-y>

- Rangel, S. X. (2012). Estudio del efecto de enzimas ligninolíticas y celulolíticas obtenidas del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre una gramínea forrajera tropical. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/8853/>
- Reddy, G. V., Babu, P., Komaraiah, P., Roy, K. R. R. M., & Kothari, I. L. (2003). Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochemistry*, 38(10), 1457–1462. [http://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00025-6](http://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00025-6)
- Redin Iroz, A. (2010). Efecto de la inducción con extractos acuosos de paja de trigo sobre la producción de enzimas lignoíticas EN *Pleurotus ostreatus*. Universidad Pública de Navarra.
- Raymond, P., Mshandete, A. M., & Kivaisi, A. K. (2015). Enzyme Profiles of *Pleurotus* HK-37 During Mycelia Vegetative Growth and Fruiting on Solid Sisal Waste Fractions Supplemented with Cow Manure. *Advances in Biochemistry*, 3(5), 57–65. <http://doi.org/10.11648/j.ab.20150305.12>
- Rodríguez Valencia, N., & Jaramillo López, C. (2006). Cultivo de hongos comestibles del género *Pleurotus* sobre residuos agrícolas de la zona cafetera. Chinciná - Caldas - Colombia.
- Sanchez, O. J., & Cardona, C. A. (2005). Produccion biotecnologica de alcohol carburante I: obtencion a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, 30(64), 671–678. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005001100005&nrm=iso

- Sangkharak, K. (2011). Optimization of enzymatic hydrolysis for ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of wastepaper. *Waste Management & Research*, 29(11), 1134–1144. <https://doi.org/10.1177/0734242X10387656>
- Schmidt, O. (2006). *Wood and Tree Fungi. Biology, Damage, Protection, and Use*. New York: Springer Netherlands.
- Sharada, R., Venkateswarlu, G., Venkateshwar, S., & Rao, M. A. (2013). Production of Cellulase a Review. *Ijpcbs*, 3(4), 1070–1090.
- Sherief, A., Tanash, A., & Temraz, A. (2010). Lignocellulolytic enzymes and substrate utilization during growth and fruiting of *Pleurotus ostreatus* on some solid wastes. *Journal of Environmental Science and Technology*, 3(1), 18–34.
- Silverstein, R. A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R. R., Boyette, M. D., & Osborne, J. (2007). A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology*, 98(16), 3000–3011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.022>
- Srivastava, N., Srivastava, M., Mishra, P. K., Gupta, V. K., Molina, G., Rodriguez-Couto, S., Ramteke, P. W. (2017). Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82(August), 2379–2386. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.074>

- 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*, 10(12), 151–158.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>
- Takagi, M., Suzuki, S., & Gauss, W. F. (1976). Manufacture of Alcohol from Cellulosic Materials Using Plural Fer-ments. United States Patent: 3,990,944.
- Tejeda, L., Quintana, J., Pérez, J., & Young, H. (2011). Obtención De Etanol a Partir De Residuos De Poda, Mediante Hidrólisis Ácida E Hidrólisis Enzimática. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(1), 111–116.
- Thomas, L., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* (Vol.81). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>
- Vaca, M., Izurieta, B., & Espín, N. (2014). Obtención de Extractos Enzimáticos con Actividad Celulolítica y Ligninolítica a Partir del Hongo *Pleurotus Ostreatus* 404 y 2171 en rastrojo de Maíz. *Revista Politécnica*, 33(1).

- Valadares, F. (2013). Produção e uso de enzimas derivadas do fungo *Pleurotus ostreatus* na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermomecânico. Tesis para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.
- Vallejos, N. (2013). Degradación de residuos vegetales mediante inoculación con cepas microbianas. *Enfoque UTE*, 4(1), 1–13. Retrieved from <http://ingenieria.ute.edu.ec/enfoqueute/>
- Varnero, M. T., Quiroz, M. S., & Álvarez, C. H. (2010). Utilización de residuos forestales lignocelulósicos para producción del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*). *Informacion Tecnologica*, 21(2), 13–20. <https://doi.org/10.1612/inf.tecnol.4154it.09>
- Wang, J. S., Wang, J., & Gulfraz, M. (2005). Efficient cellulase production from corn straw by *Trichoderma Reesei* LW1 through solid state fermentation process. *Ethnobotanical Leaflets*, 2005(1), 7.
- Wang, L., Sharifzadeh, M., Templer, R., & Murphy, R. J. (2012). Bioethanol production from various waste papers: Economic feasibility and sensitivity analysis. *Applied Energy*, 111, 1172–1182. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.08.048>
- Whitehurst, R. J., & Oort, V.M. (Eds.). (2009). *Enzymes in food technology*. John Wiley & Sons.
- Wright, J. D., Wyman, C. E., & Grohmann, K. (1988). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose. *Appl. Biochem. Biotech.*, 18(1), 75–90. <https://doi.org/10.1007/BF02930818>

Wyk, J. P. H., Mogale, M. A., & Seseng, T. A. (2000). Saccharification of used paper with different cellulases. *Biotechnology Letters*, 22(6), 491–494. <https://doi.org/10.1023/A:1005648316531>

Yeoman, C. J., Han, Y., Dodd, D., Schroeder, C. M., Mackie, R. I., & Cann, I. K. O. (2010). Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. *Advances in Applied Microbiology*, 70(10), 1–55. [http://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70001-0](http://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70001-0)

ANEXOS

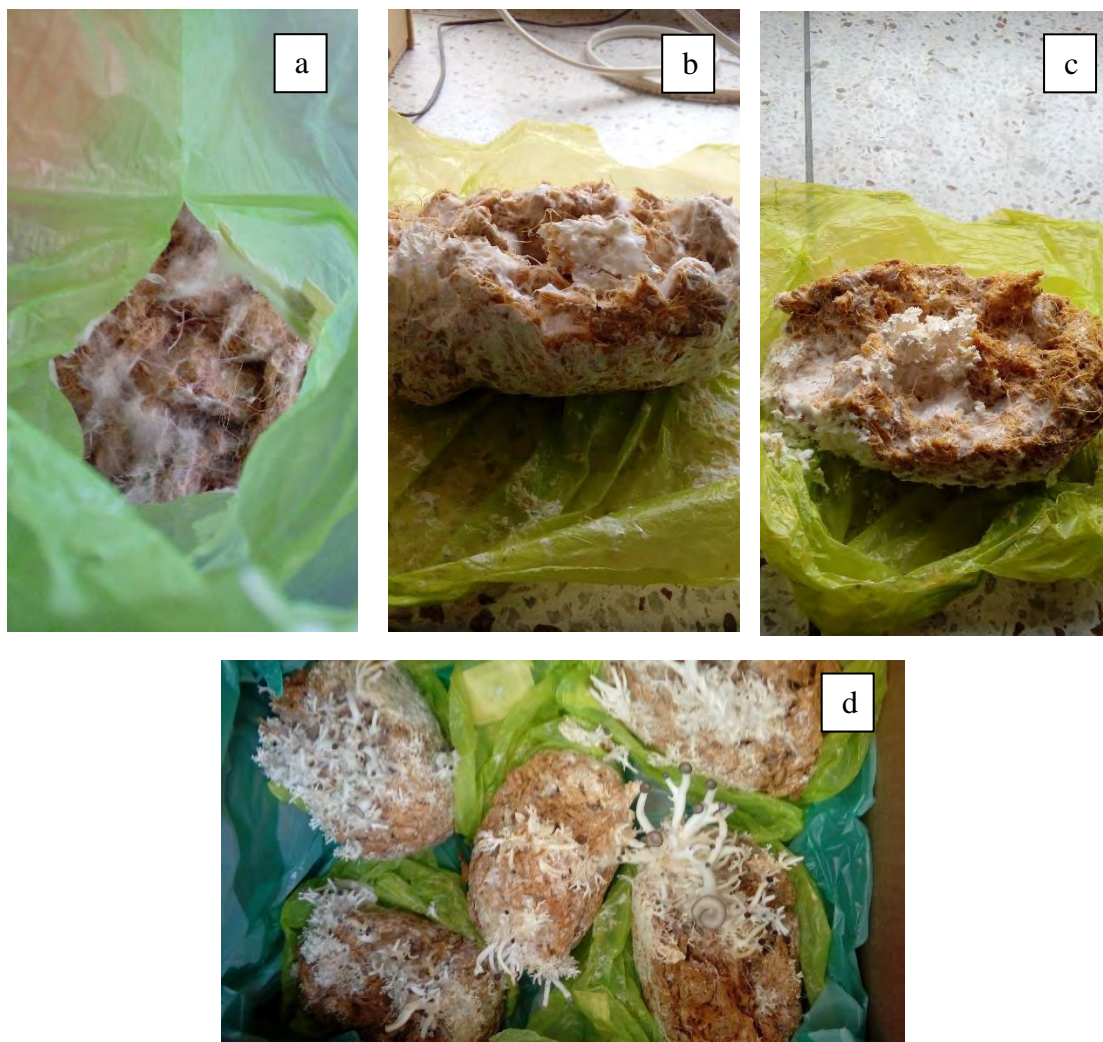
ANEXO A. Sustrato en formación micelial, formación y fructificación de primordios de *P. ostreatus*

Figura A-1. Desarrollo de *P. ostreatus*. a) formación del micelio blanquecino. b) Invasión micelial. c) Formación de primordios. d) Fructificación de los primordios. (Fuente: Esta investigación)

ANEXO B. Determinación química de azúcares reductores

Para la determinación de los azúcares reductores se utilizó la técnica analítica desarrollada por Miller (1959) el cual se basa en la reducción del reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico en presencia de azúcares reductores, hacia ácido 3 amino 5 dinitrosalicílico, producto coloreado que absorbe a 540 nm. El procedimiento reportado fue adaptado de Ghose (1987) y del reporte técnico NREL/TP-510-42628.

Curvas de calibración de la concentración de glucosa utilizadas

Las curvas de calibración para determinar CMCasa y FPasa se presentan a continuación. Para ello se construyeron curvas estándar de glucosa lineal usando cantidades absolutas de glucosa (mg/0.5ml), diluida en citrato 0.05 M pH 4.8. Para los cálculos de CMCasa y FPasa a diferentes pH y para el cálculo de azúcares reductores en la hidrólisis de papel, se construyó la curva estándar de glucosa (2g/l), diluida en agua destilada. El ajuste de las curvas se realizó mediante la herramienta de Análisis de datos en Excel®.

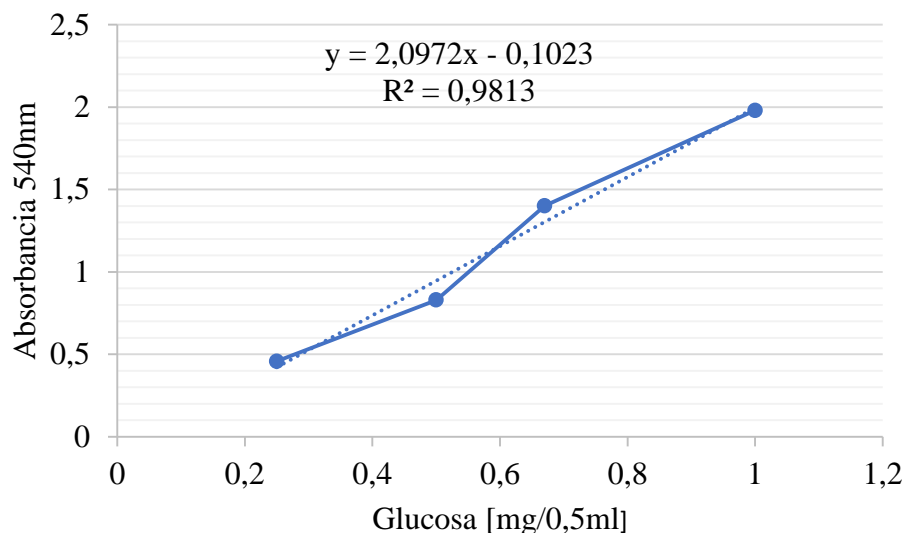


Figura B-1. Curva de regresión correspondiente a Glucosa/Buffer fosfato/CMC. (Fuente: Esta investigación)

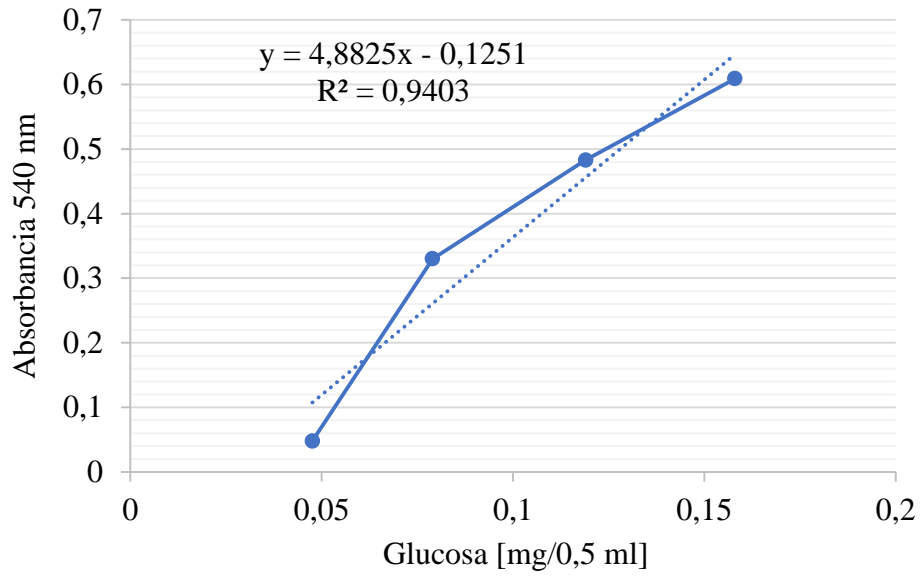


Figura B-2. Curva de regresión correspondiente a Glucosa/Buffer fosfato/FP. (Fuente: Esta investigación)

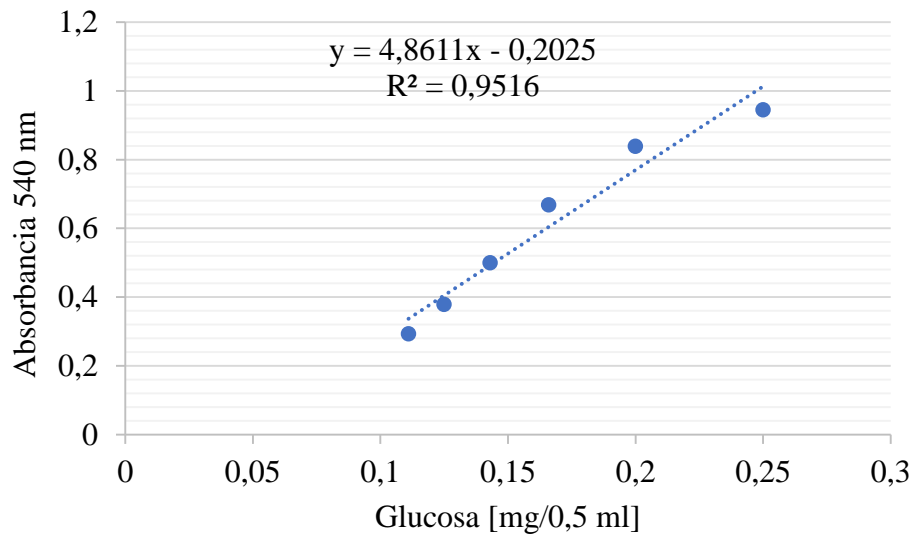


Figura B-3. Curva de calibración de D-glucosa para CMCasa y FPasa a diferentes pH. (Fuente: Esta investigación)

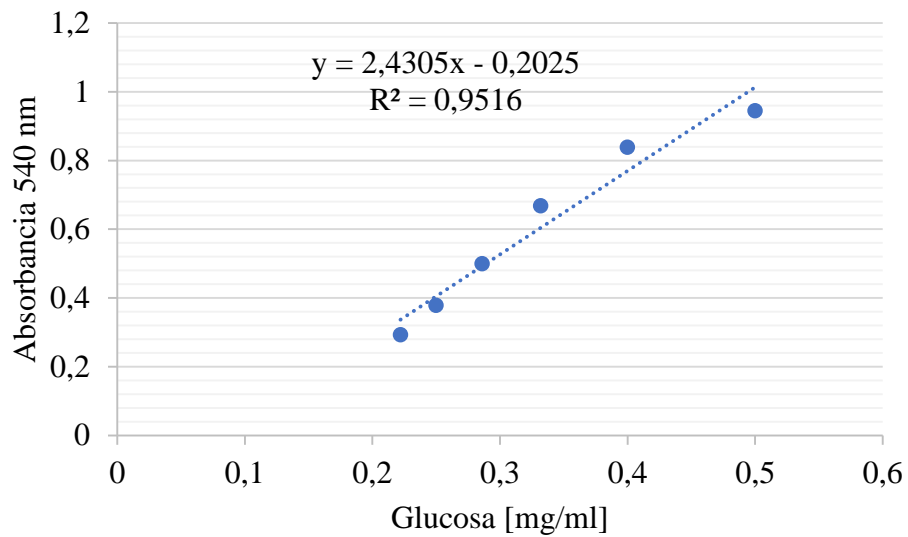


Figura B-4. Curva de calibración de D-glucosa. (Fuente: Esta investigación)

ANEXO C. Análisis estadísticos

A continuación, se presentan las gráficas de probabilidad normal y los residuales para cada uno de los diseños estadísticos.

Supuesto de normalidad: En la Figura C-1 y C-2, se muestra el gráfico de probabilidad normal de los efectos para FPasa y CMCasa, observándose en ambos similitud del comportamiento entre los resultados obtenidos y los predichos por el programa estadístico utilizado. podemos observar que tanto para FPasa y CMCasa los residuos parecen ajustarse a una línea recta, por lo que no tenemos motivos para sospechar que existan problemas en cuanto a la validez de nuestras conclusiones

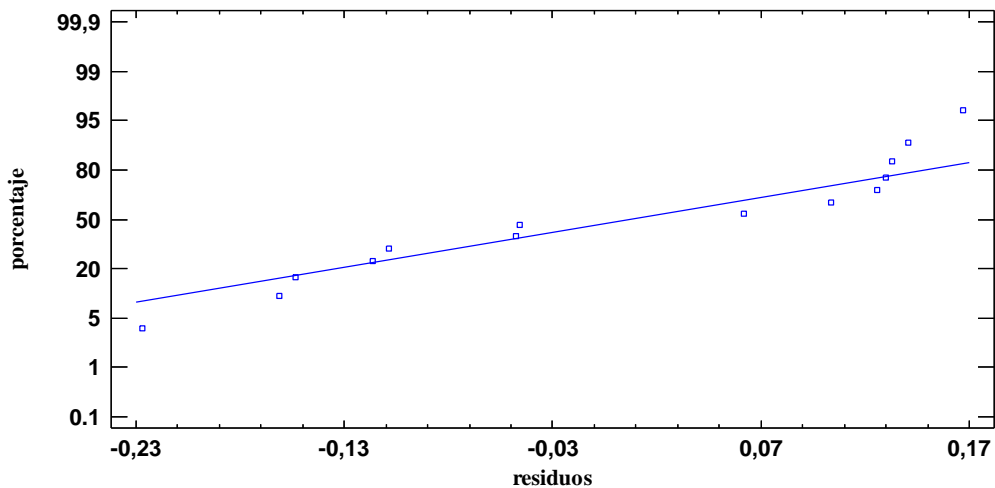


Figura C-1. Gráfica de Probabilidad Normal para Residuos para FPasa. (Fuente: Esta investigación)

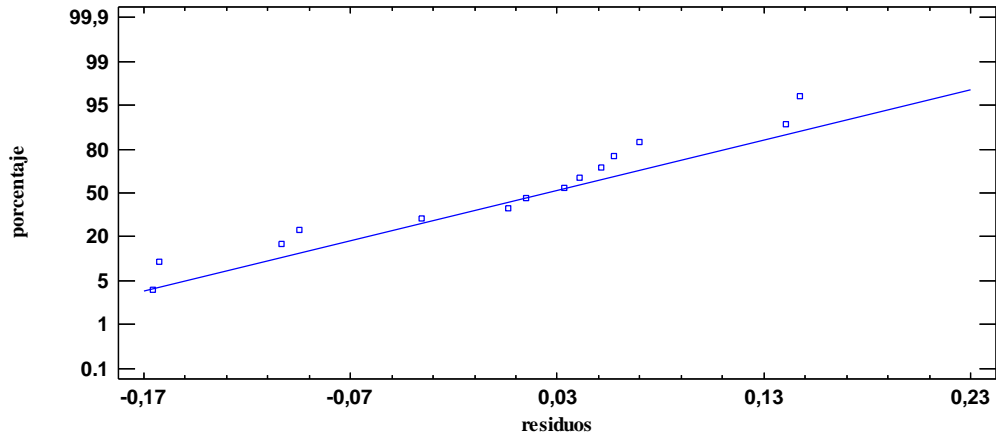


Figura C-2. Gráfica de Probabilidad Normal para Residuos para CMCasa. (Fuente: Esta investigación)

Supuesto de homocedasticidad: En la Figura C-3 y C-4. La grafica de los residuos en función de los valores predichos, no apreciamos tendencia clara en este gráfico tanto para FPasa como para CMCasa, los residuos no presentan estructura definida respecto de los valores predichos por el modelo por lo que no debemos rechazar la hipótesis de homocedasticidad.

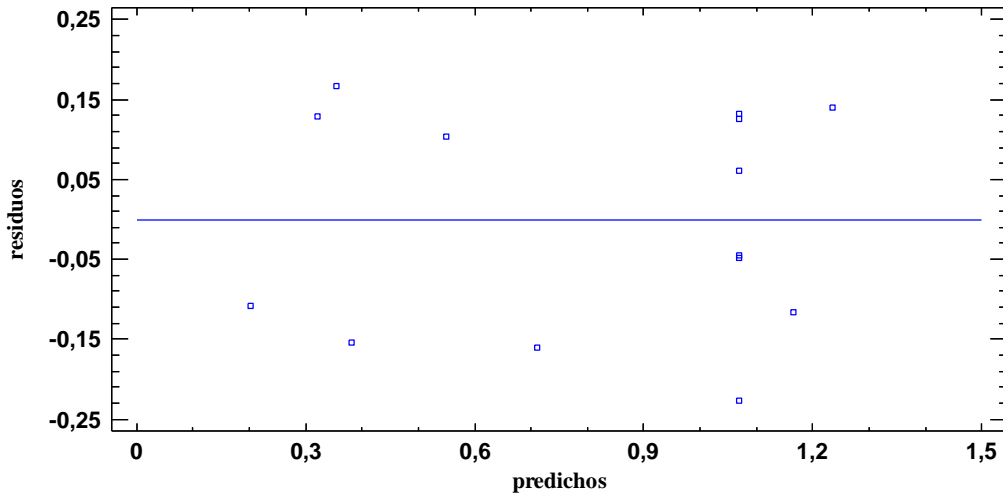


Figura C-3. Gráfica de Residuos para FPasa. Elaboración propia

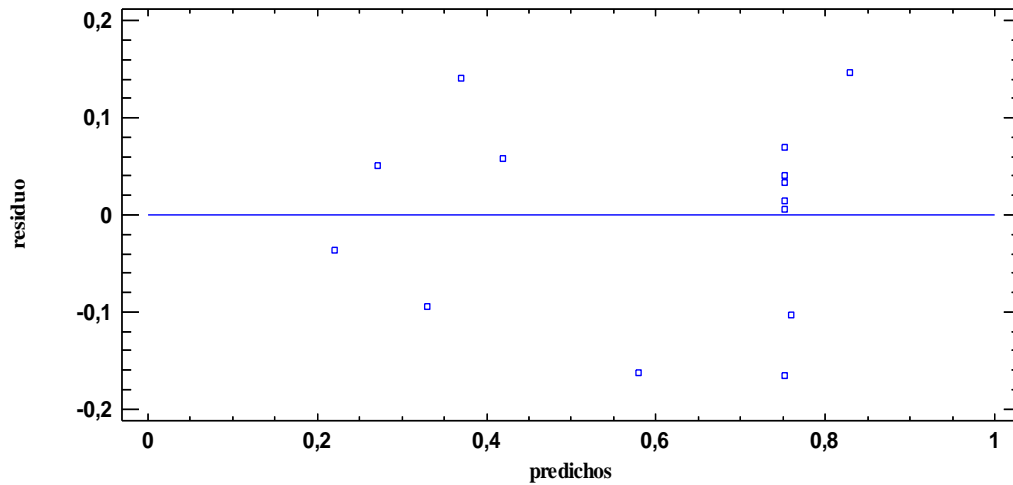


Figura C-4. Gráfica de Residuos para CMCasa. (Fuente: Esta investigación)

Supuesto de independencia: En la Figura C-5 y C6, la gráfica de los residuales frente al orden de ejecución para FPasa y CMCasa se puede establecer que los errores aleatorios son independientes ya que los puntos están distribuidos de manera aleatoria alrededor de la línea, es decir, que no existe patrón alguno, lo cual indica que los errores experimentales no dependen del orden en que se realizaron los experimentos

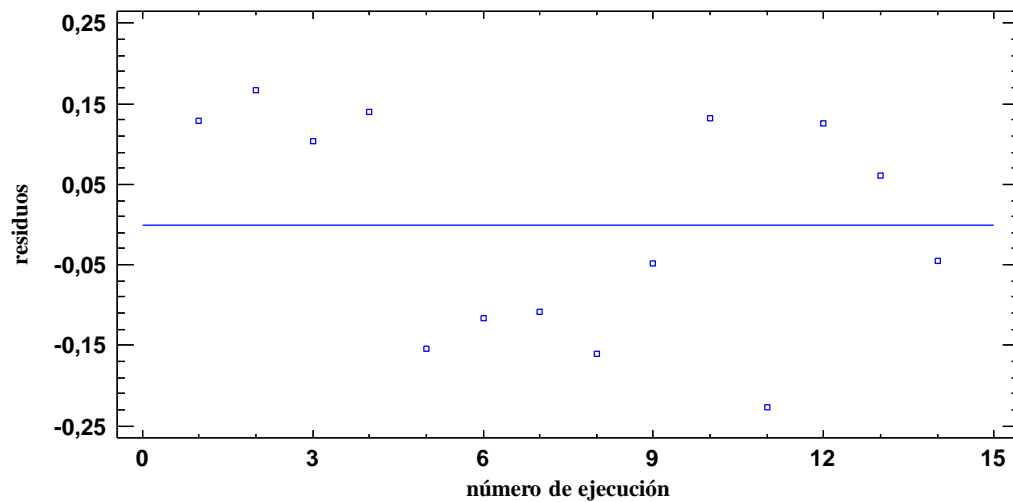


Figura C-5. Gráfica de Residuos frente al orden de ejecución para FPasa. (Fuente: Esta investigación)

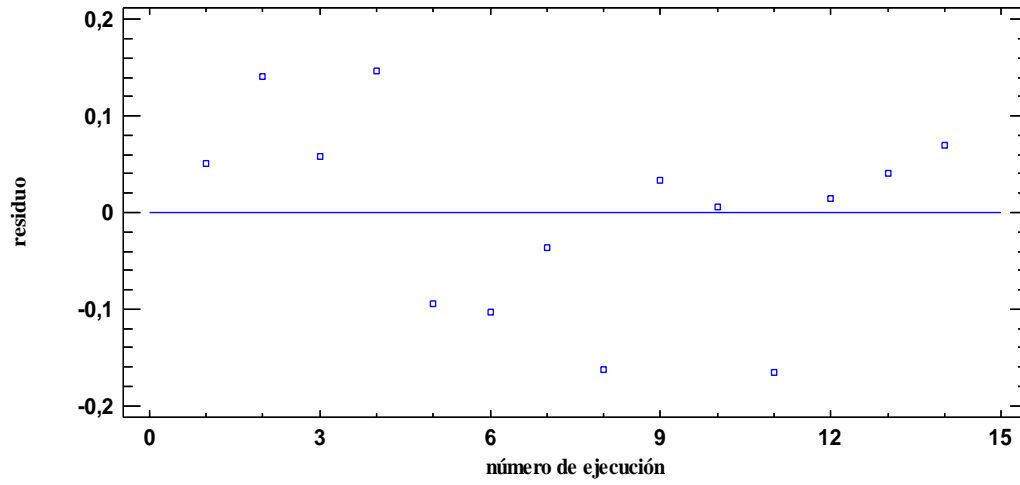


Figura C-6. Gráfica de Residuos frente al orden de ejecución para CMCasa. (Fuente: Esta investigación)