

VALORACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE RESIDUOS AGRÍCOLAS Y AGROINDUSTRIALES



UNIVERSIDAD DE
SAN BUENAVENTURA
CALI

CARLOS DAVID GRANDE TOVAR

2016



Valoración biotecnológica
de residuos agrícolas y agroindustriales



**UNIVERSIDAD DE
SAN BUENAVENTURA
CALI**

*Valoración biotecnológica
de residuos agrícolas
y agroindustriales*

Carlos David Grande Tovar

2016

Grande Tovar, Carlos David

Valoración biotecnológica de residuos agrícolas y agroindustriales / Carlos David Grande Tovar.-Cali: Editorial Bonaventuriana, 2016

180 p.

ISBN: 978-958-8785-81-3

1. Conversión de residuos agroindustriales 2. Biotecnología agrícola 3. Aprovechamiento de residuos 4. Tratamiento de residuos 5. Procesamiento de residuos 6. Residuos agrícolas 7. Residuos sólidos 8. Uva - Productos derivado 9. Yuca - Productos derivados 10. Caña de azúcar - Productos derivados 11. Residuos orgánicos 12. Fermentación 13. Biocombustibles 14. Ensilaje I. Tít.

628.4458 (D23)

G751v

© Universidad de San Buenaventura Cali
 Editorial Bonaventuriana

Valoración biotecnológica de residuos agrícolas y agroindustriales

© Carlos David Grande Tovar
Grupo de investigación: Biotecnología
Programa de Investigación Agroindustrial
Facultad de Ingeniería
Universidad de San Buenaventura Cali

Universidad de San Buenaventura
Colombia

© Editorial Bonaventuriana, 2016
Universidad de San Buenaventura
Dirección Editorial de Cali
Calle 117 No. 11 A 62
PBX: 57 (1) 520 02 99 – 57 (2) 318 22 00 – 488 22 22
e-mail: editorial.bonaventuriana@usb.edu.co
www.editorialbonaventuriana.edu.co
Colombia, Suramérica

Los autores son responsables del contenido de la presente obra.
Prohibida la reproducción total o parcial de este libro por cualquier medio, sin permiso escrito de la Editorial Bonaventuriana.

© Derechos reservados de la Universidad de San Buenaventura.

ISBN: 978-958-8785-81-3

Tiraje: 150 ejemplares

Cumplido el depósito legal (ley 44 de 1993, decreto 460 de 1995 y decreto 358 de 2000)

2016

Contenido

Prefacio	9
Los residuos agroindustriales en procesos biotecnológicos.....	13
Introducción	13
Procesos de fermentación y biocatálisis para la valorización de subproductos agroindustriales.....	19
Residuos agroindustriales utilizados como materia prima para la producción fermentativa de metabolitos	22
<i>Residuos del procesamiento de frutas.....</i>	<i>23</i>
<i>Residuos de la industria del trigo y del arroz</i>	<i>27</i>
<i>Residuos de la industria de la yuca (cassava)</i>	<i>30</i>
<i>Residuos de la industria vinícola</i>	<i>33</i>
<i>Residuos de la industria de la caña de azúcar</i>	<i>36</i>
<i>Residuos agroindustriales como materia prima para la producción de metabolitos secundarios.....</i>	<i>42</i>
Perspectivas.....	44
Acondicionamiento previo de los residuos agroindustriales para procesos fermentativos.....	45
Introducción	45
Diferentes tipos de residuos agroindustriales.....	47
<i>Residuos secos.....</i>	<i>47</i>
<i>Residuos húmedos</i>	<i>47</i>
Composición de los residuos agroindustriales alimentarios.....	48

Pretratamiento de los residuos.....	53
<i>Pretratamientos físicos</i>	54
<i>Pretratamientos químicos</i>	58
<i>Pretratamientos biológicos</i>	61
Enriquecimiento proteico a partir de residuos agroindustriales	63
Introducción	63
Ensilaje	65
Residuos de pesqueras.....	67
Proteína unicelular.....	70
Obtención de péptidos con capacidad antimicrobiana a partir del aprovechamiento de suero de leche y harina de chachafruto (<i>Erythrina edulis</i>).....	71
Conclusiones y perspectivas.....	80
Valorización de subproductos a partir de la fermentación en estado sólido	81
Introducción	81
Fermentación en estado sólido	83
<i>Sustratos</i>	87
<i>Microorganismos</i>	90
Productos a partir de la SSF	92
<i>Ácidos orgánicos</i>	92
<i>Enzimas</i>	96
<i>Biopolímeros</i>	104
<i>Pigmentos</i>	106
<i>Saborizantes y aromatizantes</i>	111
<i>Metabolitos secundarios</i>	116
<i>Biofertilizantes y biopesticidas</i>	122
<i>Biosurfactantes</i>	123
Bioprocesos	124
<i>Biorremediación</i>	124

<i>Biodesignificación</i>	126
<i>Biodetoxificación</i>	129
Tipos de reactores en la SSF.....	131
<i>Biorreactores de bandeja</i>	133
<i>Biorreactores de tambor</i>	133
<i>Biorreactores de lecho fijo</i>	134
Conclusiones y perspectivas.....	135
Bibliografía	137

Prefacio

La población mundial se está incrementando a un ritmo exponencial y a la par con ello lo hace su necesidad de alimentación, medicamentos, vivienda, servicios básicos, energía y muchas otras que requieren especial atención. Adicionalmente, con el crecimiento demográfico aumentará drásticamente en los próximos años la producción de residuos provenientes de cultivos, transformaciones de productos hortofrutícolas, de alimentación animal y de las grandes ciudades.

Según la ONU, para el 2013 la población mundial era de 7.200 millones de personas. Se calcula que en el 2050 alcanzará los 9.600 millones y a comienzos del próximo siglo la cifra podría llegar a los 16.600 millones (Grande, 2014). Este fenómeno sin duda generará problemas enormes relacionados con la contaminación por residuos orgánicos e inorgánicos que requieren una solución urgente encaminada a su tratamiento y adecuada disposición final de los residuos, especialmente aquellos provenientes de la industria alimentaria y de la agricultura.

En el pasado, los residuos orgánicos provenientes de la cosecha de cultivos eran utilizados por los campesinos como abono en las granjas. Sin embargo, la tecnificación de los cultivos y de la actividad agrícola, la aparición de maquinaria y el uso de agroquímicos y pesticidas, hicieron que la producción de alimentos se desbocara y de manera concomitante la polución (producción de mayores volúmenes de efluentes, follaje, residuos sólidos, etc.) que amenazaba directamente la salud pública y la sostenibilidad ambiental en el mundo, razón por la cual se hizo preponderante llevar a cabo tratamientos más elaborados para estos grandes volúmenes de residuos.

Esto obliga a investigadores, científicos, profesionales, productores e ingenieros a unirse en busca de soluciones a la amenaza pública y ambiental que se presenta. Hoy en día se han concebido numerosas aplicaciones –y algunas, incluso, se han escalado– para el tratamiento de los residuos generados en la actividad agroindustrial. Estos son ricos en materia orgánica, especialmente en contenido lignocelulósico, ácidos orgánicos, carbohidratos y proteínas, razón por la cual se

ha planteado la posibilidad de obtener de ellos energía, metabolitos secundarios de interés como vitaminas, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos volátiles, concentrados para animales, abonos, fertilizantes naturales, colorantes, enzimas y etanol, entre otros, que han permitido establecer un nuevo horizonte para estas “materias primas” económicas (Aggelopoulos *et al.*, 2014).

Sin embargo, estas aplicaciones requieren en su mayoría, procesos de transformación y adecuación de las materias primas mediante reacciones químicas o enzimáticas. En ese sentido, la biotecnología cobra interés, dado que ofrece alternativas viables para la transformación de este material lignocelulósico (biomasa) en otras sustancias e incluso en energía. Se abre, entonces, un nuevo panorama de la investigación y la ingeniería basado en la biotecnología de los residuos agroindustriales, materia básica de este libro y que forma parte de la serie “aprovechamiento de residuos agroindustriales”.

Tema este de gran interés por cuanto supone procesos amigables con el medioambiente y busca crear conciencia en las personas y en la sociedad en general. Sin embargo, en países como el nuestro con economías emergentes y una megadiversidad de recursos naturales, especialmente de microorganismos como hongos, bacterias y levaduras, cuya aplicación industrial puede representar un importante nicho de mercado y un impulso para estas economías, el uso y explotación responsable de esta y de otras áreas de la biotecnología no se puede aprovechar debido a la gran brecha científica y tecnológica que se presenta frente a países desarrollados, a lo que se añade la ausencia de conocimiento en relación con este tipo de mercados y el nulo establecimiento y operación de industrias basadas en este tipo de tecnología (Castellanos, Ramírez, y Montañez, 2006). Esto resulta en una amenaza directa a la economía de la nación frente a otros países que sí están aplicando la biotecnología para el crecimiento y desarrollo de sus economías, y en la generación de inequidades sociales que se traducen en más pobreza.

Por otra parte, al adecuar una materia orgánica producto de una actividad agroindustrial determinada sin beneficio aparente en dicho proceso, se genera valor agregado, pues se parte de materias primas de valor bajo y se transforman en productos de mayor valor, muchas veces mediante transformaciones sencillas y de poca inversión. Asimismo, se disminuye el estrés ambiental al reducir la disposición impropia de materia orgánica que al descomponerse sin los procesos adecuados y en lugares indebidos genera problemas de polución.

En Colombia, el volumen de residuos sólidos alcanza las 10.000 millones de toneladas por año, de las cuales el 77 % son urbanas y en menor proporción

corresponden a actividades industriales. La disposición final de estos residuos se da principalmente en ríos y campos abiertos (50 %), un 40 % es ubicado en rellenos sanitarios y un 10 % es reciclado (Contreras, 2006). Esto demuestra que un gran potencial de aprovechamiento se está desperdiciando por cuenta de la mala disposición de la materia prima final.

En este libro se pretende introducir al lector en algunas aplicaciones biotecnológicas para el aprovechamiento de residuos agroindustriales, como son las fermentaciones en estado sólido, los ensilajes y la generación de proteína unicelular, entre otras. Igualmente, es su objetivo presentar algunas investigaciones que sobre este importante asunto se han llevado a cabo con el fin de familiarizar al interesado en estos ámbitos y darle a conocer el amplio panorama que este tipo de procesamiento presenta.

El libro está organizado en cuatro capítulos. El primero es una introducción a la aplicación de procesos biotecnológicos para la valorización de los subproductos agroindustriales y alimentarios. En el segundo se hace un análisis del pretratamiento que se debe llevar a cabo para acondicionar los subproductos, principalmente de tipo lignocelulósico, por métodos fermentativos con ayuda de microorganismos, y se estudia la composición química de estos subproductos. El tercer capítulo describe los procesos de aprovechamiento conocidos y popularizados en todo el mundo en granjas y fincas, como el ensilaje y la producción de proteína unicelular. Finalmente, el capítulo cuatro da cuenta del proceso de fermentación en sustratos sólidos, sus principales condiciones, los microorganismos, los productos generados y los reactores, así como de los procedimientos descritos por múltiples autores, especialmente aquellos considerados clave para el entendimiento de estos procesos, los que a su vez podrían ser aplicados en otros procesos de aprovechamiento de residuos agroindustriales.

La idea con el presente libro es revisar las principales innovaciones científicas y tecnológicas para el aprovechamiento de los principales residuos generados en el mundo, al tiempo que se intenta crear conciencia e incentivar a los lectores a ahondar en la literatura conexas con los casos presentados de una manera más detallada, con el fin de proceder a su implementación en proyectos de investigación científica y tecnológica.

El autor espera contribuir con una revisión de la literatura más reciente en relación con la temática a la fecha de escritura y motivar a los estudiantes del curso de Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales a buscar otras aplicaciones y soluciones a la problemática en Colombia y en la región.

Los residuos agroindustriales en procesos biotecnológicos

*Si sirves a la naturaleza,
ella te servirá a ti.*

CONFUCIO

Introducción

El perfeccionamiento histórico del hombre trajo consigo el aumento en la generación de residuos de toda clase y con ello diferentes tipos de enfermedades y males debido a su inadecuada forma de disposición y vertimiento. En la fase de cazador-recolector (período paleolítico) el ser humano era nómada, su expectativa de vida era baja (no mayor de veinte años) y se alimentaba de lo que cazaba o recolectaba. Los residuos de los alimentos eran dejados en el camino sin ningún tratamiento, pero al tratarse de residuos orgánicos se descomponían y su bajo volumen no representaba peligro alguno. Con el descubrimiento de la agricultura hace unos cinco mil años se entra al periodo Neolítico y tiene lugar la revolución agrícola. Ello le permitió dejar atrás el nomadismo para darle paso al sedentarismo y asentarse en diferentes territorios, lo que abrió las puertas al aumento de la población y aumentó en mucho la expectativa de vida. Los residuos generados, aunque en mayor volumen, eran en su mayoría orgánicos y fácilmente se integraban a los diversos ciclos de la naturaleza sin daño al medioambiente.

La Edad de los Metales (Edad de Cobre, Edad de Bronce y Edad de Hierro) trae consigo la revolución tecnológica para muchos pueblos. Las guerras, las enfermedades y el incremento de la explosión demográfica traen como consecuencia un aumento considerable en el volumen de producción de residuos, los cuales eran dispuestos sin ningún tipo de cuidado en cloacas o a campo abierto. Ello originó en las comunidades una preocupación real por implementar sistemas de gestión de residuos que permitieran frenar la propagación de enfermedades y la contaminación del medio circundante.

Figura 1
Revolución agrícola (Neolítico)



Fuente: www.historiasimple.com

Muchas fueron las enfermedades que se originaron y propagaron gracias a las malas prácticas de higiene y a la gestión inadecuada de residuos. Entre ellas se tienen la fiebre tifoidea, la peste negra y la fiebre amarilla, entre otras, cuyos efectos fueron tan devastadores que llegaron a reducir la población mundial a la mitad (Mendoza e Izquierdo, 2007).

Figura 2
La peste negra en la Edad Media.



Fuente: blogsinquersaber.blogspot.com

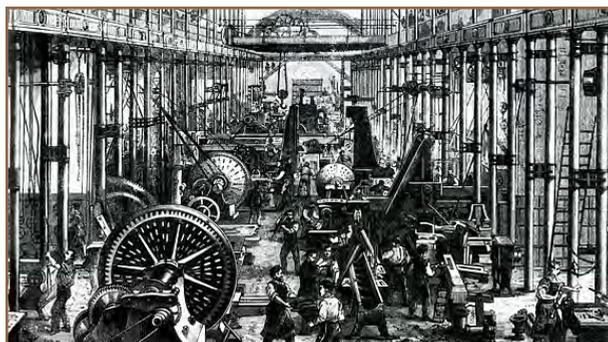
En la medida en que aumentó la población lo hicieron la generación de residuos, y su complejidad, lo que se tradujo en múltiples problemas descritos en nume-

rosos textos y fuentes bibliográficas, entre las que se cuenta la cultura romana. Uno de los grandes avances producto de la creciente preocupación por la mala disposición de los residuos fue la introducción por las culturas griegas y romanas del alcantarillado en la Europa mediterránea (Mendoza e Izquierdo, 2007).

Siglos más tarde, la Revolución Industrial del siglo XIX significó un aumento descontrolado e insostenible de los residuos y una difícil eliminación y tratamiento (Mendoza e Izquierdo, 2007). Los principales problemas relacionados con esta fase del desarrollo fueron el vertimiento incontrolado de aguas residuales, la acumulación de basuras y el desabastecimiento de agua potable, lo que ocasionó aún más enfermedades de las ya padecidas habitualmente, como el cólera y las mencionadas anteriormente.

Este proceso de transformación devino en una explotación irracional de los recursos naturales, degradación y disminución de los recursos hídricos, deforestación de bosques y paisajes y erosión de suelos y aguas subterráneas que afecta la sostenibilidad del medioambiente y sus ecosistemas. Ante tal situación se expidieron normas y leyes en diferentes países para dar una correcta disposición de residuos y un manejo adecuado de los recursos naturales e hídricos.

Figura 3
Revolución Industrial (siglo XIX)



Fuente: es.wikipedia.org

Sin embargo, el progreso tecnológico desmedido y acelerado trajo nuevos materiales sintéticos no degradables que acrecentaron los problemas de contaminación, muchos de ellos no resueltos hasta el día de hoy. En este sentido, los gobiernos de todos los países han trazado diferentes políticas que intentan mejorar el manejo, la gestión y el vertido de los diferentes residuos generados, con el fin de disminuir el impacto ambiental y aumentar la disposición de los recursos naturales.

Actualmente, la dependencia del petróleo y sus derivados, especialmente en aquellos países cuyas economías están creciendo de manera exponencial, ha hecho que tanto la demanda de este recurso como el precio por barril se hayan elevado a niveles casi insostenibles. Otro problema grave consecuencia del consumo excesivo de combustibles fósiles ha sido el aumento en los índices de polución, lo cual afecta directamente la salud mundial así como la fauna y la flora silvestres (Ballesteros I, 2006).

Según los expertos, las reservas de petróleo se agotarán prontamente ya que la demanda por el crudo se ha disparado con el crecimiento de la población. El petróleo es un recurso no renovable, por lo cual, una vez agotado no habrá marcha atrás. En ese sentido, la búsqueda de fuentes alternativas de energía es vital para evitar una crisis mundial que traiga hambre, guerra y escasez al mundo. Por otra parte, muchos productos químicos fundamentales en los procesos de manufactura e industriales son obtenidos a partir del petróleo, por lo cual si no se toman cartas en el asunto, su escasez traería consecuencias fatales para la estabilidad económica de estas empresas.

Esto ha impulsado una búsqueda incansable por nuevas fuentes de energía y de productos químicos o sustitutos renovables de forma que se pueda garantizar su disponibilidad. Entre las múltiples posibilidades que se han explorado se encuentran la energía eólica, la energía hídrica, la energía solar y la energía proveniente del procesamiento de la biomasa o bioenergía, la cual comprende la energía producida por el proceso de combustión de la biomasa o por la combustión posterior de productos obtenidos a partir de la transformación de la biomasa. La biomasa es la fuente más abundante de material lignocelulósico en el mundo y puede ser aprovechada para la producción de energía por tratarse de una fuente natural renovable. Según la Agencia Internacional de Energía (IEA), la biomasa puede satisfacer hasta el 50 % del total de la demanda energética del mundo en el siglo XXI así como también la de otros productos químicos como polímeros, solventes y ácidos, entre otros, que hoy en día son obtenidos a partir de los combustibles fósiles (Singh Nee Nigam y Pandey, 2009a).

Las características de los residuos agroindustriales dependen de la fuente que los genera y su contenido general se basa en lignina, celulosa, hemicelulosa, pectina y almidón. Estos residuos provienen generalmente de hojas y tallos de maíz, tallos y vainas de sorgo, puntas y hojas de caña de azúcar, cáscaras de algodón y frijón y del procesamiento poscosecha, como bagazo de caña de azúcar, mazorcas y olotes, pulpa de café y corteza de la yuca, entre otros.

La cantidad de residuos producidos las agroindustrias en el mundo es alarmante. Por ejemplo, la industria del aceite de palma solo usa el 9 % del grano y el resto

se desecha como residuo. La del café solo usa un 9,5 % del grano y la industria del papel utiliza menos del 30 %. Por tal motivo, han aparecido nuevas formas de utilizar los residuos sin que tengan que ser descartados. En algunos casos se “reutiliza” un producto; es decir se emplea de nuevo para el mismo fin para el cual fue diseñado; en otros se “recicla” o transforma dentro del mismo proceso productivo u otro proceso, como compostaje o digestión anaeróbica, y más recientemente se “valorizan”, lo que le permite generar valor agregado mediante una pequeña transformación sin afectar la salud humana o el medioambiente (Casco y Moral, 2011).

Recientemente, el precio de muchos productos alimentarios se ha elevado de manera notable en virtud de la competencia con la producción de biocombustibles como el biodiésel, el cual se produce a partir del aceite de semillas oleaginosas como la soya, la canola y la palma, y el etanol a partir de la fermentación de azúcares derivados del almidón de yuca, la papa, el arroz y otros cereales. Esta situación es, sin duda, negativa si se tiene en cuenta que la tecnificación de los cultivos y un adecuado control de plagas aumentan el rendimiento de los cultivos y disminuyen su precio de producción. Sin embargo, la competencia por la producción de biocombustibles, el cambio en las costumbres alimentarias en la población de economías emergentes como la china y la india, el aumento en el precio del aceite, los desastres naturales y el cambio del clima en el mundo, son factores que han generado un incremento en el precio de los alimentos a nivel mundial. En ese sentido, es importante hallar soluciones a corto plazo para frenar este encarecimiento y la búsqueda de fuentes alternativas para la producción de biocombustibles y productos químicos podría ser una de ellas. Las plantas modificadas genéticamente y los residuos agroindustriales ricos en material lignocelulósico, carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos orgánicos, entre otros, son fuentes alternativas para no utilizar productos alimentarios en la producción de biocombustibles (Zhang, 2008).

Actualmente, muchos azúcares, almidones, aminoácidos y biopolímeros como los polihidroxialcanoatos (PHA) obtenidos mediante procesos de refinería a partir de cultivos de arroz, caña de azúcar, papa y yuca, se utilizan para la producción de biocombustibles como el etanol y más recientemente como fuente de moléculas y metabolitos de alto interés industrial.

Sin embargo, esta tecnología es muy joven y tiene poco desarrollo comparada con otras formas de producción, por lo cual requiere mayor tecnificación, ajuste de políticas y un cuerpo normativo para su regulación. Por otra parte es una industria atractiva por cuanto el valor de las materias primas es económico y su disponibilidad es alta. Según el Departamento de Energía de los Estados Unidos,

en ese país se producen 500 millones de toneladas al año a un costo que oscila entre los veinte y los cincuenta dólares por tonelada.

Actualmente se llevan a cabo en el mundo programas orientados a valorizar los aceites de frituras para la producción de biodiésel. Es así como la cadena de restaurantes McDonald's, lidera proyectos en Austria para recuperar los aceites (alrededor de 1100 toneladas) producidos en más de 135 cadenas ubicadas en ese país, con miras a abastecer de combustible el transporte público de la ciudad de Graz (Herrera y Vélez, 2008).

Entre los residuos especialmente valorados se encuentran los lignocelulósicos, que incluyen el serrín, las virutas de madera, diferentes plantas, hierbas y el bagazo de caña. Estos residuos son económicos, altamente disponibles y de fácil procesamiento para la producción de etanol (Nibedita Sarkar, 2012).

El uso de estos residuos presenta ventajas y desventajas. Entre las primeras se cuentan mayor combustión y menor emisión de residuos y mayor número de empleos en el campo. Entre las segundas se tiene un consumo masivo, pues el etanol tiene un menor poder calorífico frente al petróleo y genera mayores emisiones de aldehídos. Por otra parte, la competencia con productos como el maíz y la caña de azúcar si bien genera su encarecimiento favorece la aplicación de esta tecnología de recuperación de residuos.

En Colombia, solo se han llevado a cabo experimentos en el laboratorio. Aún no se aplican tecnologías a gran escala acompañadas de un programa serio de recuperación de aceites para ser utilizado en motores. Es preocupante la falta de opciones en este sentido, sobre todo si se tiene en cuenta que hoy en día se aplica con más fuerza el concepto de economía circular, que pretende impulsar los procesos ecoambientalmente compatibles que utilizan los residuos de un proceso industrial en otro como materias primas, de forma que se constituyan economías con producción cero de residuos y desechos, ello en el marco de un desarrollo que se conoce como simbiosis industrial.

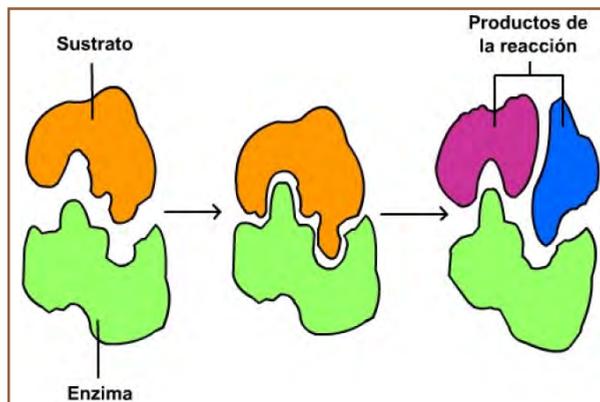
El sector agroalimentario genera cantidades enormes de residuos, cuya mala disposición se traduce en malos olores y problemas de salud serios, mientras se desperdician materias primas valiosas para la producción de compuestos y partes con alto valor agregado. Por lo tanto, se constituye en una opción para explorar.

Procesos de fermentación y biocatálisis para la valorización de subproductos agroindustriales

Tanto los procesos de fermentación como los de biocatálisis son una fuente inagotable de compuestos químicos, como solventes, aditivos alimentarios, enzimas, agroquímicos y biofármacos –que en ocasiones no pueden ser obtenidos por otros medios–, lo cual se lleva a cabo mediante la utilización de microorganismos como microalgas, bacterias, hongos y levaduras. En otros procesos se utilizan enzimas o incluso bacterias que se inmovilizan sobre superficies sólidas para facilitar la reacción de producción de compuestos enantioselectivos o regioselectivos. Esto representa una gran ventaja en términos de transformación de productos especialmente en la industria alimentaria y farmacéutica, en la cual uno de los compuestos enantiómeros presenta la actividad biológica deseada, pues el otro podría ser tóxico. Otro aspecto importante consiste en que estos productos exhiben biodegradabilidad, por lo cual son ambientalmente amigables. Esto significa que los residuos agroindustriales deben ser considerados seriamente como fuente importante de moléculas de alto valor agregado gracias al empleo de procesos fermentativos y de biocatálisis, que ayudan a la producción de moléculas quirales y biodegradables.

La biocatálisis es el proceso mediante el cual se transforman materias primas en productos. Es mediado por enzimas en ocasiones aisladas o dentro de las células que las contienen (Figura 4).

Figura 4
Catálisis enzimática o biocatálisis



Entre las prácticas ancestrales de preservación de alimentos tanto a nivel casero como industrial se encuentra la fermentación. El proceso se lleva a cabo con base en materias primas derivadas de plantas o animales, en conjunto con microorganismos como bacterias, hongos o levaduras presentes en los alimentos o introducidas por el hombre intencionalmente, las cuales bajo condiciones adecuadas de temperatura y concentración de oxígeno, llevan a cabo el proceso de transformación de unas moléculas en otras. La fermentación de los alimentos mediada por microorganismos es un proceso conocido desde épocas antiguas, del que se hacía uso para la producción de cerveza, vino y pan.

El proceso de fermentación mejora el contenido de los alimentos y su factor nutritivo al aumentar su contenido proteico y de otros nutrientes, así como optimizar sus propiedades organolépticas como el aroma, el sabor y la textura, al tiempo que permite su preservación en condiciones ambientales.

Muchos productos alimentarios se generan a partir de la fermentación de materias primas, entre los que se tienen los de panadería como el pan y los bizcochos, productos alcohólicos como el vino y la cerveza, y otros como levaduras, quesos, yogures, enzimas microbianas, vitaminas, ácidos orgánicos, aditivos nutricionales y aminoácidos (figuras 5, 6, 7 y 8). Por otra parte, diversos productos alimentarios conllevan procesos de fermentación, como son la producción de café, té y chocolate. En el caso del té negro, su producción se basa en un proceso de fermentación mediado por enzimas oxidativas que ayudan a mejorar su color y aroma. Estos productos son típicos de cada lugar, pues varían de acuerdo con las condiciones climáticas, las prácticas culturales y de consumo, el contenido nutricional de las materias primas y la disponibilidad de los microorganismos (Nout y Motarjemi, 1997).

Figura 5
Yogurt fermentado



Fuente: www.saluddiaria.com

Figura 6
Vino de uva



Fuente: archivo.e-consulta.com

Figura 7
Hoja de té negro fermentado



Fuente: www.naturalalternativa.net

Figura 8
Distintos tipos de cerveza



Fuente: canaelsalvador.wordpress.com

Residuos agroindustriales utilizados como materia prima para la producción fermentativa de metabolitos

Las principales fuentes de carbono, nitrógeno, macro y micro nutrientes son los cereales y leguminosas, así como residuos de cosechas y demás. Los residuos animales son poco empleados en comparación con los residuos de cosechas y plantas debido a su mayor posibilidad de contaminación microbiana (Dahod, 1999).

Como sustrato para los procesos de fermentación se encuentran los residuos de las cosechas de cereales, los provenientes de la obtención del aceite de semillas, de raíces y tubérculos, de la producción de caña de azúcar, de café, té y chocolate, de las especias y picantes, de frutas y vegetales, de productos de panadería y de confecciones, de bebidas alcohólicas y de productos de la madera.

Los residuos agroindustriales son sustratos adecuados para la producción de enzimas, con gran aplicación en las industrias alimentaria, manufacturera, cosmética y farmacéutica, entre otras. Entre las enzimas más importantes producidas a partir de estas materias primas se encuentran las hemicelulasas, las celulasas, las pectinasas y las xilanasas, las cuales tienen un amplio espectro de aplicación.

El residuo de la industria henequenera en la península de Yucatán, ha sido ampliamente estudiado. Se ha comprobado su utilidad en la producción de cepas de *Aspergillus sp.* en suelos donde por años se enterraron residuos de pulpa de henequén ricos en pectinasa, con una alta actividad pectinolítica mucho mayor a la de *Aspergillus niger* de colección (Huitrón, 1984).

En otra investigación, a partir de una fermentación sólida de residuos de pulpa de uva con una cepa de *Aspergillus awamori*, el grupo de Botella (Botella, 2005) obtuvo una mezcla de enzimas (celulasas, xilanasas y pectinasas) con aplicación en alimentos, textiles y química.

Castilho y colaboradores (Castilho, 2000) obtuvieron pectinasas a partir de fermentaciones sólidas de residuos de soya y salvado de trigo mediadas por *Aspergillus niger*, las cuales se aplicaron en industrias como jugos concentrados, extracción de aceites, pigmentos vegetales y obtención de celulosa.

Utilizando como materias primas bagazo de caña y residuos de avena y de mazorca se produjeron en laboratorio enzimas xilanolíticas mediante una fermentación sumergida y en presencia de *Penicillium janthinellum*, las cuales fueron utilizadas en procesos de blanqueo de papel, procesamiento de alimentos de ave de corral, fabricación de pastas y harina de trigo (Oliveira, 2006).

En la industria de los detergentes se encuentra disponible una queratinasa producida a partir de la fermentación sólida de residuos de plumas de gallina, utilizando una cepa de *Bacillus subtilis* (Sudhir, et al., 2009).

Otras enzimas producidas para ser utilizadas en las industrias papelera, textil y alimentaria son las proteasas, generadas en la fermentación sólida con cepas de *Aspergillus oryzae* de residuos de la extracción de aceite de *Jatropha curcas* (Thanapimmentha, 2012).

Por otra parte, cepas de *Gluconacetobacter swingsii* se utilizaron para producir celulosa para la industria química mediante una fermentación sólida de residuos de caña y piña (Castro, 2011).

Otra investigación interesante fue la que llevaron a cabo López et al. (2010), para producir plaguicidas a escala piloto para cultivos de melón, a partir del aprovechamiento de residuos de cítricos y su industrialización. Para ello se utilizó una cepa de *Trichoderma harzianum* T-78.

Las enzimas con importancia en la degradación de lignina, específicamente manganeso peroxidasas, han sido producidas a partir de la fermentación sólida de residuos de eucalipto con *Lentinula edodes* (Arantes, 2011).

Otros ejemplos y revisiones al respecto se hallan en la literatura. Estos trabajos permiten visualizar el potencial de aprovechamiento que los residuos de las actividades de agroindustrialización y agricultura ofrecen, además de los bio-combustibles y bioenergéticos, también de mucha importancia.

Es interesante hacer un análisis de las posibilidades que como sustratos ofrecen diferentes fuentes o materias primas residuos de numerosos procesos. Muchas fuentes de carbono y nitrógeno son plantas y derivados de plantas, aunque también las hay de origen animal, que tienden a ser reemplazadas dado el peligro que encierran como transmisores de enfermedades.

Residuos del procesamiento de frutas

La producción de carbohidratos se estima en 4×10^7 toneladas por año (Vandamme, 2009). Estos, como se sabe, son la principal fuente de carbono para proporcionar energía a los microorganismos encargados de los procesos de fermentación de hexosas y pentosas. El licor es el principal residuo que se genera en el refinamiento del azúcar de caña o de remolacha para separarlo de la sacarosa cristalizada. Es, además, una fuente importante de nitrógeno, minerales, vitaminas y factores de crecimiento (de naturaleza proteica); sin embargo, su composición está indefinida y estandarizar su producción y pretratamiento

es complicado, aparte de que en ocasiones puede requerir la adición de otros nutrientes para nivelar su composición (Vandamme, 2009).

Muchos países están tomando en serio la posibilidad de utilizar los residuos agrícolas, urbanos y los provenientes de actividades agroindustriales para generar productos con valor agregado, como biocombustibles, ácidos orgánicos, enzimas, compuestos aromáticos, biopolímeros y alimentos fortificados, entre otros. Los residuos del procesamiento de frutas, entre los que se encuentran las pulpas de manzana, naranja y uva, así como la cáscara y las semillas, son utilizados hoy en día para la producción de compuestos con valor agregado.

De acuerdo con estadísticas de la *Food and Agriculture Organization* (FAO), la producción de cítricos en el año 2005 estuvo alrededor de las 95 millones de toneladas métricas (Mamma y Christakopoulos, 2009), siendo España, Italia, Grecia, Egipto, Turquía y Marruecos, responsables por el 20 % de producción, Brasil produce otro 20 %, China es responsable del 16 % y Estados Unidos del 11 %, destacándose estos países como los principales productores a nivel mundial. De estos resultados, 27 millones de toneladas métricas se usan en la producción de jugo y aceites esenciales, a lo cual se añade que la producción estimada de cítricos aumenta anualmente en un 15 % y un 50 % del peso de la fruta fresca es jugo (Grande, 2015).

La producción de jugo genera un total de 13,5 millones de toneladas métricas de residuos en forma de semillas, pulpa, cáscaras y membranas –entre otros–, que corresponden a un 50 % de la fruta fresca. La composición de los cítricos es alta en carbohidratos insolubles, enzimas, flavonoides, azúcares reductores, nitrógeno, aceite esencial, principios amargos, volátiles, pigmentos, vitaminas y minerales, cuya composición varía de acuerdo con las condiciones edafoclimáticas, la especie, la variedad y la etapa de madurez. Los residuos del procesamiento de cítricos generan pectina, fibra, molasas, aceite esencial de la cáscara, aceite de la semilla, D-limoneno, etanol, jugo de pulpa, esencias, limonoides y flavonoides como la hesperidina, la narirutina, la naringina y la eriocitrina. Adicionalmente, se ha observado que las semillas y la cáscara tienen propiedades antioxidantes (Schieber, Stintzing y Carle, 2001).

El procesamiento de la manzana (*Malus* sp., Rosaceae) para la obtención de jugos, gelatinas y derivados, es fuente inagotable de residuos. Su producción asciende a las 54,2 millones de toneladas métricas, de las cuales el 46 % corresponde a China, el 8 % a Estados Unidos y el 5 % a Turquía. Alrededor de 14 millones de toneladas métricas de esta fruta son procesadas (Vendruscolo *et al.*, 2008), cuyo residuo principal es la pulpa (30 % de la fruta fresca) compuesta de

cáscara, semillas, tallos y tejidos. Este residuo es rico en carbohidratos (celulosa, hemicelulosa y lignina); azúcares (glucosa y fructosa y sacarosa), vitaminas, minerales, proteínas, polifenoles y fibra, según el tipo de manzana procesada y la forma como se lleva a cabo el tratamiento (Vendruscolo *et al.*, 2008). Por otro lado, el residuo de mayor importancia que se obtiene del procesamiento de la manzana es la pectina, de alto valor en la industria alimentaria para la producción de geles.

Entre los compuestos más importantes presentes en la pulpa residual de la manzana se encuentran las catequinas, los hidroxicinamatos, los glicósidos floretínicos, los glicósidos quercetínicos y las procianidinas. Gracias al alto contenido de polifenoles presentes especialmente en la cáscara de la manzana, el desarrollo de antioxidantes derivados del procesamiento de esta pomácea es un objetivo prometedor.

La producción de uva (*Vitis vinifera* L.), se tasa en 58 millones de toneladas métricas, con alto impacto en la economía de los países productores, especialmente en lo relacionado con productos derivados, como vinos, jugos y mermeladas. Los principales países productores son Italia (16 %), Francia (12 %), España (10 %) y Estados Unidos (11 %). Por otra parte, el 80 % de la producción total de uva es destinada a la industria vinícola, cuyos residuos, corresponden al 13 % del total de la fruta (pulpa principalmente) (Pinelo, Arnous, y Meyer, 2006).

De la producción de vino se generan semillas, cáscaras y tallos, los cuales en conjunto conforman el residuo semisólido denominado pulpa, rico en alcoholes, ácidos orgánicos, aldehídos, ésteres, pectinas, polifenoles, vitaminas, minerales y azúcares reductores, entre otros. De este residuo se producen alrededor de diez millones de toneladas (Ruberto *et al.*, 2008), con bajo pH y capacidad de inhibir microorganismos por la presencia de compuestos fitotóxicos y antimicrobianos; sin embargo, su aplicación está siempre bajo observación por la capacidad tóxica que generan. De estos residuos se pueden obtener alcoholes, antocianinas, catequinas, glicósidos flavonoides, ácidos fenólicos, tartratos, etanol, ácido cítrico, aceite de semilla, fibra dietaria e hidrocoloides (Schieber *et al.*, 2001).

Los residuos del procesamiento de cítricos, manzana y uvas se han utilizado para la producción de diferentes enzimas (pectinolíticas o pectinasas principalmente), las cuales cobran mucha importancia en la clarificación de jugos, la fermentación de té y café, blanqueamiento de papel, desgomado de fibras, aditivos alimenticios para cerdos, para bebidas alcohólicas, entre otros (Jayani, Saxena y Gupta, 2005).

También los residuos cítricos, de uva y de manzana han sido empleados para la producción de enzimas a partir de fermentaciones sumergidas o sólidas (S. Sharma, Mandhan, y Sharma, 2012; Tsukamoto, Durán, y Tasic, 2013), utilizando bacterias, hongos y levaduras, proceso que será explicado en mayor detalle en el capítulo 4, dedicado a las fermentaciones en estado sólido.

E.coli K011 es una bacteria recombinante utilizada para la fermentación de ácido galacturónico, arabinosa, xilosa y hexosas para la producción de etanol y ácido cítrico a partir de residuos de cítricos (Grohmann, Baldwin y Buslig, 1994). No obstante, para garantizar la fermentación, Grohmann *et al.* (1994), insisten que se debe eliminar el aceite residual de la cáscara ya que al tener un alto contenido de D-limoneno, es un inhibidor del crecimiento de (Wilkins *et al.*, 2007). En algunos casos y gracias a la gran cantidad de residuos cítricos generados en los Estados Unidos, algunos investigadores del Departamento de Agricultura han concluido que la producción de etanol mediada por enzimas hidrolíticas de pectinas (pectinasas), celulosa (celulasas) y hemicelulosa (hemicelulasas) comerciales optimiza el proceso. Esto hizo que se proyectara la construcción de una refinería para la producción de etanol y otros productos con valor agregado a partir de la biomasa (residuos cítricos) disponible.

De los residuos cítricos también se pueden obtener ácidos orgánicos, algunos de gran importancia comercial como el ácido cítrico. Su producción alcanza los ocho millones de toneladas métricas por año, con un incremento anual del 5 %. Algunos investigadores han empleado los residuos cítricos (pulpa) para la producción de ácidos orgánicos en condiciones de fermentación líquida, utilizando cepas de *A. niger*. También en condiciones de fermentación en estado sólido mediante la utilización de pulpa de manzana con el mismo hongo para la producción de ácido cítrico (Shojaosadati y Babaeipour, 2002). Asimismo, Mamma y Christakopoulos (2014) presentaron una revisión detallada de la biotransformación de residuos cítricos en compuestos de alto valor agregado, tales como aceite esencial, pectina, enzimas, proteína unicelular, producción de antioxidantes naturales, etanol, ácidos orgánicos y prebióticos.

Serna y Torres (2014) vislumbraron la posibilidad de utilizar las cáscaras de mango de dos variedades (Tommy y Keitt) como prebióticos y fuentes con alto contenido de fibra dietaria (19,9 % y 22,1 %, respectivamente), gracias a su excelente contenido de fenoles (mayor a 3000 mg/g de m.s.). La materia prima se adecuó mediante un proceso de liofilización para preservar los compuestos antioxidantes, con un contenido de 17 % de materia seca para Keitt y de 18 % para Tommy.

En otra investigación, Duque, Cardona y Moncada (2015) analizaron la producción de etanol a partir de residuos de bagazo de caña de azúcar, tallo de banano, mazorca de maíz, cáscara de arroz, aserrín, residuos de mango, residuos de palma, cáscara de piña, cáscara de plátano y corteza de madera. En el estudio se tuvieron en cuenta el análisis económico y mediambiental, así como la viabilidad técnica. En esta investigación se llevó a cabo la fermentación con *Sacharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis* luego de un pretratamiento ácido y de una hidrólisis enzimática. Los resultados mostraron márgenes de ganancia netos de hasta un 40 % frente a los productos comerciales, una disminución del 39 % del impacto ambiental frente a los procesos existentes y rendimientos de producción entre 0,009 y 0,264 kg de etanol por cada kilogramo de materia prima seca, a un costo de 0,65 dólares por litro de etanol (Grande, 2016).

Un aprovechamiento de residuos de cáscara de piña fue reportado por Fonseca *et al.*, (2011). Consiste en la producción de barras de cereal a partir de estos residuos al utilizarlos en un 13,5 % como jalea incorporada en una barra cereal. La aceptación sensorial por un panel de expertos fue alta: 91 % de velocidad de aceptación y 61 % de intención de compra.

Residuos de la industria del trigo y del arroz

En la producción de cereales como el trigo, el maíz y el arroz, se produce principalmente paja como residuo proveniente de la cosecha (Figura 9). Su aprovechamiento consiste, fundamentalmente, en quemarlo como biocombustible y utilizarlo en compostaje y en la generación de derivados furánicos como el furfural.

Figura 9
Paja de arroz



Fuente: guadalupe.olx.com.pe

Recientemente, se ha despertado un elevado interés por aprovechar la paja de cereales como fuente para la producción de biocombustibles, ya que se considera

que disminuye su costo hasta en un 30 %. Alrededor de un 40 % de los motores de los vehículos que se producen en la actualidad vienen con una ingeniería adaptada para el uso del etanol (Council, 2006).

En la molienda de los cereales se generan el salvado y el germen, los cuales representan una fuente importante de proteína y carbohidratos. Durante la producción de harina se logra remover alrededor del 30 % del grano del cereal con un buen contenido en fibra, vitaminas, minerales, grasa y proteína, provenientes del germen. China es considerada la principal productora de paja de arroz (0,7 billones de toneladas) de un total producido a nivel mundial de 2,9 billones de toneladas (Chen, Yang y Zhang, 2009). La paja es un residuo rico en material lignocelulósico, excelente fuente para la producción de compuestos con valor agregado como ácidos orgánicos, surfactantes, compuestos aromáticos, acetona, etanol, antibióticos, enzimas, aminoácidos, entre otros (Chen *et al.*, 2009).

Este panorama nos muestra que aunque actualmente estos residuos son utilizados para alimentación animal, se podrían aislar y aprovechar la fibra dietaria y la proteína del salvado y del germen para la producción de suplementos alimenticios para el ser humano. Sin embargo, para el tratamiento de residuos como la paja para nutrición animal, se deben desarrollar nuevas tecnologías que reduzcan la cantidad de ceniza y lignina y aumenten el contenido de proteínas y su palatabilidad a fin de facilitar su digestión en cerdos (con un 3 % de digestibilidad) y pollos, que prácticamente no lo puede digerir. Entre las tecnologías disponibles se encuentran el ensilaje y la amonificación de la paja (Chen, Xu, y Li, 2002).

Otra fuente de subproductos de alto valor nutricional es el salvado o cascarilla de arroz que se genera en la molienda del arroz. Se utiliza principalmente en alimentación animal, aunque un buen porcentaje (30 %-40 %) se utiliza para aumentar el valor nutricional del aceite de cocinar, cuyo uso se ha popularizado a nivel mundial. Sin embargo, en su preparación se pierde una buena cantidad del contenido nutricional procedente del salvado, representado en aminoácidos y proteínas. Otro subproducto valioso del refinamiento del aceite de cascarilla de arroz es la pasta de la neutralización con álcali de los ácidos libres. Este subproducto es rico en γ -orizanol, un compuesto que reviste un importante beneficio para la salud como es la reducción de colesterol. El salvado de arroz (Figura 10) es rico en proteínas, aminoácidos, fibra, grasa y antioxidantes, que generalmente se utilizan para enriquecer el contenido nutricional de muchos alimentos para animales. La fibra dietaria desempeña un importante papel en la reducción de la diabetes tipo II y de la presión sanguínea, y constituye un factor de prevención del cáncer intestinal. Su contenido de ácidos grasos libres se utiliza en la preparación de jabones, pinturas y barnices, entre otros productos.

Figura 10
Salvado o cascarilla de arroz



Fuente: www.ison21.es

La fibra dietaria está relacionada con la celulosa, la lignina, la hemicelulosa, la pectina, gomas y otros oligo y polisacáridos que en general resisten la digestión y la absorción en el intestino delgado y se fermentan en el intestino grueso. Los productos para el desayuno denominados *all-bran* están enriquecidos con esta fibra y son importantes fuentes de este compuesto para el ser humano (Figura 11).

Figura 11
Fibra dietaria tipo *all-bran*



Fuente: chicaencuentra.blogspot.com

Sin embargo, a pesar de su importancia y alto volumen de producción. Chen *et al.* (2009) luego una década de trabajo determinaron que para un verdadero aprovechamiento del residuo de los cereales este se debe fraccionar y no utilizarse como un “todo”, puesto que de esa manera termina en un bajo rendimiento técnico y no se aprovecha el residuo en su totalidad. El grupo hizo especial énfasis en las diferencias estructurales de la paja y con base en ello no puede ser tratada como un “único” residuo, dado que estas diferencias químicas y estructurales hacen que los procedimientos actuales de aprovechamiento no sean los más adecuados.

Otro aprovechamiento prometedor apunta a la sustitución de fuentes maderables para la producción de papel, especialmente en países que carecen de esta materia prima. En esta vía, China es la potencia, con más del 75 % de producción de materia prima lignocelulósica proveniente de paja de arroz principalmente. Sin embargo, el proceso de producción se enfoca únicamente en la separación de la celulosa de la hemicelulosa y lignina, además de la producción de licor negro, lo cual representa un desperdicio de esta materia prima y un problema de contaminación grave. La aparición de tecnologías como el bioblanqueamiento aportada por muchos investigadores trajo un gran avance en el aprovechamiento de estas materias primas y en la reducción de la polución en el mundo (Chen *et al.*, 2009).

La paja de cereales se ha usado tradicionalmente como abono para los campos de cultivo. Durante su producción es vertida a los campos sin ningún tipo de procesamiento, lo que resulta en un proceso extremadamente lento que en muchos casos evita, incluso, que los microorganismos puedan actuar. Por esa razón se están utilizando con mayor frecuencia métodos como la aplicación de compost y fertilizantes derivados de la digestión anaeróbica de residuos orgánicos, los cuales pueden ser asimilados por el suelo de manera más rápida y tener un efecto más pronunciado en la enmienda de los suelos.

La estrategia de aprovechamiento más completa de los tres principales componentes químicos de la paja de cereales es aquella que considera una biorrefinería como punto de partida para la generación de diferentes compuestos de alto valor agregado. Sin embargo, para que esto sea posible se deben separar los tres compuestos y mantener al mismo tiempo –hasta donde sea posible– la integridad de cada compuesto de la materia prima. De esta manera se utiliza cada fracción y se obtienen productos de alto valor agregado, lo que se traduce en una utilización eficiente de la materia prima (Chen *et al.*, 2009).

Residuos de la industria de la yuca (cassava)

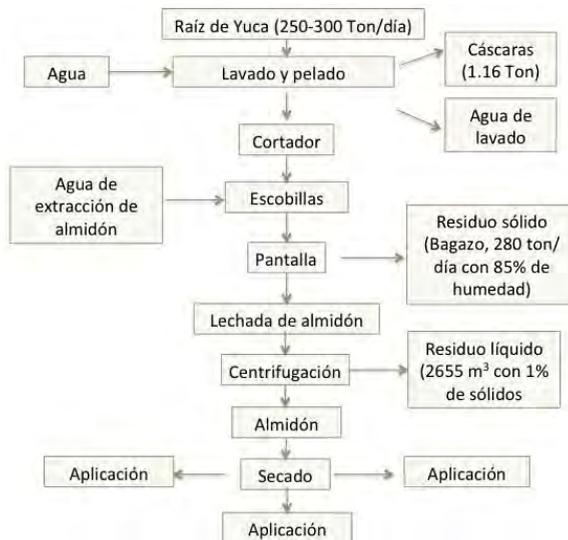
Normalmente, el almidón es hidrolizado gracias a la acción de la enzima α -amilasa. Con este proceso no le ocurre retrogradación ni hay incremento de la viscosidad de la solución durante la pasteurización –un pretratamiento necesario previo a la fermentación– siempre y cuando los microorganismos posean glucoamilasas para la degradación de esos almidones hidrolizados, que generalmente producen dextrinas y maltodextrinas, útiles en la producción de antibióticos como la penicilina, la cefalosporina y la estreptomycin. Otros ácidos orgánicos (cítrico, láctico, glucónico, itacónico), algunos aminoácidos, goma xantana, glucanos, etc., son producidos a partir de la fermentación de

jarabes de glucosa –cuyo contenido de este monosacárido puede ser del 85 % al 90 %– que se obtienen del tratamiento del almidón con amilasas.

La yuca (*Manihot esculenta* Cranz) se considera una fuente importante de calorías y fibra dietaria en muchos países tropicales de América, Asia y África, con variedad de nombres en todos ellos. Se considera originaria del sur de Brasil (Amazonas) y fue introducida en África en el siglo XVI y en Asia en siglo XVIII. Posee una extraordinaria capacidad de adaptación a diversos climas y condiciones edafoclimáticas y su producción se ha incrementado considerablemente en los últimos diez años (alrededor de 180 millones de toneladas por año) gracias al interés que han despertado sus características. Los principales productores son Nigeria, Brasil, Tailandia, Zaire e Indonesia, pero la India es el país con mayor rendimiento por hectárea (20 ton/ha). Es utilizada para alimentación humana (60 %) y animal (33 %) y en las industrias textilera, papelera, fermentativa y alimentaria (A. Pandey *et al.*, 2000).

El procesamiento de la yuca en rallanderías genera residuos húmedos y secos. Entre los sólidos se tienen la cáscara y el bagazo (Pandey *et al.*, 2000). El procesamiento de 250-300 toneladas de raíces de yuca produce alrededor de 1,16 toneladas de cáscara y 280 de bagazo, con una humedad del 85 %. Generalmente, los residuos son dispuestos en rellenos sanitarios prácticamente sin ningún tratamiento (Figura 12).

Figura 12
Esquema del procesamiento de la yuca



Fuente: Adaptado de A. Pandey *et al.* (2000).

Bagazo de yuca

El bagazo de yuca es un residuo fibroso con un contenido de almidón del 50 % respecto al peso seco de la materia prima y una composición como se muestra a continuación (Pandey *et al.*, 2000):

- Humedad: entre 5,02 % y 11,20 %
- Proteína: entre 0,32 % y 1,61 %
- Lípidos: entre 0,53 % y 1,06 %
- Fibra: entre 14,88 % y 50,55 %
- Cenizas: entre 0,66 % y 1,50 %
- Carbohidratos: entre 40,50 % y 63,85 %

Se observa que no se hace referencia alguna al contenido de cianuro.

La variabilidad puede obedecer a las diferentes tradiciones culturales y a la carencia de tecnología especializada para procesar la materia prima. El principal componente es almidón, el cual se expresa dentro del contenido de carbohidratos. Asimismo, su aplicación para alimentación animal se hace inviable dado su bajo contenido de proteína. Un aspecto particular que hace promisorio este residuo frente a otros como el bagazo de caña de azúcar es que no requiere tratamiento previo alguno para ser procesado por los microorganismos y gracias al bajo contenido de cenizas en comparación con la paja de arroz y los cereales (17,5 % y 1,0 %, respectivamente), se puede usar como suplemento en cultivos microbianos para su posterior procesamiento (A. Pandey *et al.*, 2000).

Numerosos microorganismos han sido empleados para degradar el bagazo de yuca, principalmente los hongos filamentosos *Aspergillus niger*, *Candida iypolitica*, *Candida fimbriata*, *K. marxianus* y *Rhizopus* sp., entre otros.

Estos microorganismos han sido empleados por su capacidad de procesar el almidón para producir ácidos orgánicos (John, Nampoothiri y Pandey, 2006), compuestos aromáticos volátiles, alimentos y suplementos animales (de Sousa *et al.*, 2012) y hongos (De Freitas, Escaramboni, Carvalho, De Lima, y De Oliva-Neto, 2014) e hidrolizados que se emplean en el cultivo de otros microorganismos que generan compuestos de alto valor agregado, como azúcares reductores (X. Q. Xu *et al.*, 2014), polisacáridos como el pululano (Sugumaran, Jothi y Ponnusami, 2014) y ácidos orgánicos (A. Pandey *et al.*, 2000)

Residuos de la industria vinícola

La industria vinícola es una de las agroindustrias más importantes del mundo. Los países con mayor desarrollo en este sentido son Argentina (14.984.000 hl), Chile (12.821.000 hl), Estados Unidos (22.000.000 hl) y Australia (13.500.000 hl) (Hussain, Cholette, y Castaldi, 2008), a los que se suma la Unión Europea con 153.771.000 hl. Esta elevada producción requiere gran cantidad de fertilizantes, agua y abonos, al tiempo que genera cantidades enormes de residuos cuya no utilización significaría un garrafal desperdicio de valiosas materias primas y un verdadero problema medioambiental (Mateo y Maicas, 2015).

Las características del vino dependen del proceso de producción y de las propiedades de la materia prima empleada, lo que determina también las particularidades de los residuos generados. Por esta razón, es necesario caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los residuos antes de plantear una aplicación o industria (Devesa-Rey *et al.*, 2011).

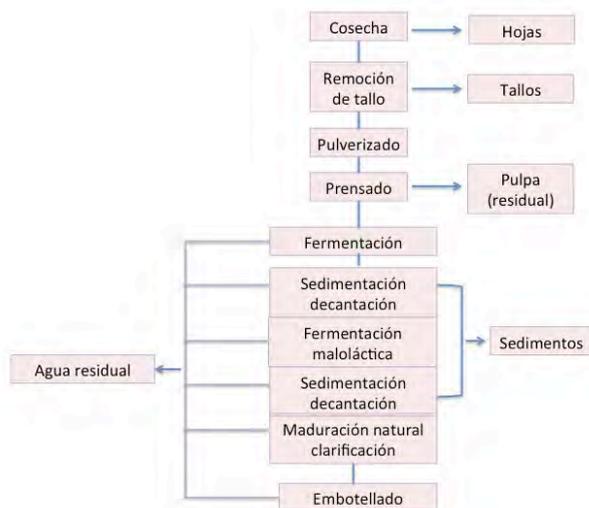
En Europa se estima que se producen alrededor de 14,5 millones de residuos de uva cada año (Chouchouli *et al.*, 2013), con un importante contenido de compuestos biodegradables y sólidos suspendidos (Navarro, Sarasa, Sierra, Esteban y Ovelleiro, 2005). Estos residuos se componen de semillas, hojas y tallos, pulpa, cáscara, aguas residuales, dióxido de carbono, compuestos volátiles, tierras diatomáceas y arcillas (bentonita y perlita) (Oliveira *et al.*, 2013) (Figura 13).

Estos residuos fueron caracterizados por Bustamante *et al.* (2008), quienes hallaron pH ácidos (entre 3,8 y 6,8), alto contenido de materia orgánica (669-920 g por kg/l) y alta conductividad eléctrica (1.62-6.15 Ds/m). Adicionalmente, observaron concentraciones altas de macronutrientes, especialmente potasio (11,9-72,8 g/kg) y polifenoles (1,2-19,0 g por kg/l) y bajo contenido de metales pesados y micronutrientes. Por lo anterior, estos residuos se consideran incompatibles con la agricultura y deben ser acondicionados antes de ser utilizados en esta actividad.

Por otra parte, las hojas de la planta *Vitis vinifera* L., son los residuos menos valorados y utilizados a pesar de ser una fuente importante de compuestos orgánicos poco estudiados y caracterizados, como los ácidos orgánicos, los ácidos fenólicos, los flavonoides, los taninos, las procianidinas, las antocianinas, los lípidos, las enzimas, las vitaminas, los carotenoides, los terpenos y los azúcares (Xia, Deng, Guo, y Li, 2010). Llobera y Cañellas (2007), proponen que los tallos de las uvas se utilicen en la obtención de compuestos de sabor astringente, principalmente proantocianidinas. Este residuo, que corresponde entre un 1,4 % y un 7,0 % de la materia seca (Souquet, Labarbe, Le Guernevé, Cheynier, y

Moutounet, 2000), se remueva antes del proceso de producción de vino para evitar la introducción de sabores desagradables. En la actualidad, los residuos de tallos se utilizan en la producción de abonos y para alimentación animal; sin embargo, constituye un aprovechamiento de bajo valor comercial.

Figura 13
Esquema de producción del vino



Fuente: adaptado de Mateo y Maicas (2015).

La pulpa producida durante la extracción de jugo de la uva es otro residuo obtenido en grandes volúmenes. Se utiliza principalmente en la extracción de aceite de las semillas y polifenoles (resveratrol, flavonoides, ácidos fenólicos, etc.); también para la producción de etanol, metanol, ácido cítrico y xantano por fermentación y energía por metanización (Mateo y Maicas, 2015). Sobre la base del alto contenido de polifenoles reportado para este residuo se han llevado a cabo diferentes estudios para analizar la capacidad antioxidante y utilizarla en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria (Rockenbach *et al.*, 2011).

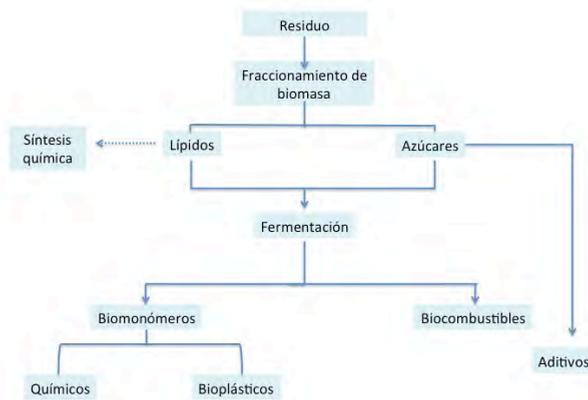
Las principales fuentes de proteína provenientes de residuos agroindustriales son los residuos de levaduras producidos en panaderías y cervecerías, ricos en factores de crecimiento, minerales, vitaminas y carbohidratos. Las peptonas se obtienen de la hidrólisis parcial enzimática de proteínas animales o de las plantas (caseína, proteína de soya, proteína de suero y gelatina, entre otras). Sin embargo, recientemente se ha creado una alarma a nivel mundial por el aumento de casos de zoonosis, por lo cual se prefieren otras fuentes de proteínas provenientes de plantas, peces y animales marinos.

Elaborar unos criterios para seleccionar la fuente adecuada de nutrientes para un proceso de fermentación es complicado, pues depende de los microorganismos disponibles, de las características de la materia prima, del producto que se desea obtener, de su mercado, de la disponibilidad del residuo, etc., a lo que se añade la obligatoriedad de conocer su composición química, su volumen de producción anual, el estado físico, la estabilidad y las condiciones óptimas de almacenamiento. Asimismo, se debe tener en cuenta que el principal componente del residuo debe ser útil como sustrato para la producción fermentativa de productos industriales o someterse a procesos de extracción para obtener moléculas de interés comercial; que se encuentre localmente en cantidades suficientes para la producción del material de interés; que no tenga competencia con otras aplicaciones o usos; que requiera pretratamientos sencillos y económicos, y que sea estable e inocuo para el ser humano y el medioambiente.

Entre los múltiples procesamientos de los residuos de la industria vinícola, la biorrefinería parece ser la tecnología más promisoría (Cherubini, 2010), ya que a partir de microorganismos permite obtener de una manera limpia y ambientalmente amigable productos de alto valor agregado y energía, incrementando de esta manera el interés en este tipo de producción para los residuos vinícolas (Figura 14). La aplicación efectiva de este aprovechamiento dependerá de la voluntad económica, política, social y cultural de las empresas, el Gobierno y el sector académico para integrarse y aportar conocimiento y reglamentación, lo que permitirá la adición de valor agregado a estos residuos altamente contaminantes para el medio ambiente.

Figura 14

Esquema de tratamiento de los residuos del vino



Fuente: adaptado de Mateo y Maicas (2015).

Residuos de la industria de la caña de azúcar

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una planta perteneciente a la familia de las poáceas proveniente del sureste asiático. Es común en países tropicales y subtropicales y sus variedades difieren en el color y en la longitud de su tallo. El mayor productor caña de azúcar es Brasil, con el 25 % de la producción mundial, seguido por China, India, Tailandia y Pakistán, países que la producen para obtener azúcar, etanol, melazas, soda y cachaza (Brasil) (Parameswaran, 2009).

Durante la producción de azúcar y melazas se genera un residuo fibroso del tallo al extraer el jugo, el bagazo, que está constituido de un 50 % de celulosa, 25 % de hemicelulosa y 25 % de lignina. Contiene, además, un 50% de α -celulosa, 30 % de pentosanos y 2,4 % de cenizas, lo cual facilita su fermentación (Parameswaran, 2009). Otra ventaja del bagazo de caña es que se produce en cantidades elevadas (80 ton/ha) en comparación con otros residuos provenientes de cultivos de cereales, herbáceos o forestales, los cuales generan entre dos y veinte toneladas por hectárea. Además, su producción se satisface anualmente.

El bagazo ha sido empleado como materia prima para la producción de electricidad, papel, pulpa y productos derivados de la fermentación del azúcar, entre los que se encuentran químicos, aminoácidos, etanol, alcaloides y enzimas.. De la misma manera, ha servido para el cultivo de hongos y en la producción de alimentos fortificados con proteína para animales (proteína unicelular), ganado fertilizantes y edulcorantes (Parameswaran, 2009). Un estudio reciente publicó la fermentación en estado sólido utilizando como sustrato el bagazo de caña, por parte del *Enterococcus faecium* (Iritani, Mitsunashi, Chaen, y Miyake, 1996). Asimismo, Zadrazil y Puniya (1995) analizaron la facilidad de degradación que posee el hongo de la podredumbre blanca del bagazo. Se encontró que, en efecto, esta separación es útil en fermentaciones en estado sólido por el hongo filamentoso.

En un estudio reciente se reportó una fermentación sólida del bagazo de caña por cianobacterias multicelulares filamentosas (*Arthrospiras*), cuyos productos fueron evaluados para alimentación animal y humana. En el estudio se analizó la influencia de la humedad, la intensidad de la luz y la concentración del inóculo en la producción de proteína a partir de *Arthrospira platensis*, y se concluyó que la mayor influencia la tenía la humedad (Pelizer, de Carvalho, y de Oliveira Moraes, 2015).

Un estudio reciente encontró que los extractos del bagazo de la caña de azúcar contienen compuestos capaces de inhibir el crecimiento de patógenos óseos

(Zhao, Chen, Zhao, y Yu, 2015), con un contenido de polifenoles relativamente alto (4 mg/g de bagazo seco, con una concentración de quercetina de 470 mg/g de polifenol). La principal actividad del extracto fue contra *S. aerus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. typhimurium*. De acuerdo con los hallazgos, la causa de la muerte celular se debe a un incremento en la conductividad eléctrica de las suspensiones celulares, lo que genera el rompimiento de la pared celular y el derramamiento del contenido intracelular por daño en las proteínas de las paredes celulares causado los compuestos polifenólicos presentes en el extracto del bagazo.

Por otra parte, Mondala *et al.* (2015) investigaron la producción más eficiente de aceite por parte de microorganismos provenientes de lodos previamente activados en presencia de xilosa como fuente de carbono, a partir de hidrolizados de bagazo de caña de azúcar. Se obtuvieron contenidos de aceite entre 40 % y 47 % (peso seco de la célula) bajo una proporción alta de C:N. Se requirió suplemento adicional para mantener una buena concentración de biomasa. Este proceso muestra una aplicación interesante para la producción de biocombustibles a partir de hidrolizados de la caña de azúcar.

El bagazo de la caña de azúcar ha sido empleado, asimismo, en la producción de enzimas con aplicación industrial. Cultivos de hongos filamentosos, bacterias y levaduras han sido empleados en diferentes fermentaciones para este fin (Parameswaran, 2009). En este aspecto, es clave que se lleve a cabo una hidrólisis previa o un pretratamiento efectivo, con el fin de facilitar el proceso de fermentación de los azúcares liberados.

El grupo de Bussamra, Freitas, y Costa (2015), reportó la hidrólisis facilitada por un coctel de enzimas de bagazo de caña de azúcar compuesto de *Trichoderma reesei* y *Escherichia coli* modificado genéticamente, con un cultivo cuya composición fue optimizada. Luego de evaluar la respuesta, el resultado (microarreglos de hidrólisis) fue que la composición debería ser *T. reesei* (80 %), endoglucanasa (10 %) y β -glucosidasa (10 %), la cual, en teoría, debería convertir un 72 % de celulosa. Una enzima comercial (Celluclast) convirtió apenas un 49,11 %, demostrando con ello que la mezcla diseñada con análisis estadístico permitió obtener una combinación de enzimas capaces de hidrolizar mayor cantidad de celulosa, el aspecto más importante y determinante para el aprovechamiento del bagazo de caña en aplicaciones posteriores, como producción de enzimas y otros productos de alto valor agregado, así como también etanol y ácidos orgánicos (Parameswaran, 2009).

Recientemente, se dio a conocer un estudio en el que se utilizaron enzimas producidas *in situ* a partir de la fermentación sólida del bagazo de caña (Liu *et al.*, 2014). El grupo de Robl *et al.* (2015), notificó un aumento en la hidrólisis del bagazo de cítricos a partir de una β -glucosidasa y una pectinasa, con ayuda del hongo *Annulohyphoxylon stygium* DR47, gracias a lo cual se obtuvo la máxima producción de pectinasa ($6,26 \text{ U mL}^{-1}$) a un pH de 4,0 y de β -glucosidasa ($10,13 \text{ U mL}^{-1}$) a un pH de 5,0, en un medio que constaba de salvado de soya y bagazo cítrico. Los autores dictaminaron que los extractos enzimáticos fueron útiles para reemplazar parcialmente Celluclast 1,5L de la hidrólisis de caña de azúcar y mediante un análisis proteómico develaron *A. stygium*, fragmentos de las enzimas pertenecientes a las familias GH3 y GH54, claves en el aumento de los rendimientos de sacarificación (Grande, 2015).

El grupo de de Cassia Pereira *et al.* (2015), obtuvo celulasas y xilanasas a partir de treinta y dos hongos tolerantes a altas temperaturas, con el fin de evaluar su capacidad de fermentación y degradación de diferentes sustratos lignocelulósicos. Del estudio se concluyó que aunque *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 fue el hongo que produjo los niveles más altos de endoglucanasa ($357,51 \text{ U g}^{-1}$), β -glucosidasa ($45,42 \text{ U g}^{-1}$), xilanasas ($931,11 \text{ U g}^{-1}$) y avicelasa ($3,58 \text{ U g}^{-1}$) –esta última, una enzima poco común a partir de fermentaciones sólidas de hongos– todos los hongos exhibieron buena capacidad de producción de enzimas con posibilidades de aplicación en el proceso de sacarificación a partir de bagazo de caña de azúcar.

Entre las enzimas más utilizadas e importantes se encuentran las celulasas, cuyo costo de producción determina en parte la viabilidad del aprovechamiento de residuos lignocelulósicos. Si bien se han propuesto metodologías como el reciclaje de la enzima –la fracción insoluble proveniente de *Chrysosporthe cubensis* y *Penicillium pinophilum*) (Visser, Leal, de Almeida y Guimaraes, 2015) que permitió reutilizar con buena actividad celulítica las enzimas–, la producción a partir del bagazo de caña de estas enzimas se muestra muy promisorias y adecuada para los requerimientos establecidos.

Ladeira, Cruz, Delatorre, Barbosa, y Martins (2015), investigaron la producción de celulasa a partir de una mezcla de bagazo de caña de azúcar y licor de maíz con ayuda de *Bacillus* sp. SMIA-2 y al final analizaron sus propiedades bioquímicas para aplicarlas en la producción de detergentes industriales. En general, la estabilidad de la enzima en presencia de diferentes detergentes como Ultra-Biz® y Ariel® (en el cual fue menos estable) fue evaluada, como también se hizo en presencia de compuestos químicos como dodecil sulfato de sodio y Renex-95 en los cuales fue estable, pero no así en presencia de TritonX-100 y H_2O_2 . Los

cultivos de *Bacillus* también liberaron proteasas en el medio de cultivo, pero las celulasas fueron estables a la digestión proteica. Las máximas actividades enzimáticas se obtuvieron a 120 h (avicelase, 0,83 U mL⁻¹) y 138 h (CMCasa, 0,29 U mL⁻¹), respectivamente, con un pH de actividad óptima de 7,5 y 8,0 y temperaturas de trabajo de 70 °C para las dos enzimas, demostrando con ello que estas enzimas se pueden producir a partir de residuos de caña y maíz con la posibilidad de ser aplicadas en la industria de detergentes.

Cunha *et al.* (2014) reportaron la producción de endoglucanasas a partir de bagazo de caña previamente esterilizado y licuado, por medio de una fermentación sumergida mediada por *Aspergillus niger*. El sustrato fue tratado previamente con vapor y sometido a una fermentación en estado sólido con *A. niger*. Posteriormente fue introducido en un *buffer* con celulasa por doce horas y una reacción posterior de treinta y seis horas, lo que permitió obtener un semisólido con 30 % (p/v) que se sometió a una fermentación sumergida con una concentración total de sólidos de 26 % (p/v) con ayuda del hongo, generando así una actividad enzimática quince veces mayor que aquella que se produce con el sustrato sometido a condiciones de fermentación en estado sólido.

El grupo de D. K. Sharma, Tiwari y Behera (1995), reportaron la producción de celulasas a partir de diferentes cepas fúngicas. Roussos, Raimbault, Saucedo-Castañeda y Lonsane (1992) obtuvieron celulasa a partir de una mezcla de 4:1 de bagazo de caña de azúcar y salvado de trigo y enunciaron que el uso de una prensa hidráulica era adecuado para liberar las enzimas de la materia fermentada.

Gupte y Madamwar (1997) obtuvieron celulasa y β -glucosidasa mediante fermentación en estado sólido de bagazo de caña de azúcar, utilizando mezclas de cultivos de *Aspergillus ellipticus* y *Aspergillus fumigatus*. Informaron un aumento en la actividad hidrolítica y de la β -glucosidasa en comparación con los procedimientos llevados a cabo con las enzimas individuales. El proceso hidrolítico fue reforzado utilizando diferentes pretratamientos y se obtuvo el máximo rendimiento al octavo día de fermentación.

El-Naggar, Abdelwahed, Saber y Mohamed (2014), produjeron endoglucanasas a partir de la fermentación sumergida de bagazo de caña de azúcar, utilizando *Streptomyces albogriseolus* –un actinomiceto aislado del suelo– subespecie cellulolyticus cepa NEAE-J, identificada mediante quimiotaxonómicos, morfológicos, fisiológicos y culturales. Los investigadores evaluaron los efectos del pH, la temperatura, la concentración del nitrógeno y el tiempo de incubación, en el rendimiento de producción de la enzima.

Por otra parte, se ha reportado la producción de otras enzimas a partir de la fermentación de bagazo de caña. La producción de xilanas, por ejemplo, se llevó a cabo a partir de fermentación en estado sólido de este sustrato. Las xilanas son importantes para la degradación de compuestos presentes en las paredes celulares (hemicelulosa, compuesta principalmente por xilano) (Parameswaran, 2009). Estos, a su vez, están conformados por unidades de heteropolisacáridos del β -1,4-xilopiranosas, sustituidas por residuos acetil, arabinosil y glucopiranosílicos. En general, la producción de xilanas se hace con base en la fermentación de sustratos sólidos y hongos filamentosos, a pH neutro o relativamente ácido y por debajo de 45 °C (Parameswaran, 2009). Sin embargo, las xilanas con potencial industrial son aquellas estables a altas temperaturas (termofílicas).

En ese sentido, Jain (1995) produjo xilanas a partir de bagazo con ayuda de un hongo termofílico. En general, el crecimiento del hongo fue bueno incluso en bagazo sin tratar y con mayor actividad enzimática que en el bagazo pretratado con ácido o álcali. En un estudio reciente, Kaushik, Mishra y Malik (2014) obtuvieron xilanas a partir de diferentes residuos agroindustriales, entre los cuales se encontraba el bagazo de caña de azúcar, con el fin de enfrentar dos desafíos: adecuar los residuos de la industria papelera derivados del blanqueamiento del papel y degradar los compuestos colorantes presentes en los efluentes. El hongo del cual se aislaron las xilanas fue el *Aspergillus lentulus*, con una producción máxima lograda a partir de la fermentación en estado sólido de salvado de trigo (158,04 U g⁻¹), seguido por residuos de maíz (153,0 U g⁻¹), bagazo de caña de azúcar (129,9 U g⁻¹) y paja de trigo (49,4 U g⁻¹). Las enzimas, además, fueron estables a altas temperaturas y pH (75 % de la actividad se mantuvo a un pH de 9 y 70 °C). Los extractos de la fermentación fueron evaluados para la remoción de colorantes aniónicos (85 % de remoción) y catiónicos (96 % de remoción), demostrando con ello su aplicabilidad en la industria colorante y textil.

Buenrostro-Figueroa *et al.* (2014), notificaron la producción de una enzima nueva: la elagitannasa, responsable de la degradación de elagitaninos y la producción de ácido elágico, un compuesto bioactivo importante en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria. En el procedimiento se reportó la fermentación mediada por *Aspergillus niger* GH1 a partir de la fermentación sólida de cuatro residuos agroindustriales (bagazo de caña de azúcar, mazorca de maíz, corteza de coco y tallos de candelilla), todos importantes en la producción de la enzima.

Rajagopalan y Krishnan (2008) reportaron por primera vez la producción de α -amilasa a partir de hidrolizados de bagazo de caña de azúcar, algo que se dificulta por la formación de azúcares reductores que inhiben la síntesis de α -amilasas

a través de supresión catabólica (Parameswaran, 2009). Sin embargo, el grupo comunicó la obtención de α -amilasa a partir de *Bacillus* sp. (*Bacillus subtilis* KCC103) sin inhibición por parte de glucosa formada por la fermentación de bagazo de caña de azúcar, en niveles muy similares a los que se obtienen a partir de almidón. El mismo grupo consiguió la obtención de α -amilasa a partir de una cepa de *Clostridium* sp. BOH3 solventogénico, que contenía hidrolizados de caña de azúcar y un refuerzo de almidón, esencial para la producción de α -amilasa (Rajagopalan, He, y Yang, 2014). El análisis de huella dactilar de péptidos mostró que la α -amilasa obtenida era homóloga a la obtenida a partir de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824, aunque con menor peso molecular (54KDa, en comparación de 84 KDa de la ATCC824).

La torta de aceite residual proveniente del procesamiento de semillas de oliva para la obtención de su aceite y bagazo de caña, se empleó en la obtención de lipasas a partir de una fermentación en estado sólido, utilizando cultivos estables a temperaturas altas de los hongos *Rhizomucor pusillus* y *Rhizopus rhizopodiformis*, bagazo de caña de azúcar y residuos del pastel de aceite, con una producción máxima de las enzimas de $1,73 \text{ U mL}^{-1}$ y $0,97 \text{ U mL}^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, cuando se dispusieron los residuos juntos (50:50), se encontró un aumento en la actividad a $43,04 \text{ U mL}^{-1}$ y a 10283 U mL^{-1} , con *Rhizopus rhizopodiformis* y *Rhizomucor pusillus*, respectivamente (Cordova *et al.*, 1998).

El bagazo de caña de azúcar también ha servido para la obtención de otros productos de alto valor agregado (Aidoo, Hendry y Wood, 1982; Parameswaran, 2009). La producción de ácidos orgánicos, como el ácido cítrico, ha sido posible mediante fermentación en estado sólido utilizando sustratos inertes, con el fin de proveer un soporte más homogéneo y facilitar el proceso de purificación (Parameswaran, 2009). Asimismo, se han llevado a cabo diferentes procedimientos para la producción de ácido láctico (John *et al.*, 2006). La producción de los ácidos itacónico, fumárico y málico –importantes como bloques sintéticos para la obtención de otros compuestos químicos– se ha efectuado a partir de la fermentación sólida de diferentes residuos lignocelulósicos (entre ellos el bagazo de caña) mediada por hongos filamentosos, gracias a sus ventajas competitivas frente a las fermentaciones sumergidas (Grande, 2016).

Del mismo modo, la producción de pectinasas ha sido posible gracias a la fermentación sólida de bagazo de caña impregnado con una solución concentrada de glucosa (Solis-Pereyra *et al.*, 1996). El uso de sustratos inertes para apoyar la fermentación en estado sólido también es útil para estudiar el mecanismo de degradación del hongo (metabolismo) (Huerta *et al.*, 1994).

Christen, Villegas y Revah (1994), produjeron compuestos aromáticos a partir de la sacarificación y fermentación simultánea (SSF) de bagazo de caña y la utilización de un medio nutritivo basado en glucosa, lo que permitió aislar e identificar cerca de veintidós compuestos mediante cromatografía de gases. De igual manera, Chiu y Chan (1992) demostraron la producción de pigmentos rojos y amarillos a partir de la fermentación sólida de bagazo humedecido con un medio de PGY, con aceite de maíz utilizando cultivos de *Monascus purpurea* (Grande, 2016).

Por último –pero no menos importante– los residuos de bagazo de caña de azúcar se han utilizado para la producción de etanol, gracias a su sencillez y facilidad de procesamiento, así como su alto contenido de carbohidratos hidrolizables para la producción de azúcares fermentables (Parameswaran, 2009). Últimamente, se han dado a conocer numerosas investigaciones que apuntan al bagazo de caña como sustrato para la producción de etanol (Santos, Sarrouh, Rivaldi, Converti y Silva, 2008).

Asimismo, se han desarrollado otros procedimientos para la obtención de biopolímeros utilizando la bacteria *Ralstonia eutropha* a partir de bagazo de caña pretratado con soluciones ácidas diluidas, lo que ha permitido obtener polihidroxicanoatos con un importante valor agregado en la industria (Yu y Stahl, 2008).

Residuos agroindustriales como materia prima para la producción de metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos bioactivos que se producen durante el crecimiento y metabolismo de los microorganismos en procesos de cultivo activos y por fermentación posterior al crecimiento de los microorganismos. Entre los microorganismos más activos en la producción de estos compuestos se encuentran los hongos filamentosos, los cuales producen antibióticos, micotoxinas, alcaloides, ciclosporina (compuesto inmunosupresor), y fumigilina, compuesto inhibidor y supresor de tumores (Khaldi, Collemare, Lebrun, y Wolfe, 2008).

Numerosos metabolitos secundarios se originan durante la excreción de los microorganismos en las fases de crecimiento y estacionaria de crecimiento. Estos compuestos son de altísimo valor agregado en las industrias alimentaria, cosmética, farmacéutica y textil, por lo cual su obtención a partir de materias primas generalmente abandonadas o subutilizadas en los lugares de producción, representa una manera económica y amigable con el medioambiente para generar estos compuestos.

Los metabolitos más utilizados como materia prima para este proceso son la paja de trigo y de arroz, los granos de cereal averiados, el salvado del trigo y de otros cereales, el bagazo de caña, las semillas de diferentes plantas, los pasteles producto del procesamiento de semillas para la obtención de aceite, y harinas averiadas (Pandey, Soccol, Rodríguez-Leon y Nigam, 2001).

La producción de metabolitos secundarios a partir de las fermentaciones en estado sólido todavía no se ha dado a gran escala en comparación con las fermentaciones en estado líquido, a pesar de su creciente demanda para la producción de compuestos antibióticos de fuentes renovables por sus buenos rendimientos, bajo costo y facilidad y rapidez (Singh Nee Nigam, 2009). La preferencia por las fermentaciones sumergidas a partir de azúcares simples se debe principalmente a que su técnica es conocida, fácil de escalar y ofrece mayor sencillez para monitorear sus parámetros en comparación con el proceso en estado sólido, a pesar de que en este último se pueden obtener mayores rendimientos, sus costos por concepto de purificación (excepto cuando el proceso se destina para la producción de fármacos) son menores, y de las desventajas propias del proceso sumergido, a saber, el aumento de la viscosidad en función del aumento de la actividad metabólica y la posibilidad de degradación de los metabolitos (Singh Nee Nigam, 2009).

No obstante los avances, aún falta consolidar la investigación en el diseño de biorreactores con condiciones óptimas para el cultivo de microorganismos y ampliar el rango de metabolitos que se pueden obtener por medio de esta técnica mediante diferentes modos de operación y mayor control sobre los parámetros de operación, todo lo cual permitiría el correcto escalamiento del proceso y garantizaría la producción a nivel industrial. Este tema se abordará en mayor detalle en el capítulo cuarto.

Otra fuente de carbono son los lípidos provenientes de las plantas, los cuales son utilizados en la producción de antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas y polienos antifúngicos; sin embargo, su pretratamiento es más complejo que el de los carbohidratos y más costoso. Por otro lado, los lípidos son una mayor fuente de energía comparada con los carbohidratos y son útiles en los procesos de fermentación como antiespumantes al facilitar el proceso de separación necesario en fermentaciones con lípidos ya que este se lleva a cabo en dos fases, requiere más oxígeno y los microorganismos involucrados deben poseer enzimas lipasas para degradar los lípidos.

Perspectivas

El futuro para el uso de los residuos agroindustriales en procesos fermentativos es bastante promisorio. Sin embargo, el principal aspecto que debe ser considerado para “globalizar” estas tecnologías es la disponibilidad de los azúcares fermentables a partir de las diversas materias primas. Normalmente, un tratamiento previo a la fermentación es necesario para liberar los azúcares fermentables a partir de polisacáridos no degradables por microorganismos. Los pretratamientos pueden ser físicos, mecánicos, térmicos, químicos o enzimáticos, los cuales liberan estos azúcares y generan los metabolitos y productos químicos de interés como aminoácidos, ácidos orgánicos, y enzimas, entre otros. Sin embargo, hay un tipo de fermentación que no requiere este pretratamiento: la fermentación en estado sólido, en la cual las materias primas lignocelulósicas son degradadas directamente por los microorganismos (Robinson, Singh, y Nigam, 2001).

Es importante, entonces, concienciar al Gobierno y a la empresa privada para que apoyen las investigaciones en este campo y crear programas de formación en estas tecnologías –uno de los principales déficits de nuestro país– y en su comercialización. El mercado de las enzimas industriales es altamente prometedor, razón por la cual se debe aprovechar el elevado volumen de residuos aptos para la obtención de la materia prima involucrada en su producción. Sin embargo, para que esta meta se alcance se deben establecer empresas dedicadas a este fin, amparadas en programas e incentivos que impulsen la inversión en este campo. En el caso de las enzimas, se requiere el desarrollo de prototipos más estables a condiciones de temperatura y pH industriales, agentes inhibitorios de crecimiento y menos dependientes de metales de transición, al tiempo que se mantiene (o se mejora) su capacidad catalítica.

Finalmente, se espera que en los próximos años los estudios que se llevan a cabo para el aprovechamiento de los residuos agroindustriales con el fin de obtener un enriquecimiento proteico, metabolitos secundarios, enzimas, ácidos orgánicos, biopolímeros y vitaminas, entre otras aplicaciones, se centren en la capacidad de escalamiento de estos procesos una vez evaluados los parámetros que afectan su viabilidad y rendimiento de producción.

Acondicionamiento previo de los residuos agroindustriales para procesos fermentativos

Introducción

Los agricultores de todo el mundo deben batallar día a día con el grave problema de la disposición de residuos. Estos, además de generar contaminación medioambiental, llevan a pérdidas económicas al no ser aprovechado el potencial que poseen de ser una fuente renovable de materia prima para la producción de moléculas de alto valor agregado y de interés en las industrias alimentaria, farmacéutica y textil, en la fabricación de compuestos químicos, abonos, fertilizantes y concentrados para animales y en la producción de energía. Sin embargo, para ser utilizados estos residuos deben ser previamente acondicionados con el objetivo de facilitar su procesamiento, especialmente si se hace con ayuda de microorganismos como hongos, bacterias, levaduras y microalgas.

Estos residuos son ricos en hemicelulosa, celulosa y lignina, tres polímeros que forman una estructura tridimensional en la pared celular de las células vegetales difícil de procesar por los microorganismos. Con el propósito de que la materia prima sea más accesible por los microorganismos para la biotransformación y producción de moléculas y compuestos de interés, se llevan a cabo un pretratamiento y un acondicionamiento de la materia prima, los cuales originan la transformación de la estructura cristalina de la matriz lignocelulósica, incluida la degradación del complejo lignocelulósico (Demirbas, 2005). La materia prima consta principalmente de material lignocelulósico conformado por una matriz de celulosa con lignina que se entrecruzan con cadenas de hemicelulosa, molécula cristalina y de difícil tratamiento para los procesos de hidrólisis (Grande, 2016). El pretratamiento (físico, químico o biológico) degrada la estructura cristalina del complejo lignocelulósico y la convierte en una estructura amorfa

más accesible para los microorganismos que efectuarán la biotransformación a partir de la hidrólisis y la fermentación.

Los residuos agroindustriales son, por lo general, quemados o enterrados en rellenos sanitarios (Figura 15). Entre los más comunes se encuentran los bagazos, las melazas, el aceite residual de frituras, las hojas, los tallos, las ramas, las pieles, las pulpas, las cáscaras, las semillas y los derivados de la molienda de maíz, entre otros. Los principales productores de estos residuos a nivel mundial son los cultivos de cereales como el arroz, el trigo, el maíz y la soja; plantaciones de algodón, leguminosas, café, cacao, caña de azúcar, remolacha, oliva, té, frutas (banano, mango, coco) y aceite de palma (Figura 16).

Figura 15
Relleno sanitario



Fuente: www.elpilon.com.co

Figura 16
Incineración de paja de arroz



Fuente: www.levante-emv.com

Diferentes tipos de residuos agroindustriales

Los residuos agroindustriales son producto del procesamiento de biomasa proveniente de cultivos o de animales. Se puede generar valor agregado al procesarlos de tal manera que se obtienen productos con una aplicación en particular, generalmente reemplazando materias primas no degradables y costosas económica y ambientalmente. Los residuos del procesamiento de cultivos como bagazos, molasas, semillas y derivados como harinas y cáscaras, pueden ser utilizados en diversas aplicaciones (Grande, 2016). También son aprovechables los provenientes directamente de la agricultura; es decir, de procesos como la cosecha y poscosecha de cultivos. Son utilizables las hojas, las semillas, las cáscaras, las pulpas, el prado, la paja, los troncos y tallos, la pelusa, los rastrojos, y los caparazones y conchas, entre otros, que provienen de cultivos de cereales, frutas y verduras. Se clasifican a partir de su contenido de agua en residuos secos y húmedos, una clasificación determinante en el proceso de adecuación y pretratamiento.

Residuos secos

En esta categoría se ubican aquellos provenientes de actividades de cosecha, tales como la paja o el rastrojo de la cebada, fríjoles, avena, arroz y trigo, así como también el tallo y las hojas del maíz, el algodón, el sorgo, la alfalfa y la soya, entre otros (Grande, 2016).

Los cultivos de frutas son una fuente importante de residuos, entre los que se encuentra la maleza y residuos frutales como manzanas, aguacates, peras, almendras, cerezas, uvas, toronjas, limones, limas, naranjas, peras, nueces, ciruelas y duraznos, entre otros.

Por otra parte, las hojas y tallos de cultivos como el pepino, la papa, el tomate, la alcachofa, los espárragos, la lechuga, el melón y el calabacín, se pierden en el suelo una vez el proceso de cosecha culmina. Son residuos susceptibles de aprovechamiento por su alto contenido de hemicelulosa, celulosa, pectina y otros polisacáridos. En los viveros también se generan residuos propios de esta actividad, como los provenientes de la poda y los recortes de hojas, tallos y flores (Grande, 2016).

Residuos húmedos

Aquellos residuos con alto contenido de agua son considerados húmedos. Entre ellos se encuentran el estiércol de animales de granja o de campo, los piensos y los ensilados animales. Esta categoría agrupa, además, los residuos de la cosecha

del verano (forrajes) que se fermentan con ayuda de bacterias lácticas y producen una disminución del pH por debajo de 5. Son almacenados en recipientes plásticos en condiciones anaeróbicas con miras a alimentar los rumiantes en invierno o producir biocombustibles por digestión anaeróbica (Grande, 2016).

Composición de los residuos agroindustriales alimentarios

Todas las células requieren nutrientes para llevar a cabo los procesos básicos de biosíntesis de los constituyentes celulares, los cuales servirán a su vez como base para la construcción de tejidos, órganos y sistemas. Los principales constituyentes celulares son el carbono, el nitrógeno, el fósforo, el hidrógeno, el oxígeno, el magnesio, el calcio, el cloro, el hierro y otros conocidos como traza, todos los cuales son obtenidos por los seres vivos a partir de los alimentos. Estos contienen compuestos químicos clasificados en carbohidratos, lípidos, proteínas y vitaminas principalmente, y otros presentes en menor proporción como los complejos organometálicos. Para ser asimilados por los organismos, estos compuestos deben ser degradados en sus elementos constituyentes mediante el metabolismo bioquímico, en el cual intervienen diversas sustancias que facilitan estas reacciones de degradación.

Un adecuado conocimiento de la composición química y nutricional de los residuos permite su transformación por medio de una tecnología adecuada que incluye la biotecnología, con el fin de obtener alimentos nutraceuticos, fármacos y otras aplicaciones industriales.

A pesar de la cantidad de residuos agroindustriales y su origen, en este capítulo se tratará la composición de los residuos agroindustriales de tipo alimentario, pues aquellos de origen no alimentario son principalmente ricos en material lignocelulósico, lípidos y en algunas ocasiones carbohidratos, aprovechados para la generación de biocombustibles, papel y compuestos químicos.

Las frutas y vegetales son apetecidos todo el año, aunque su producción en fresco generalmente se limita a la época de cosecha, la cual depende de la época o estación del año en muchos países. El principal importador de frutas en el mundo es la Unión Europea, seguido por Estados Unidos y los principales productores son China, la Unión Europea y la India, seguidos por Brasil, Estados Unidos, México y Chile. Sin embargo, solo un pequeño porcentaje del total producido (cerca de un 6 %) es vendido a nivel mundial, lo cual significa que el volumen de pérdidas es alarmante. De hecho, en España cerca del 95 % de las frutas

consumidas tiene defectos de sabor y textura (ClubDarwin.Net, 2013), razón por la cual se venden en compuestos procesados que aumentan la vida útil de la fruta y se pueden ofrecer por fuera de cosecha. Muchos granjeros, campesinos y productores alrededor del mundo viven de la producción y procesamiento de frutas y verduras, con volúmenes de 730 millones de toneladas de frutas y 860 millones de hortalizas en el 2012, de acuerdo con estudios del Servicio de Información del sector Agrícola (AMI) en Bonn, Alemania (ClubDarwin.Net, 2013).

La producción mundial de fruta tropical es de alrededor 82 millones de toneladas (2014), según estimaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). El 78 % corresponde a frutas principales (mango, piña, aguacate y papaya) y el 22 % a las secundarias (lichi, rambután, guayaba) (ValenciaFruits.com, 2012). El procesamiento de la manzana para obtener pulpa rica en pectina y polifenoles, genera como residuo principal la cáscara, la cual también contiene importantes cantidades de estos compuestos. Otros obtenidos de la cáscara y la pulpa de manzana son catequinas, hidroxycinamatos, procianidinas y quercetín y fletín glucósidos (Schieber, Keller, y Carle, 2001).

El procesamiento de la uva (*Vitis* sp., vitaceae), la segunda fruta más cultivada en el mundo con una producción aproximada de sesenta toneladas, genera principalmente pulpa, semillas y cáscaras, particularmente en la industria del vino. De los residuos de su procesamiento se puede obtener etanol, ácido cítrico, tartratos, hidrocolides, fibra dietaria y aceite de las semillas (Bravo y Saura-Calixto, 1998). De la pulpa se obtienen compuestos fenólicos como el estilbeno, flavonoles, glucósidos, catequinas, ácidos fenólicos, antocianinas y algunos alcoholes. Otro tipo de compuestos producidos a partir de las proantocianidinas de tipo poliméricas al ser tratadas con cisteamina, son conjugados del aminoetil-flavan-3-ol (Torres y Bobet, 2001). La recuperación de los compuestos fenólicos provenientes de la uva y del vino rojo es muy importante y muchos investigadores se han concentrado en este aspecto, pues ya se ha demostrado en gran medida que estos compuestos fenólicos tienen gran capacidad antioxidante. Incluso, las semillas de la uva son ricas en compuestos polifenólicos como las procianidinas, también con poder antioxidante (Jayaprakasha, Singh y Sakariah, 2001).

Los residuos de los cítricos, como la cáscara de la lima, son conocidos por su alto contenido de fibra dietaria y flavonoides como la hesperidina, la narirutina, la naringina y la eriocitrina, presentes también en la cáscara y en fracciones líquidas de los cítricos (Mouly, Arzouyan, Gaydou y Estienne, 1994). Las semillas y las cáscaras son excelentes antioxidantes (Bocco, Cuvelier, Richard, y Berset, 1998).

De la producción de jugo de piña (*Ananas comosus* L. Merr., Bromeliaceae) se obtiene el bagazo, un residuo sólido que contiene considerables cantidades de sucrosa, almidón y hemicelulosa, materias primas importantes para la producción de etanol (Nigam J., 2000). De la fruta madura se obtiene la enzima proteolítica bromelina y del jugo y los residuos del procesamiento del jugo de piña se han obtenido antioxidantes cuyas estructuras han sido bien establecidas (Wrolstad y Ling 2001).

El látex se obtiene como subproducto de la producción de papaya (*Carica papaya*), del cual se recupera la papaína, una enzima proteolítica que se utiliza para el ablandamiento de carnes. De las semillas se extrae aceite, aunque bajo en contenido de ácidos grasos poliinsaturados; sin embargo, las semillas a las cuales se les ha retirado el aceite, son ricas en proteína y fibra crudas (Jargtiani, Chan y Sakai, 1988).

El banano (*Musa paradisiaca* L., Musaceae) es uno de los cultivos más importantes y extendidos del mundo. Está presente en todas las regiones tropicales y reviste una importancia fundamental para las economías de muchos países en desarrollo. Es el cuarto cultivo alimentario más importante después del arroz, el trigo y el maíz. Su comercialización en mercados locales proporciona ingresos y empleo a las poblaciones rurales y su producción mundial se tasa en 99 millones de toneladas (2001) con un área cultivada de nueve millones de hectáreas (FAO, 2004). Cerca del 30 % de la fruta lo compone la cáscara, de la cual se han obtenido carotenoides xantofílicos esterificados con miristato, laurato, palmitato y caprato (Subagio, Morita y Sawada, 1996). Además, es reconocida como un sustrato rico en energía proveniente de los carbohidratos (Someya, Yoshiki y Okubo, 2002). De mil plantas de banano se pueden obtener entre veinte y veinticinco toneladas de pseudotallo, materia prima de la cual se puede extraer hasta el 5 % de almidón comestible (Annand y Maini, 1997). De la flor se han obtenido antocianinas en buena cantidad (delfinidina, cianidina, pelargonidina, peonidina, petunidina y malvadina), que fueron evaluadas como colorantes naturales alimentarios (Pazmino-Duran, Giusti, Wrolstad y Gloria, 2001).

Otro cultivo de frutas tropicales mundialmente importante es el cultivo del mango (*Mangifera indica* L., Anacardiaceae), cuyos principales países productores son India, Tailandia y México. La FAO estima que la cosecha de mango ronda las 844.246 toneladas (2014) y los principales consumidores son Estados Unidos y la Unión Europea (ValenciaFruits.com, 2012). Alrededor de un 50 % de la fruta, al ser procesada, se convierte en residuos que corresponden principalmente a

cáscara y semilla. La almendra de la semilla del mango es una fuente de aceite comestible con gran contenido de ácidos grasos y triglicéridos –similar al de la manteca de cacao–, así como de compuestos antioxidantes del tipo fenólicos y fosfolípidos. Entre los compuestos fenólicos se encuentran el ácido gálico y el elágico y algunos galatos (Puravankra, Boghra y Sharma, 2000). También se ha considerado la almendra de la semilla como una buena fuente de fibra dietaria gracias a sus compuestos polifenólicos extraíbles (Larrauri, Ruperez, Borroto y Saura-Calixto, 1996).

Del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill., Solanaceae) se produce el jugo y la pasta vegetal, importantes en el mundo por su amplio consumo. Durante su producción se genera un residuo conocido en esta industria como orujo de tomate, que consiste básicamente en un producto seco y crujiente de la piel y de las semillas de esta solanácea, utilizado en la preparación de ensilados animales junto con la paja de arroz, para mejorar sus propiedades nutricionales (Mannetje, 2001). Las semillas constituyen aproximadamente el 10 % del total de la fruta y el 60 % de los residuos del tomate y son una excelente fuente de proteína (35 %) y grasa (25 %) (Avelino, Avelino, Roseiro y Collaco, 1997). Las semillas de tomate han sido ampliamente estudiadas por su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido linoleico (Askar y Treptow, 1998). Otro compuesto que se encuentra en la fracción insoluble del tomate, especialmente en la piel, es el licopeno, un carotenoide responsable del color rojo de la fruta (Sharma y Maguer, 1996).

La producción de jugos y mezclas de la zanahoria (*Daucus carota* L., Apiaceae) genera como residuo la oruja de zanahoria, en la cual se encuentran compuestos muy valiosos como carotenos, ácido urónico y algunos azúcares. El orujo de zanahoria se utiliza normalmente para alimentación animal y como fertilizante. Puede contener hasta dos gramos de carotenos por kilogramo de materia seca de orujo según las condiciones de procesamiento, razón por la cual representa una excelente fuente de carotenos.

El procesamiento de la papa para la obtención de almidón genera como residuo la cáscara, cuyos extractos acuosos son una rica fuente de compuestos fenólicos entre los que se encuentran el ácido clorogénico, el ácido gálico, el ácido cafeico y el ácido protocatechuico. Se ha demostrado que estos extractos poseen buena actividad antioxidante y antibacteriana frente a algunas especies de bacterias (Rodríguez de Sotillo, Hadley y Wolf-Hall, 1998).

La agroindustrialización de la cebolla (*Allium cepa* L., Alliaceae), produce un gran volumen de residuos al año en Europa (alrededor de 450.000 toneladas),

compuesto principalmente de la cáscara marrón, las hojas exteriores carnosas y las partes superior e inferior del bulbo, las cuales representan una importante fuente de compuestos saborizantes y de fibra. También son ricos en glicósidos, especialmente quercetín glicosidos, que corresponden al 85 % del total de los flavonoides presentes, metabolitos importantes para la salud por su acción antioxidante (Price y Rhodes, 1997).

La producción de azúcar a partir de caña (*Saccharum officinarum* L., Poaceae) y remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L. ssp. *Vulgaris* var. *Altissima* DOLL, Chenopodiaceae) origina como subproductos melazas –un jarabe resultante del proceso de cristalización, con alto contenido de carbohidratos fermentables (sucrosa, glucosa, fructosa)– y otros compuestos que no se precipitaron durante el proceso de purificación del jugo. Las melazas se usan principalmente como fuente de carbono en procesos fermentativos para la producción de alcohol, ácido cítrico, L-lisina y ácido L-glutámico (Higginbotham y McCarthy, 1998). Otro subproducto es el bagazo (el mayor subproducto en volumen) cuya aplicación principal es como combustible y fuente de pentosanos para la producción de furfural (Delavier, 1998). La pulpa, en conjunto con ensilados, se usa en algunos casos para alimentación animal (Harland, 1998).

Cereales como el trigo son una fuente importante de alimento animal (carbohidratos: 65 %-79 %; proteínas: 8 %-20 %; minerales: cenizas, 1 %-3 % y fibra dietaria). Los residuos de la molienda del trigo se componen de granos de trigo, polvo, malas hierbas y paja. Se utilizan en alimentación animal, pero se recomienda analizar su composición dado que esta varía considerablemente de acuerdo con su origen y procesamiento. La cascarilla de trigo contiene proteína, grasa, carbohidratos, fibra dietaria, cenizas y material extraño.

Los residuos de la extracción de aceite de oliva generalmente corresponden a aguas residuales con alto contenido de compuestos antioxidantes, entre los que se encuentran derivados del hidroxitirosol. Su producción anual asciende a siete millones de toneladas por año. Esta mezcla contiene entre un 80 % y un 95 % de agua, 4 %-15 % de compuestos orgánicos (azúcares, compuestos nitrogenados, grasas, polifenoles, fibras, ácidos volátiles) y un 0,5 %-5 % de compuestos inorgánicos (sales de potasio y fosfatos). También se considera una fuente importante de pectina y de polisacáridos basados en dicho compuesto.

La soya, una leguminosa de propiedades apetecidas por su efecto benéfico en la salud, es procesada para obtener proteínas y leche de soya (Mateos-Aparicio, Redondo-Cuenca, Villanueva-Suárez y Zapata-Revilla, 2008). Durante el proce-

samiento se generan residuos ricos en fibra dietaria y polisacáridos en las semillas de la soya (Redondo-Cuenca, Villanueva-Suárez y Mateos-Aparicio, 2008).

Otro tipo de residuos son aquellos utilizados como fuentes alternativas de energía, cuyas ventajas son menor aporte de dióxido de carbono al efecto invernadero, mejor disposición de los residuos en lugar de disponerlos en el suelo sin ningún tipo de tratamiento, son fuente renovable de materia prima y principalmente, a diferencia de muchos cultivos que se utilizan como fuente de biocombustibles como el maíz, la soya y la caña de azúcar, no representan peligro para la seguridad alimentaria. Están compuestos principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina que se aprovechan para generar azúcares asimilables por los microorganismos –como la glucosa– y posteriormente fermentados para producir etanol y otros compuestos de interés cosmético, farmacéutico y alimentario.

Pretratamiento de los residuos

Para generar compuestos asimilables por los microorganismos es necesario hacer un pretratamiento que les permita consumir los azúcares y proteínas que se forman (Grande C., 2014). En el caso particular de producción de glucosa, es forzoso degradar la celulosa y hemicelulosa, lo que requiere a su vez destruir el complejo lignocelulósico que tiene una asociación tridimensional entre la lignina y la celulosa. Este paso es el más importante cuando se pretende obtener biocombustibles a partir de residuos lignocelulósicos, pues permite que los microorganismos obtengan los azúcares que utilizarán para la hidrólisis y producción de etanol.

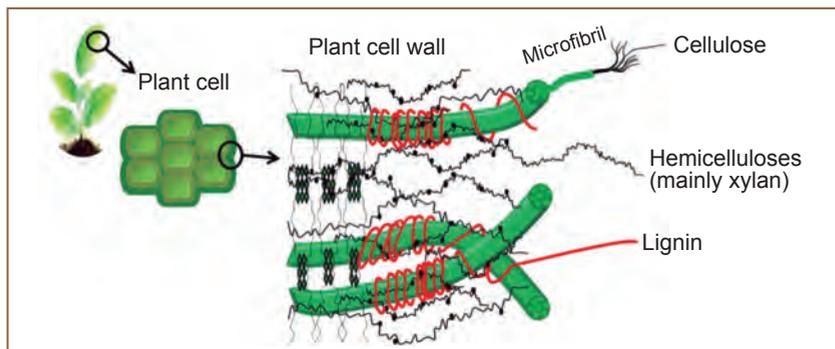
Se considera que un buen pretratamiento incluye el rompimiento de los enlaces de hidrógeno en la celulosa cristalina, las complejas asociaciones tridimensionales entre la lignina y la hemicelulosa y el alistamiento de la celulosa para su hidrólisis posterior por parte de los microorganismos, que incluye alcanzar una porosidad y área superficial necesarias para tal fin (Figura 17).

Hay una gran variedad de pretratamientos entre los que se incluyen los físicos (molienda, explosión de vapor, microondas y extrusión), los químicos (tratamientos con amoníaco, peróxido de hidrógeno, ácido peroxifórmico, hidróxido de sodio, ozonólisis, líquidos iónicos y solventes orgánicos), y los biológicos, como los tratamientos con hongos (*Bjerkendra adusta*, *Phanerochaete chysosporium*, *Ceriporiopsis subvermispora*), bacterias y enzimas como las ligninperoxidasas. Sin importar el pretratamiento empleado, es importante tener en cuenta que

durante su ejecución se pueden producir compuestos inhibitorios de procesos fermentativos, como los ácidos acético, levulínico y fórmico, y algunos derivados furánicos, como el 5-hidroxi-2-metil furfural, el furfural y otros compuestos de carácter fenólico.

Figura 17

Degradación del complejo lignocelulósico como efecto del pretratamiento



Fuente: Ratanakhanokchai, *et al.*, 2013; Tomme, Warren, y Gilkes, 1995.

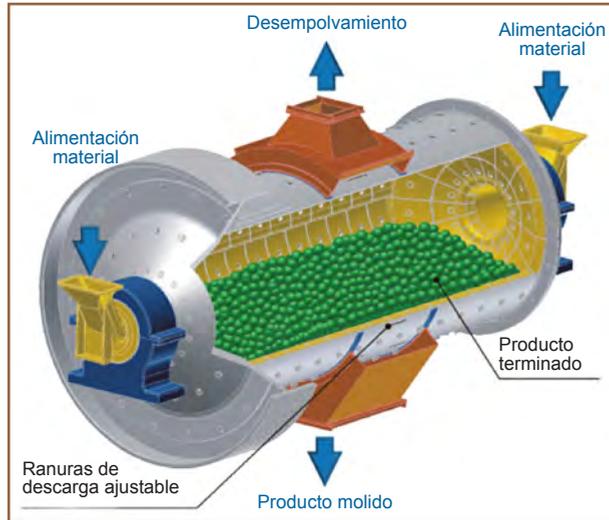
Pretratamientos físicos

Se utilizan con el fin de acondicionar la materia prima al reducir de tamaño las partículas, aumentar la superficie de contacto y disminuir el grado de polimerización y la cristalinidad de los polímeros, lo cual facilita el posterior proceso de hidrólisis por los microorganismos encargados. Su principal desventaja radica en que requieren un alto contenido de energía que eleva los costos de producción. A continuación se describen algunos de ellos.

Molienda

La molienda es el primer paso del pretratamiento de materias primas para la producción de etanol y de otros procesos para valorizar los residuos. Usualmente se lleva a cabo utilizando diferentes clases de molinos como el de bolas (Figura 18), el de barras, el de martillo y el de disco (Figura 19), entre otros, que determinarán el tamaño de partícula final obtenida. Requiere grandes cantidades de energía para su operación y genera diferentes rendimientos de azúcares fermentables. Algunos investigadores han tratado de solucionar estos inconvenientes utilizando molinos de disco húmedo que facilitan el proceso al utilizar menos energía, pero generan menores rendimientos de los azúcares fermentables respecto de la molienda con molinos de bolas (Hideno, *et al.*, 2009).

Figura 18
Molino de bolas y sus partes



Fuente: Gebr.Pfeiffer, 2014.

Figura 19
Molino de disco y sus partes



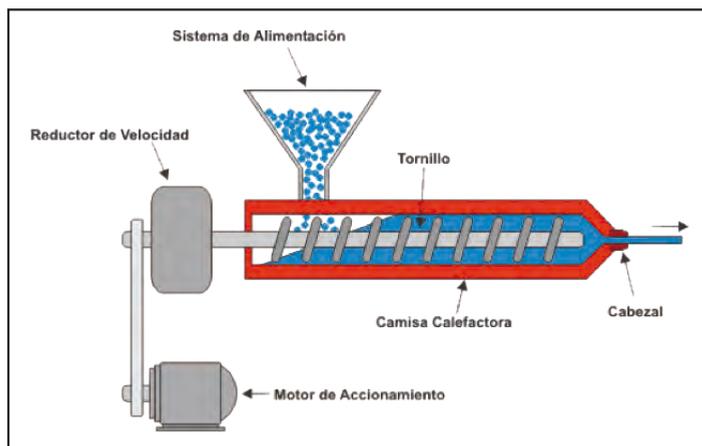
Fuente: Jongko, 2014.

Extrusión

Es un pretratamiento físico-térmico que permite cambios físicos y químicos en la materia prima. No genera efluentes ni residuos húmedos, se puede escalar fácilmente y adaptar una producción continua. Los tiempos de mezcla

y procesamiento son relativamente cortos y no hay formación de compuestos inhibitorios de fermentación como ácidos débiles y furfurales. Se basa en un rápido calentamiento con mezclado y cizallamiento de las materias primas que permite la adecuación de la materia prima (Figura 20).

Figura 20
Molino de disco y sus partes



Fuente: Textoscientíficos.com, 2005.

Explosión por vapor

Algunos autores consideran este método como la combinación de un tratamiento térmico (calentamiento a temperaturas entre 180 °C-240 °C), mecánico (cizallamiento por la descompresión repentina, evaporación del agua y rompimiento de la estructura lignocelulósica tridimensional) y químico (inducción de autohidrólisis de los enlaces glucosídicos). En síntesis, lo que se hace sobre la materia prima lignocelulósica es un calentamiento con vapor de agua y presurización (20-50 bar, 180 °C-240 °C) por unos minutos, seguido de una repentina despresurización hasta alcanzar la presión atmosférica y de la evaporación del agua condensada, lo que genera el rompimiento de las asociaciones lignina-celulosa. Normalmente, la hemicelulosa se descompone en ácido urónico y ácido acético, que a su vez facilitan la descomposición de la lignina y la hemicelulosa.

En este pretratamiento es importante separar la lignina del resto de los compuestos generados, especialmente cuando se pretende utilizar el material generado en la industria del papel o en la producción de químicos, para elevar su pureza. Esta separación se puede llevar a cabo utilizando extracción con solventes, técnica que aprovecha las diferentes solubilidades de los compuestos químicos.

Este método no genera efluentes con compuestos contaminantes, consume baja cantidad de energía comparado con los tratamientos de molienda y permite mayor acceso de la celulosa por parte de las enzimas. Sin embargo, la presencia de ácidos orgánicos producidos por la degradación de la hemicelulosa y de agua para facilitar la degradación de los monosacáridos en furfurales y otros compuestos inhibitorios de fermentación, disminuye su aplicabilidad.

Este pretratamiento se ha aplicado para el acondicionamiento de tallos de maíz en combinación con *Phellinus baumii*, paja de arroz mediante un proceso semicontinuo a escala piloto (Chen, Tsai, Lin, Tsai, y Hwang, 2013), rastrojo de maíz por medio de la combinación de la extrusión con la explosión con vapor (Chen, Zhang, Zhang, Zhang y Huang, 2014) y el tratamiento del bagazo de la caña de azúcar en conjunto con delignificación alcalina, entre otros procesos, lo que demuestra su versatilidad.

Microondas

El tratamiento con microondas es una forma alternativa de degradar la estructura lignocelulósica. Presenta algunas ventajas sobre el calentamiento convencional, pues ocurre de manera directa sobre las moléculas cuando estas vibran por la alineación de los dipolos producida la aplicación de un campo eléctrico y no por transferencia de calor, como ocurre en el calentamiento convencional. Ello se traduce en un menor gasto de energía, períodos más cortos de procesamiento, un calentamiento más uniforme y un debilitamiento más eficiente de la estructura tridimensional.

Tratamiento hidrotérmico

Este procedimiento se conoce con los nombres de autohidrólisis (Tortosa, Rubio, y Demetrio, 1995), hidrotermólisis (Pinkowska, Wolak y Zlocinska, 2011), extracción acuosa y licuefacción (Heitz, *et al.*, 1986) y pretratamiento hidrotérmico (Kubikova, Zemann, Krkoska y Bobleter, 1996), entre otros, los cuales reflejan el carácter extractivo que facilita la reacción de hidrólisis de la hemicelulosa, la lignina y la celulosa. Este pretratamiento utiliza agua en condiciones críticas (temperatura de 200 °C y presiones por encima de 5 MPa por un período de cinco minutos) y presenta la desventaja de formar compuestos inhibidores de microorganismos, como el furfural, y algunos ácidos carboxílicos, como los ácidos acético y succínico, que no permiten la fermentación de azúcares; (Tahezadeh y Karimi, Acid based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review, 2007); (Grande C. D., 2014). En este pretratamiento no se utilizan solventes diferentes de agua, etanol o CO₂ y por lo tanto no se generan sustan-

cias peligrosas ni residuos acuosos contaminantes. La hemicelulosa se degrada a azúcares fermentables con buenos rendimientos, no se afectan los equipos de trabajo puesto que los pH en los que se trabaja no son ácidos y la separación de la lignina y de la celulosa se facilita por la alteración de sus propiedades debido al tratamiento. En general, es un tratamiento ambientalmente amigable que no genera residuos peligrosos y se puede escalar con relativa facilidad. En algunos casos se han empleado condiciones supercríticas para extraer compuestos de alto valor agregado a partir de residuos agroindustriales en combinación con la hidrólisis de material (Vardanega, Prado y Meireless, 2014).

Pretratamientos químicos

En estos pretratamientos se utilizan dióxido de azufre (SO_2), dióxido de carbono (CO_2), ácido sulfúrico (H_2SO_4) y álcali, compuestos que facilitan la destrucción del complejo lignocelulósico con buenos rendimientos. Su principal desventaja es el alto costo operativo, ya que requiere maquinaria resistente a la corrosión y los efluentes generados deben ser tratados por ser contaminantes. Es muy empleado en la industria papelera, que constantemente está buscando la recuperación de la celulosa. Veamos algunos de ellos:

Pretratamiento ácido

Este pretratamiento se lleva a cabo utilizando ácidos diluidos a temperaturas altas o ácidos concentrados a temperaturas bajas (Taherzadeh y Karimi, 2008), con el fin de hidrolizar los compuestos hemicelulósicos para la producción de azúcares fermentables liberando así la celulosa. Presenta buenos rendimientos de conversión, pero a su vez se genera compuestos inhibidores de la fermentación (derivados furánicos) y tiende a ser muy corrosivo (especialmente en soluciones ácidas concentradas), aunque requiere menor cantidad de energía que otros pretratamientos de carácter físico (Sun y Cheng, 2002).

En la industria se utilizan los pretratamientos con ácidos diluidos con el fin de evitar la degradación de los compuestos y la formación de inhibidores de fermentación. Los ácidos sulfúrico, clorhídrico, nítrico y fosfórico son usados en este tipo de pretratamiento (Grande C., 2014), aunque existen reportes con los ácidos peracético y peroxifórmico que se generan *in situ* al mezclar peróxido de hidrógeno con ácido fórmico a 80 °C. Cuando se utiliza en condiciones diluidas, las concentraciones se ubican en un rango entre 0,1 % y 3 % con temperaturas que oscilan entre los 100 °C y los 200°C. Por ejemplo, Hsu *et al.* (2010), demostraron rendimientos de obtención de azúcares hasta del 83 % luego de hidrolizar enzimáticamente, al tratar residuos lignocelulósicos entre

uno y cinco minutos y temperaturas alrededor de 180 °C (Hsu, Guo, Chen y Hwang, 2010). El ácido peracético fragmenta la lignina, pero su uso es peligroso al generar compuestos explosivos (Yin, *et al.*, 2011). Ácidos orgánicos como los ácidos fumárico y maléico también han sido empleados para tratar paja de trigo y su capacidad de hidrólisis fue comparable con la del ácido sulfúrico (Kootstra, Beeftink, Scott, y Sanders, 2009).

Pretratamiento con álcali

Utiliza compuestos alcalinos como los hidróxidos de sodio, potasio, calcio y amonio a temperaturas relativamente bajas y tiempos prolongados, lo que hace que la estructura de la hemicelulosa se degrade y libere cadenas de lignina y celulosa que destruyen su estructura cristalina y causan hinchamiento de sus cadenas, facilitando así la depolimerización. Normalmente se degradan los grupos sustituyentes tipo ácido urónico en la hemicelulosa y se libera lignina, lo que facilita la penetración de las enzimas a las hemicelulosas y a las celulosas.

En este pretratamiento se gelifican las celulosas y hemicelulosas (Mosier, *et al.*, 2005) con menos solubilización de la celulosa y la lignina (Carvalho, Duarte y Girio, 2008), lo cual lleva al rompimiento de los enlaces tipo éster entre la lignina y el xilano generando con ello la destrucción de la estructura tridimensional (McIntosh y Vancov, 2010). Presenta la desventaja de mayores tiempos de tratamiento (incluso días en algunos casos) y exige disponer adecuadamente los efluentes que se generan. Algunos estudios han reportado rendimientos de producción de glucosa aceptables (65 %) y de remoción de xilano (46 %) a partir del pretratamiento de paja de soya con hidróxido de sodio a temperatura ambiente (Wan, Zhou y Li, 2011).

Pretratamiento con ozono

El ozono es un oxidante muy fuerte que facilita la deslignificación, procedimiento que ocurre en condiciones suaves (temperatura y presión ambiente) y no genera subproductos que afecten la fermentación (Sun y Cheng, 2002). Sin embargo, hay poca investigación en relación con la producción de etanol con material lignocelulósico pretratado con ozono. Adicionalmente, los costos de este pretratamiento podrían ser elevados, ya que requiere cantidades considerables de ozono (Sun y Cheng, 2002). Algunos autores han revelado que luego del pretratamiento con ozono la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico tuvo un rendimiento mucho mayor (García-Cubero, González-Benito, Indacochea, Coca y Bolado, 2009).

Pretratamiento con peróxido de hidrógeno

En este pretratamiento se utilizan soluciones alcalinas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a temperaturas mayores a los $100\text{ }^\circ\text{C}$, con el fin de generar especies aniónicas nucleofílicas –como el anión hidroperóxido– que reaccionan con la lignina presente en los residuos y son responsables de la solubilización de la lignina y la hemicelulosa. Sin embargo, a estas temperaturas el peróxido de hidrógeno se descompone en especies radicalarias más reactivas, como los radicales hidroxilo (OH) o el anión superóxido (O_2^-), descomposición que se debe controlar usando agentes quelantes. Este es un proceso costoso y la investigación más reciente se ha enfocado en la disminución de las temperaturas de operación para llevarlo a cabo.

Pretratamiento con solventes orgánicos

Con esta técnica se pretratan residuos ricos en material lignocelulósico a fin de disminuir el contenido de lignina a través de su solubilización en solventes orgánicos como el etanol, el metanol, la acetona y el etilenglicol, entre otros (Thring, Chornet y Overend, 1990). En ocasiones, se utiliza una mezcla de los solventes y agua a temperaturas elevadas ($160\text{ }^\circ\text{C}$ – $200\text{ }^\circ\text{C}$), suficientes para solubilizar gran parte de la lignina y parte de la hemicelulosa, mientras la celulosa se mantiene sin disolver. Al final del pretratamiento se recupera el solvente mediante destilación.

Una de sus desventajas es la exigencia de optimizar todo el proceso para disminuir sus costos operativos; su ventaja es que no produce compuestos inhibidores de la fermentación, como ocurre en otros pretratamientos químicos (especialmente el uso de ácidos concentrados). También se ha reportado el uso de catalizadores para mejorar el rendimiento de la deslignificación; (Aziz, Sarkanen y Tappi, 1989).

Líquidos iónicos

Este pretratamiento se basa en sales orgánicas compuestas de cationes orgánicos de tamaño grande y aniones inorgánicos pequeños, con un punto de ebullición menor de $100\text{ }^\circ\text{C}$ y una capacidad única de disolver al mismo tiempo carbohidratos y lignina, por lo cual ha recibido mucha atención en diversas investigaciones (Tan, Lee y Mohamed, 2010).

Los factores más importantes que afectan la disolución y la separación de la lignina son el tamaño de las cadenas carbonadas del catión, la presencia de grupos hidrofóbicos y su disposición espacial, y el tamaño y la distribución de la carga negativa del anión, todo lo cual afecta la interacción entre el material

lignocelulósico y los líquidos iónicos. La celulosa se puede disolver siempre que los líquidos iónicos contengan cloruro, formiato, acetato o alquilfosfonatos como aniones, que contribuyen a la formación de enlaces de hidrógeno fuertes. Los aniones no hidratados forman enlaces de hidrógeno con los protones hidroxílicos de los azúcares, permitiendo con ello la degradación del complejo lignocelulósico.

Entre los líquidos iónicos más comunes tenemos el cloruro de 1-alil-3-metilimidazolio ([AMIM]Cl), el acetato de 1-etil-3-metilimidazolio ([EMIM]Ac), el cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio ([BMIM]Cl) y el fosfato de 1-etil-3-metilimidazolidietilo ([EMIM]DEP) con una buena capacidad para disolver la celulosa.

Pretratamientos biológicos

En este tipo de pretratamientos se utilizan microorganismos para tratar lignocelulósicos y mejorar la accesibilidad a la celulosa (Carvalho F, 2008). Los microorganismos degradan la lignina y la hemicelulosa; la celulosa permanece intacta debido a su mayor resistencia a la degradación microbiana en relación con los otros componentes del complejo lignocelulósico (Hendriks y Zeeman, 2009). Entre los microorganismos más destacados para este fin se encuentran los hongos de la podredumbre blanda blancos, grises y cafés, entre los cuales se destacan los primeros. De los tres polímeros el más resistente es la celulosa, por lo cual se degrada en menor cantidad frente a los otros dos (Domínguez, Romaní, Alonso, Parajó y Yáñez, 2014).

Estos pretratamientos son de alto interés gracias a su inocuidad, pues no utilizan agentes químicos ni altos requerimientos energéticos. Sin embargo, sus largos tiempos de procesamiento hacen que estos métodos no sean de elección a escala industrial. También se usan para la remoción efectiva de compuestos que disminuyen la producción de biogás en la digestión anaeróbica al ser antimicrobiano. En un estudio se llevó a cabo la fermentación en estado sólido de cáscaras de naranja utilizando cepas fúngicas de *Sporotrichum*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* y se encontró una mejora en la disponibilidad de los componentes para la hidrólisis enzimática y una reducción del nivel de las sustancias antimicrobianas (Taherzadeh y Karimi, 2008).

Enriquecimiento proteico a partir de residuos agroindustriales

Introducción

La producción agrícola y agroindustrial y los residuos urbanos son las principales actividades contaminadoras del medioambiente que hoy en día amenaza al mundo. Entre los residuos encontramos rechazos de la industria alimentaria, pesquerías, industria de la caña de azúcar y residuos lignocelulósicos, entre otros, los cuales, con tecnologías apropiadas de conversión y tratamiento podrían transformarse en fuentes de alimentación para animales y humanos.

Enormes volúmenes de residuos biodegradables que se fermentan fácilmente se producen a diario y no son aprovechados como fuentes de energía, alimentación animal y humana o para la producción de compuestos y productos de alto valor agregado. En Barcelona, por ejemplo, se producen noventa toneladas por día durante doscientos cincuenta días al año, de residuos provenientes de frutas y verduras descompuestas (Mata-Álvarez, Llabrés, Cecchi y Pavan, 1992), y en la India se producen 5,6 millones de toneladas por año de residuos que luego son arrojados en las afueras de las ciudades sin control alguno. En Túnez se producen 180 millones de toneladas al mes de este tipo de residuos (Bouallagui, Ben Cheikh, Marouani y Hamdi, 2003). En general, se estima que un 30 % de la producción total agrícola y de la industria de alimentos en el mundo se pierde, lo que significa un volumen de residuos alarmante para la estabilidad y salud de los seres vivos en el mundo (Ugwuanyi, McNeil y Harvey, 2009).

Figura 21
Residuos pesqueros



Fuente: <http://www.compostandociencia.com/2015/03/composts-de-residuos-pesqueros-aumentan-la-produccion-en-tomate-y-lechuga/>

Ahora bien, estos residuos representan una fuente inagotable de biomasa para la producción de alimentos si se aplican los procedimientos adecuados para su enriquecimiento proteico y se adaptan a los requerimientos individuales de cada residuo y de los procesos en los cuales se originan, todo ello el fin de producir alimentos seguros para el consumo humano y animal (GRAS) y ricos nutricionalmente. Con este fin se pueden aplicar diferentes tecnologías, pero las más reconocidas son la fermentación en estado sólido (SSF), el ensilaje y la producción de proteína unicelular.

Un aspecto importante que se debe considerar en las tecnologías que se diseñen para el aprovechamiento, reutilización y adición de valor de los residuos, es el proceso desde el cual estos fueron obtenidos, pues la contaminación ambiental causada por el uso de pesticidas, herbicidas, fertilizantes y agroquímicos sintéticos en la agricultura intensiva, con el fin de analizar la viabilidad de estas materias primas o para diseñar estrategias que permitan su descontaminación. La agricultura y la agroindustria impactan a los ríos, lagos, mares, suelos, cultivos, animales, atmósfera y en general, a todos los ecosistemas terrestres, a través de la generación de lixiviados, residuos sólidos y líquidos, efluentes, gases, entre otros, que deben ser tratados adecuadamente (Seadi y Holm-Nielsen, 2004).

Es importante resaltar que los subproductos animales pueden ser una alternativa importante en la dieta animal como adición de valor. La manera como estos residuos se podrían adicionar es siendo procesados a partir de una fermentación o hidrólisis y analizar en detalle la composición química y nutricional. La adición de los hidrolizados proteicos en las piscinas de cultivo de peces y camarones puede aumentar la velocidad de producción, aspecto fundamental para los productores (Carvalho, Sa, Oliva-Teles y Bergot, 2004). Por otra parte, la cantidad de compuestos que se pueden incorporar en la dieta de peces y otros animales derivados de estos residuos pesqueros es muy grande, y son los compuestos anti-

oxidantes, antimicrobianos y otros compuestos funcionales los de mayor interés (Choi, Sabikhi, Hassan y Anand, 2012). Por estos aspectos se considera que los residuos pesqueros son una fuente muy interesante de compuestos de alto valor agregado para ser incluidos en las dietas animales y mejorar su nutrición, siempre y cuando se encuentren dentro de las regulaciones propias de cada país.

Ensilaje

El ensilaje es un método para preservar alimentos a partir de la fermentación anaeróbica facilitada por bacterias ácido-lácticas, con el fin de aumentar la estabilidad del sustrato y así estar disponible durante todo el año gracias al control de la contaminación por microorganismos patógenos (Gollop, Zakin, y Weinberg, 2005). Durante el proceso, las bacterias rompen los enlaces de la celulosa y hemicelulosa y liberan azúcares que sirven de nutrientes para llevar a cabo la fermentación ácida, cuyo producto final son compuestos ácidos que disminuyen el pH por debajo de 4,0, evitando así el crecimiento microbiano y la contaminación del alimento. Este proceso también se puede facilitar inoculando enzimas y bacterias lácticas (Colombatto, Mould, Bhat, Phipps, y Owen, 2004).

Para la producción de ensilaje (Figura 22) se puede utilizar trigo, cebada, hierba y pasto, alfalfa, maíz y sorgo, así como residuos de la industria alimentaria, cervecera y de cultivos como la remolacha, la caña de azúcar, la yuca, etc. Se cree que las bacterias también producen bacteriocinas capaces de impedir el crecimiento de otras bacterias indeseadas (Ugwuanyi *et al.*, 2009).

Figura 22
Bolsa de silo para forraje



Fuente: <http://www.agroaut.com.ar/old/insumosAgropecuarios/siloBolsa.htm>

Una adecuada producción de ensilaje permite el crecimiento prácticamente exclusivo de bacterias lácticas, lo que ayudará a mejorar las características de

palatabilidad y sabor de la masa final así como su pH, gracias a la retención de la mayoría de nutrientes que evita el crecimiento de bacterias peligrasas.

El ensilaje es fundamental para preservar alimentos y mantenerlos disponibles –especialmente durante el verano y el invierno en los países con estaciones– para animales rumiantes, mejorando así la sostenibilidad y la productividad de las granjas y haciendas. Los principales cultivos utilizados para producir ensilajes para el ganado son la alfalfa, el maíz y el sorgo, por su alto contenido de nutrientes, fibra y aminoácidos esenciales. Estados Unidos y Francia consumen casi en su totalidad el ensilaje producido en la alimentación de ganado (Ugwuanyi *et al.*, 2009) y en Dinamarca la producción de ensilaje de maíz se incrementó en un 70 % entre 1990 y 2008, lo que lo convierte en el producto de ensilaje más importante de la economía de ese país por encima del ensilaje de hierbas y pasto (Storm, Kristensen, Raun, Smedsgaard y Thrane, 2010). Mundialmente se considera que entre un 50 % y un 75 % de la dieta diaria del ganado bovino está constituida por ensilaje de maíz (Driehuis, Spanjer, Scholten y Te Giffel, 2008), con un consumo diario alrededor de 26 kilogramos de materia seca.

El ensilaje comienza con la selección de la biomasa (sustrato) y la acción degradante de las bacterias aeróbicas. Estas atrapan el oxígeno y dan inicio a una fase anaeróbica durante la cual las bacterias lácticas consumen los carbohidratos que requieren para su crecimiento y desarrollo. En esta fase se debe manejar con precaución la producción de humedad y calor, ya que podría afectar la estabilidad de las bacterias lácticas y del producto en sí. Los productos proteínicos se podrían degradar, lo que generaría la pérdida de nutrientes esenciales y producción de amoníaco (Slottner y Bertilsson, 2006) citado por (Ugwuanyi *et al.*, 2009). Algunos residuos que se pueden afectar de esta manera son el estiércol, los residuos de pescado, los provenientes de mataderos y de cultivos de maíz, trigo, tomate, pulpas frutales y cítricos.

Una manera de facilitar la acidificación rápida del medio es adicionando inóculos de bacterias lácticas y azúcares fermentables, lo que genera mayor producción de ácido láctico y disminuye el pH del sustrato. Con esto último se protegen las fermentaciones ácidas hasta que se alcancen niveles de pH suficientemente bajos para evitar el crecimiento de bacterias externas. Por supuesto, la duración de esta etapa varía de acuerdo con la naturaleza del sustrato y la concentración de nutrientes, azúcares y población bacteriana láctica. Este proceso favorece la conservación de los alimentos y el uso de subproductos ricos en nutrientes para alimentación animal y también el enriquecimiento proteico del sustrato siempre y cuando se adicione una fuente externa de nitrógeno mineral (Ugwuanyi *et al.*, 2009).

Si se presentan pérdidas en el proceso estas son difíciles de estimar debido a los muchos aspectos que se deben tener en cuenta, como cuidado veterinario y médico, rendimientos bajos y pérdida de materias primas. Una condición de cuidado especial que se debe considerar es la aparición de nuevas enfermedades por cuenta de la interacción entre el hombre, los animales y los microorganismos en razón a los cambios en la producción agropecuaria (mayor cercanía a centros urbanos, mayor cantidad de residuos y agricultura intensiva, entre otros).

En este sentido, el control de ataques de patógenos se debe hacer desde el principio de la cadena alimentaria para identificar los posibles riesgos de manera temprana. Dunière, Sindou, Chaucheyras-Durand, Chevallier y Thévenot-Sergentet (2013), publicaron un artículo de revisión que se centra en los microorganismos tanto patógenos como útiles para el procesamiento de los sustratos, presentes en el ensilaje de maíz, con el fin de visualizar mecanismos de prevención basados en buenas prácticas de manufactura, aditivos para el ensilaje y analizar el impacto de la degradación de los productos de ensilaje para la salud humana y animal.

Residuos de pesqueras

Los subproductos de la actividad de la pesca se consideran una amenaza seria cuando son dispuestos de manera inadecuada, toda vez que pueden servir de fuente de desarrollo de microorganismos patógenos para el hombre y los seres vivos. Esta industria, que incluye la producción de camarón y crustáceos, origina una cuantiosa cantidad de subproductos, productos de descarte, rechazo y deterioro (Ugwanyi *et al.*, 2009). Por esta razón, diferentes gobiernos incluyen en sus planes de desarrollo aspectos relacionados con el aprovechamiento integral y la mejor disposición de estos residuos, mediante convocatorias nacionales para la presentación de proyectos de investigación enfocados en paquetes tecnológicos que permitan implementar estas buenas prácticas y el desarrollo de la tecnología necesaria para este fin.

Este aprovechamiento es fundamental porque allana el camino para el desarrollo social gracias a la creación de fuentes de empleo e impacta favorablemente la economía de las regiones y países en general. Una forma de llevar a cabo este aprovechamiento es mediante el acondicionamiento de los subproductos de la actividad pesquera a través de procesos de ensilaje (Figura 23), un producto líquido o semilíquido que se obtiene a partir del pescado entero, subproductos o residuos del procesamiento de pescado que facilitan la formulación de alimentos de bajo costo y de alto valor nutricional.

Figura 23
Ensilado de pescado



Fuente: <http://blogdelatecnologiaadmon.blogspot.it/2010/06/salida-la-salvajina.html>

Los residuos de los crustáceos y moluscos pueden ser aprovechados de diferentes formas, entre las cuales se destacan la obtención de carbonato de calcio –una fuente segura de calcio asimilable por los animales, lo que los convierte en una fuente económica accesible por la industria alimentaria–, pigmentos como la astaxantina –importante para la coloración roja de cultivos de salmón, tilapia y cachama– y proteínas y biopolímeros como el quitosano, a partir del exoesqueleto de crustáceos, con una gran variedad de aplicaciones en las industrias textil, alimentaria, farmacéutica y en agricultura.

Otros productos son harina de pescado (Figura 24), pastas de pescado, aceites de pescado (ricos en ácidos grasos con contenido omega-3), derivados del tejido conectivo para la industria cosmética, insulina, esteroides, protamina, y escamas (empleadas en la preparación de bisutería).

Esta materia prima se ha subutilizado a tal punto que una tercera parte de los rellenos sanitarios de industrias pesqueras corresponde a materias primas que podrían tener aplicaciones de mayor agregado y un menor impacto ambiental (Evers y Carroll, 1996; Venugopal y Shahidi, 1995). Se considera que alrededor de 32 millones de toneladas de residuos pesqueros se acumulan en el mundo al año (Kristinsson y Rasco, 2000), aunque cabe anotar que buena parte de ellos se utiliza en la producción de comida para peces y alimentos para animales y aves y el resto se pierde como desecho sin ningún tipo de control y adecuación (Ugwuanyi *et al.*, 2009).

De acuerdo con una revisión llevada a cabo por Arvanitoyannis y Kassaveti (2008), los residuos de la actividad pesquera se pueden aplicar en campos como la alimentación animal, la producción de biodiésel y biogás, productos dietéticos a partir del quitosano, producción de pigmentos naturales como la astaxantina (importante en la coloración del salmón y otros peces), aplicaciones para empaque y recubrimiento de alimentos (a partir del quitosano), cosméticos (a partir de colágeno), aislamiento de enzimas, inmovilización de cromo, fertilizantes para el suelo y el mantenimiento de humedad en los alimentos (a partir de hidrolizados). En esta revisión se hizo especial énfasis en la normatividad de la Unión Europea alrededor del control y utilización de estos residuos y su correcta disposición. Los mismos autores publicaron un artículo de revisión en el cual discuten de manera específica algunos tratamientos y adecuaciones de residuos pesqueros y cárnicos para la producción de alimentación animal, generación de biogás y industrias de fertilizantes y abonos.

Figura 24
Esquema de obtención de aceite y harina de pescado



Fuente: Valenzuela B, Sanhueza C, y de la Barra D, 2012.

Su reutilización como posibles fuentes de alimentación de peces es una alternativa viable y económica de manejar, ya que como se ha definido alrededor del 60 % del costo total de producción se debe a procesos de alimentación (Ferraz De Arruda, Borghesi y Oetterer, 2007). De la misma manera, Dong, Elwinger, Lindberg y Ogle (2005) y Ngoan, An, Ogle, y Lindberg (2000) demostraron la posibilidad de obtener alimentos para patos y cerdos suplementados con residuos

de camarón y peces en lugar de soya como fuente proteica, lo que refuerza la idea de utilizarlos como fuente nutricional, generando así valor al reducir los costos de la producción al tiempo que se dispone más eficientemente de los subproductos de la actividad pesquera.

Por otra parte, se ha demostrado que estos residuos cuando son ensilados, pueden durar más tiempo debido a la protección contra la infección microbiana por parte de las bacterias lácticas incluso en presencia de otros residuos como paja, forraje y molasas, además de mejorar su aceptabilidad y facilidad de digestión de los animales que lo consumen como vacas, peces y cabras.

Proteína unicelular

El crecimiento poblacional ha generado una preocupación por la seguridad alimentaria y la búsqueda de fuentes alternativas de alimentos seguras y ambientalmente amigables. La proteína obtenida de manera segura y libre de patógenos de extractos de cultivos microbianos se conoce como proteína unicelular. Esta fuente proteica puede reemplazar fuentes tradicionales como la soya y el pescado y se suministra básicamente por la bioconversión de residuos agroindustriales, un medio seguro y económico para este fin.

Los residuos de la actividad pesquera se pueden utilizar para el cultivo de microorganismos (biomasa microbiana) casi con la misma efectividad que con medios comerciales como la peptona. Hidrolizados de las vísceras de bacalao (que corresponden a un 17 % del total de la biomasa de los peces) fueron empleados para cultivar *Lactobacillus plantarum*. Este medio contiene también peptonas (Horn, Aspmo y Eijsink, 2005).

En otra investigación se utilizó un flóculo proveniente del tratamiento microbiano de un efluente de una granja productora de tilapia, como fuente de alimentación para camarón y la capacidad nutricional de estos residuos se demostró tan efectiva como otras fuentes de alimentación (Kuhn, Boardman, Craig, Flick, y Mc Lean, 2008). En general, se han utilizado diferentes hidrolizados de pescado y camarón para el cultivo de microorganismos (Kurbanoglu, 2003; Kurbanoglu y Algur, 2002).

El acondicionamiento de residuos recalcitrantes altamente peligrosos provenientes de la acuicultura, posibilitó la obtención de este tipo de biomasa bacteriana (proteína unicelular), lo que demuestra su utilidad en el acondicionamiento de residuos peligrosos y altamente contaminantes para el medioambiente (Schneider, Sereti, Machiels, Eding y Verreth, 2006).

Las microalgas también han sido empleadas para el tratamiento de residuos de acuicultura –específicamente de efluentes de piscinas de cultivo– con miras a la alimentación de haliótidios, una familia de moluscos gasterópodos con una carne de exquisito sabor (Viera *et al.*, 2005).

Anbuselvi, Avinash y Jha (2015) reportaron la producción optimizada de proteína a partir de extractos de papa china y la utilización de hongos. El medio rico en nitrógeno favoreció la producción de proteína frente a medios ricos en carbono.

Lee, Logan, Terry y Spear (2015) demostraron la producción sostenible de SCP (Single Cell Protein) a partir de residuos de cervecería en tiempos en los que la producción pesquera está decayendo a nivel mundial. Estos investigadores estudiaron la respuesta tanto a nivel piloto como a escala industrial con residuos de cervecerías mediante una pirosecuenciación de todo el proceso, lo cual mostró que cada unidad se caracteriza por una única comunidad microbiana. La producción de SCP permitió el enriquecimiento de diazotrofas rizosféricas, alfaproteobacterias y betaproteobacterias incluso en el producto final, hasta un año posterior a la producción.

Por otra parte, la alimentación de vacas fue evaluada a partir de una fuente rica en proteína unicelular, la espirulina (*Spirulina platensis*), al igual que el efecto en la digestibilidad, con el fin de analizar la posibilidad de utilizar esta fuente de proteína en la alimentación de estos animales en lugar de otras como urea y sulfato de amonio. Se muestra bastante promisorio y con capacidad de aportar mayor contenido de nitrógeno (Panjaitan, Quigley, McLennan, Swain y Poppi, 2015).

Obtención de péptidos con capacidad antimicrobiana a partir del aprovechamiento de suero de leche y harina de chachafruto (*Erythrina edulis*)

Muchos hongos causan que los alimentos se deterioren, proceso que genera, además, la producción de micotoxinas, unas sustancias peligrosas para la salud humana toda vez que causan diversos desordenes gástricos, del hígado y varios tipos de cáncer (Grande, 2015). En el tratamiento de estos agentes infecciosos se han empleado fungicidas basados en métodos químicos cuya aplicación regular y constante ha generado resistencia en los hongos, amén de que persisten en el medioambiente y causan graves problemas de polución ambiental. Nuestro

grupo de investigación presentó hace poco un método alternativo y ecológicamente seguro para producir péptidos con capacidad fungicida y bactericida a partir del aprovechamiento del suero de leche y de la harina de chachafruto (*Erythrina edulis*).

Estos agentes patógenos se ven favorecidos cuando sus condiciones de reproducción son adecuadas (alto contenido de azúcares, elevada actividad de agua y daños en la estructura ocasionados por insectos, golpes y demás), lo que llevaría al deterioro directo de los alimentos con el riesgo inherente que ello conlleva (Grande, 2015). Entre las especies fúngicas más contaminantes de alimentos amiláceos se encuentran los hongos de las especies *Eurotium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monilia*, *Mucor*, *Endomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium* y *Rhizopus* (Coda *et al.*, 2008).

En el control de enfermedades como la antracnosis, el moho gris (*Coletotrichum gloesporoides*; *Botrytis cinérea*), perla de tierra, mildeos, mosca de la fruta, picudos y barrenadores, se utilizan fungicidas químicos como el dióxido de azufre, hidroxianilidas, anilino pirimidinas, dicarboximidias, carboxamidias, fenilpirroles y estrobilurinas, entre otros. Sin embargo, como se dijo previamente, estos agentes químicos además de su alta toxicidad, causan impacto y deterioro en el suelo y afectan a otras especies de plantas y de animales y al medioambiente sin ningún tipo de diferenciación, por lo cual se ha restringido su uso en los últimos años (Tripathi y Dubey, 2004).

Recientemente se ha explorado el uso de hidrolizados proteicos solubles en agua de frijón pinto (*Phaseolus vulgaris* cv.) y gérmenes de trigo (*Triticum* spp) y amaranto (*Amaranthus* sp.) obtenidos mediante fermentación, como ingredientes en formulaciones con actividad antifúngica, los cuales han presentado un alto grado de control del crecimiento fúngico y una estabilidad notable de los alimentos evaluados (Coda *et al.*, 2008; Rizzello *et al.*, 2009, 2011).

Por su parte, Padraigín *et al.* (2012) evidenciaron que los residuos de la industria pesquera son una excelente fuente de péptidos bioactivos; Dallagnol *et al.* (2012) informaron acerca de la capacidad de *Lactobacilos plantarum* para producir compuestos antifúngicos bioactivos utilizando quinoa (*Chenopodium quinoa*) como medio de fermentación. Igualmente, Albergaria *et al.* (2010), quienes evidenciaron la actividad antifúngica de péptidos producidos por *S. cerevisiae*.

Los péptidos bioactivos son cadenas cortas de hasta veinte aminoácidos que presentan actividad similar a las hormonas, con múltiples funciones fisiológicas a través de interacciones con receptores y funciones específicas dentro del organismo (Rasmussen *et al.*, 2007). Algunos péptidos presentan actividad antihi-

pertensiva (inhibidores de la ECA), otros son antitrombóticos y antioxidantes, entre otras funciones (Larga *et al.*, 2006). Entre los péptidos antimicrobianos se encuentran aquellos derivados de las leguminosas, la cebada y el trigo (Coda *et al.*, 2008). Las proteínas y péptidos antimicrobianos se clasifican según su función o estructura en quitinasas, glucanasas, tioninas, ciclofilínicas y tipo taumatina. Otras proteínas bien conocidas son las lectinas, inactivadoras de ribosomas, ribonucleasas y desoxirribonucleasas, peroxidadas e inhibidoras de proteasas.

Nuestro grupo presentó un trabajo relacionado con la inhibición de algunas bacterias (*B. Cereus*, *P. aureginosa*, *E. Coli*, *S. aureus*) y hongos (*Alternaria*, *Colletotrichum*, *Trichoderma* y *Fusarium*), patógenos de alimentos que causan desórdenes en el hombre, a partir de los productos de fermentación de los sustratos harina de chachafruto (*Erythrina edulis*), y suero de leche a partir de levaduras con capacidad proteolítica aisladas de kumis, carne y frutas, entre otras fuentes cuyo análisis proximal se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1

Análisis proximal de las materias primas empleadas como medio de producción de péptidos bioactivos.

SUSTRATO	HUMEDAD (%)	CENIZAS (%)	PROTEÍNAS (%)	GRASA (%)
Harina de Chachafruto	13,5	6,9	3,74	5,5
Suero de leche	92,89	8,43	28,1	0,044

Entre las cepas de bacterias utilizadas para medir la actividad antibacteriana de los péptidos están: *E. coli* ATCC 25922; *S. aureus* ATCC 6538-P; *P. Aeruginosa* ATCC 9027; *B. Cereus* ATCC 13061. Para su crecimiento se utilizó el medio Müeller-Hinton (Sharlau).

Para la evaluación antifúngica se utilizaron las cepas de las especies de hongos *Colletotricum*, *Alternaria*, *Trichoderma* y *Fusarium* en medio YPD, del cepario de hongos del laboratorio de fisiología vegetal de la Universidad del Valle.

En este estudio se evaluaron diversas fermentaciones en condiciones aeróbicas y con agitación constante durante diecinueve días. Los sustratos empleados en la fermentación se describen en la Tabla 2.

Las reacciones de fermentación se llevaron a cabo por diecinueve días a 30 °C con ayuda de algunas levaduras aisladas de productos lácteos y cárnicos de Colombia. Como se muestra en la siguiente tabla, únicamente quince productos de fermentación tanto de harina de chachafruto como de suero de leche y su combinación, mostraron actividad antibacteriana, especialmente contra *B. cereus*, *P. aeruginosa* y *S. aerus*.

Tabla 2
Actividad antibacteriana obtenida con algunas levaduras analizadas

LEVADURAS	CEPAS BACTERIANAS	INHIBICIÓN				
		T1	T2	T3	T4	T5
L-13	<i>E. coli</i>	-	+	-	-	-
	<i>P. Aeruginosa</i>	-	+	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	-	+	-	-	-
	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-
L-14	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-
	<i>P. Aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	+	-	-	+	-
	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-
L-18	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-
	<i>P. Aeruginosa</i>	+	+	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-
	<i>B. cereus</i>	+	+	-	-	-
L-20	<i>E. coli</i>	-	+	-	-	-
	<i>P. Aeruginosa</i>	-	+	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	-	+	-	-	-
	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-
L-36	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-
	<i>P. Aeruginosa</i>	-	-	-	-	+
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-
	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-
L-44	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-
	<i>P. Aeruginosa</i>	-	-	-	-	+
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-
	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-
L-51A	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-
	<i>P. Aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-
	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-
L-64A	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-
	<i>P. Aeruginosa</i>	-	+	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-
	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-
L-87	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-
	<i>P. Aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-
	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-

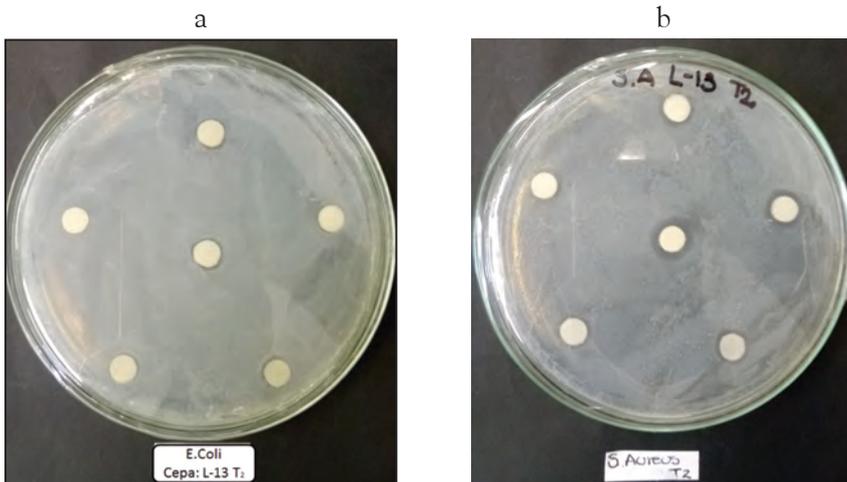
Fuente: Grande (2015).

La Tabla 3 muestra la composición de los sustratos fermentados. Se muestra el alto contenido proteico que las levaduras utilizaron luego para alimentarse, lo que generó péptidos que fueron posteriormente identificados por HPLC y electroforesis bidimensional.

Tabla 3
Concentraciones de los sustratos empleados para la fermentación

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN
T1	Caldo nutritivo (8g/l)
T2	Suero de leche, chachafruto (20 g/l)
T3	Caldo nutritivo (8g/l), extracto de levadura (1g/l)
T4	Chachafruto (20g/l)
T5	Suero de leche

Figura 25.
Actividad antimicrobiana contra (a) *E. coli* y
(b) *S. aureus* de la cepa L-13 con el Tratamiento 2



Como resultado de la fermentación, se determinó la presencia de glucosa, maltosa, fructosa, ácido succínico, ácido cítrico y ácido láctico, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Grande, 2015) (Tabla 4). Como se observa, aún permanece una buena concentración de azúcares fermentables (glucosa y fructosa) y también maltosa, sustratos aprovechables para procesos de fermentación por los microorganismos. Sin embargo, es probable que la producción de ácidos orgánicos afecte considerablemente el proceso de fermentación, dado que son compuestos inhibidores del crecimiento de microorganismos.

Tabla 4
Principales azúcares y ácidos orgánicos identificados por HPLC.

LEVADURAS	GLUCOSA	FRUCTOSA	MALTOSA	ÁCIDO ACÉTICO	ÁCIDO SUCCÍNICO	ÁCIDO CÍTRICO	ETANOL	ÁCIDO LÁCTICO
L-13	BLANCO T1	0,475	0,482	0,502	—	0,377	—	0,806
	T1	0,513	0,972	0,694	0,432	0,618	—	0,432
	BLANCO T2	0,695	1,555	28,961	0,052	—	—	7,781
	T2	0,218	0,218	—	0,502	13,712	—	7,150
	BLANCO T3	6,083	0,553	0,681	—	0,318	—	1,097
	T3	0,213	0,510	18,985	0,170	—	—	3,935
	BLANCO T4	0,541	0,812	0,791	0,030	0,243	—	0,399
	T4	0,791	1,259	11,290	—	0,626	—	0,499
	BLANCO T5	0,381	0,891	18,855	—	—	—	0,655
	T5	0,51	0,812	16,428	0,102	1,528	—	4,608
L-14	BLANCO T1	0,694	0,618	0,513	—	—	—	0,432
	T1	—	—	—	—	—	—	—
	BLANCO T2	0,695	1,555	28,961	0,052	—	—	3,781
	T2	0,502	13,712	0,218	—	—	—	7,150
	BLANCO T3	0,681	0,318	6,083	—	—	—	1,097
	T3	11,290	—	0,719	—	0,626	—	0,499
	BLANCO T4	0,541	0,812	0,791	0,030	0,243	—	0,399
	T4	0,213	0,510	18,985	0,170	0,487	—	3,935

LEVADURAS	GLUCOSA	FRUCTOSA	MALTOSA	ÁCIDO ACÉTICO	ÁCIDO SUCCÍNICO	ÁCIDO CÍTRICO	ETANOL	ÁCIDO LÁCTICO
	BLANCO T5	0,887	0,381	0,891	-	-	-	0,605
	T5	0,812	16,429	-	0,103	1,528	-	4,608
L-18	BLANCO T1	-	-	-	-	-	-	4,608
	T1	0,220	17,613	-	-	0,847	-	1,956
	BLANCO T2	-	-	-	-	-	-	-
	T2	0,841	29,654	-	0,290	11,345	-	3,511
	BLANCO T3	0,325	16,123	-	-	0,318	-	1,097
	T3	0,213	18,985	0,487	-	-	0,170	3,935
	BLANCO T4	-	11,290	-	0,719	1,259	-	0,499
	T4	0,541	0,791	0,243	0,030	-	0,133	0,399
	BLANCO T5	0,891	18,855	0,887	0,381	-	-	0,605
	T5	0,541	16,429	1,528	0,103	-	-	4,608
L-20	T1	-	0,605	17,613	-	0,847	-	1,956
	T2	0,325	16,123	-	-	-	-	3,760
	T3	0,325	16,123	-	-	-	-	-
	T4	0,573	1,295	-	0,032	-	-	0,446
	T5	-	-	-	-	-	-	4,608
L-36	BLANCO T1	0,791	0,030	-	-	-	-	0,399
	T1	0,841	29,654	11,345	-	-	-	0,290
	T2	1,504	1,342	0,557	-	-	-	-

LEVADURAS		GLUCOSA	FRUCTOSA	MALTOSA	ÁCIDO ACÉTICO	ÁCIDO SUCCÍNICO	ÁCIDO CÍTRICO	ETANOL	ÁCIDO LÁCTICO
	T3	8,850	0,500	0,185	0,393	-	-	-	3,211
	T4	1,100	0,338	1,039	1,039	-	-	-	1,839
	T5	0,511	0,442	0,081	2,101	-	-	-	1,011
L-44	BLANCO T1	0,395	0,145	0,885	0,536	-	-	-	1,135
	T1	0,065	0,130	1,848	1,011	-	-	-	1,130
	BLANCO T2	0,684	1,026	0,885	0,398	-	-	-	0,255
	T2	0,093	0,243	16,685	0,270	-	-	-	0,869
	BLANCO T3	1,790	1,032	0,349	0,398	-	-	-	0,109
	T3	0,022	0,030	1,145	2,336	-	-	-	0,200
	BLANCO T4	0,113	0,206	5,080	0,756	-	-	-	0,490
	T4	0,225	0,446	13,011	1,644	-	-	-	0,564
	BLANCO T5	0,244	0,421	0,055	5,086	-	0,992	-	0,404
	T5	0,046	0,009	20,249	2,477	-	-	-	0,48
L-51A	BLANCO T1	0,298	1,098	10,093	-	0,095	-	-	3,215
	T1	-	-	0,601	-	-	-	-	-
	BLANCO T2	0,851	1,633	29,654	2,333	-	-	-	0,210
	T2	0,325	0,672	10,119	2,186	-	-	-	0,700
	BLANCO T3	0,573	1,026	1,285	0,658	-	-	-	0,032
	T3	0,805	1,028	6,884	0,657	-	-	-	0,546
	BLANCO T4	0,761	0,257	0,180	0,391	-	-	-	-
	T4	0,047	0,158	0,620	0,311	-	-	-	0,054
	BLANCO T5	0,263	0,222	2,561	0,529	-	-	-	0,255

LEVADURAS	GLUCOSA	FRUCTOSA	MALTOSA	ÁCIDO ACÉTICO	ÁCIDO SUCCÍNICO	ÁCIDO CÍTRICO	ETANOL	ÁCIDO LÁCTICO
	T5	0,893	1,574	0,995	0,549	-	-	0,661
L-64A	BLANCO T1	-	-	-	-	-	-	0,515
	T1	0,348	0,068	-	0,130	-	-	0,423
	BLANCO T2	0,025	0,448	13,011	-	1,139	-	8,406
	T2	-	-	16,661	-	-	-	3,000
	BLANCO T3	0,243	-	16,605	0,029	-	-	2,603
	T3	0,021	-	1,303	-	0,644	-	0,443
	BLANCO T4	0,113	0,206	5,080	0,307	0,240	-	2,698
	T4	0,244	0,421	3,056	0,290	0,439	-	4,189
	BLANCO T5	-	-	-	-	-	-	4,556
	T5	-	-	-	-	-	-	4,088
L-87	BLANCO T1	1,807	-	14,776	-	-	-	0,482
	T1	-	-	2,561	-	-	-	0,873
	BLANCO T2	-	0,222	-	0,971	-	-	7,649
	T2	-	-	0,998	-	-	-	7,853
	BLANCO T3	-	-	1,674	-	-	-	0,628
	T3	0,118	0,051	0,308	0,366	-	-	0,511
	BLANCO T4	0,605	-	0,634	0,2554	0,684	-	0,302
	T4	0,201	1,332	0,115	0,305	-	-	8,827
	BLANCO T5	0,118	0,306	1,765	-	-	-	-
	T5	0,561	0,446	1,439	-	-	-	1,449

Fuente: Grande (2015).

Finalmente, se está llevando a cabo la identificación de los péptidos mediante el análisis por HPLC y otras técnicas instrumentales, con el fin de tener claridad sobre el tipo de péptidos presentes en los sustratos y su biodisponibilidad y efectividad.

Conclusiones y perspectivas

Debido a la gran cantidad de residuos que todavía se arrojan sobre rellenos sanitarios, al agua o a terrenos baldíos sin tratamiento alguno, es importante estimular el aprovechamiento de residuos pesqueros o con alto contenido proteico por medio del ensilaje o la producción de proteína unicelular. En ese sentido, es primordial incrementar el número de investigaciones relacionadas con la composición química detallada y su calidad nutricional frente al efecto que tienen directamente en la dieta de diferentes animales de cultivo. Específicamente, el conocimiento de la estructura química de los péptidos originados durante el procesamiento de los residuos y su perfilamiento como aditivos en dietas nutracéuticas es un campo de investigación promisorio, así como también la generación de nuevas metodologías de procesamiento (fermentaciones, hidrólisis, extracción) son aspectos que se deben considerar como nuevos campos de investigación de interés para la comunidad científica internacional, con el fin de apoyar y mejorar la producción de productos pesqueros y pecuarios. Los datos encontrados sugieren que los residuos pesqueros son una fuente importante de aminoácidos esenciales y nitrógeno para la dieta animal y humana, y de otros compuestos de alto valor agregado y nutricional. Finalmente, el volumen tan amplio de residuos generados en la industria pesquera y marítima demanda la introducción de nuevas aplicaciones a fin de adicionar valor a diferentes industrias y aprovecharlos al máximo.

Valorización de subproductos a partir de la fermentación en estado sólido

Introducción

La producción de residuos por pudrimiento en condiciones de poscosecha, rechazos por falta de calidad, deterioro de los alimentos por malas prácticas de conservación y estrés en condiciones de almacenamiento, entre otras causas, se ha estimado en 1,3 toneladas por año, de acuerdo con la FAO (Gustavsson, Cederberg, Sonesson, van Otterdijk y Meybeck, 2011). Entre los residuos disponibles se encuentran los lignocelulósicos, ricos en carbohidratos, vitaminas, minerales y fibra (frutas y verduras), los residuos de la industria alimentaria, los provenientes de pesquerías, los de la industria cervecera, azucarera y de cereales como el maíz, el trigo y el arroz. Estos pueden ser aprovechados y valorizados a partir del enriquecimiento con proteína, para lo cual se utilizan procedimientos sencillos mediados por organismos que deben ser reconocidos como seguros (GRAS) por organizaciones veedoras de la seguridad alimentaria a nivel mundial. Como tecnologías disponibles para el procesamiento y valorización de estos residuos están el ensilaje, la fermentación en estado sólido y los procesos *slurry*.

Su tratamiento representa una opción considerable para la producción de alimentos para animales y humanos si se cumplen los requerimientos de producción seguros e inoocuos, especialmente en lugares con problemas de malnutrición. Adicionalmente, es una manera segura de disponer de los residuos en lugar de arrojarlos al medioambiente sin tratamiento alguno, especialmente en países en vía de desarrollo donde la regulación y la normatividad son asuntos por mejorar.

Entre los residuos generados se encuentran las cáscaras de cereales y frutas, el bagazo y la pulpa del café, entre otros, cuyo alto contenido de carbohidratos aprovechables por los microorganismos representa un gran potencial. En ese sentido, la fermentación en estado sólido (SSF, por sus siglas en inglés), es un procedimiento sencillo utilizado para adecuar los residuos sólidos y adicionarles valor nutritivo de manera segura y ambientalmente amigable.

La fermentación en estado sólido es una tecnología que se aplica en condiciones de humedad suficientes para que los microorganismos crezcan, pero no hay agua libre (Rahardjo, Tramper, y Rinzema, 2006). Tiene muchas ventajas sobre la fermentación sumergida (SmF, por Submerged Fermentation) gracias a la menor generación de efluentes, equipos más sencillos y económicos para los procesos, mayores rendimientos de producción, mayor facilidad para la purificación de los productos y concentraciones más altas de los productos. La selección del microorganismo es fundamental para una exitosa fermentación en estado sólido y en esta vía el uso de *Aspergillus niger* para la fermentación de una serie de residuos agroindustriales permite la obtención de cerca de diecinueve enzimas y otros compuestos de importancia como ácido cítrico y alcoholes.

Además de la selección del microorganismo, para una efectiva SSF se debe escoger un sustrato que cumpla una serie de requisitos que se explicarán en detalle más adelante. Entre los posibles sustratos están los residuos de papa, mazorcas del maíz, bagazo de la yuca, bagazo de caña de azúcar, salvado de trigo, salvado de arroz, vaina de algarroba granos de cervecería pasados, entre otros.

A lo largo de este capítulo se discutirán los aspectos más importantes para llevar a cabo con éxito una fermentación en estado sólido, los productos y procesos en los cuales se puede aplicar para facilitar y mejorar su desarrollo y los parámetros que se deben regular para mantener un adecuado control sobre el proceso.

Las dos razones que impulsaron el auge de la fermentación en estado sólido fueron la búsqueda de un alimento con mejor sabor –especialmente en la cultura oriental– mediante el desarrollo de diferentes platos típicos y la necesidad de tratar mejor los residuos agrícolas a través de procesos como el compostaje. Otro aspecto que se debe tener en cuenta consiste en que a diferencia de la fermentación sumergida, en la fermentación en estado sólido los sustratos empleados son fuentes de carbono renovables (residuos agrícolas) como trigo, arroz, malta, maíz, frijol, residuos agroforestales y los provenientes del procesamiento de alimentos (Singh Nee Nigam y Pandey, 2009b).

Cabe resaltar, asimismo, que en la fermentación en estado sólido la baja presencia de fuerzas de cizallamiento facilita el crecimiento de microorganismos sensibles (como el micelio de muchos hongos), lo que permite su cultivo y desarrollo con miras a su industrialización y producción masiva. Estos hongos producen enzimas que pueden ser utilizadas en la producción de saborizantes, aromatizantes e insecticidas. Esto, junto con su simplicidad, altos rendimientos y homogeneidad en su preparación, hace que sean preferidas sobre las fermentaciones sumergidas.

Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido consiste en el crecimiento de microorganismos sobre sustratos sólidos o semisólidos en ausencia de agua libre (Pandey, Selvakumar, y Soccol, 1999). El objetivo de este procedimiento es aumentar el contenido proteico, enzimático o de otras moléculas de interés del residuo y mejorar la capacidad de conservación al variar las características organolépticas como el color, el sabor, el olor y la textura del sustrato. En algunos casos se aplica para eliminar o disminuir el contenido de sustancias tóxicas presentes en algunos residuos de procesos agroindustriales, tales como la producción de aceite de semilla de *Jatropha curcas*.

Este procedimiento ha tenido un surgimiento importante en los últimos años con miras a adicionar valor a los residuos agroindustriales sólidos y semisólidos, lo que lo convierte en una alternativa viable para el tratamiento de estos residuos y disminuir el contenido de polución que se libera al medioambiente (Arvanitoyannis, Kassaveti, y Ladas, 2008). La SSF también ha sido empleada para la producción de compuestos aromáticos utilizando *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y kékfir, con óptimos rendimientos de producción y productos de excelentes características (Aggelopoulos *et al.*, 2014; Beshkova, Simova, Frengova, Simov y Dimitrov).

En la actualidad se está llevando a cabo la producción de aditivos como saborizantes, colorantes y aromatizantes para la industria alimentaria a partir de fermentaciones de diferentes sustratos, con gran aceptación gracias a sus características naturales que evitan el empleo de químicos sintéticos y solventes (Aggelopoulos *et al.*, 2014). Además, los procesos enzimáticos impiden la formación de isómeros y mezclas complejas de separar, lo cual disminuye el costo de los procedimientos y mejora el grado de pureza de los productos obtenidos.

Un ejemplo clásico del uso de la fermentación en estado sólido para la preparación y enriquecimiento nutricional de alimentos es el *koji*, un producto de

fermentación mediante *Aspergillus oryzae*, preparado sobre arroz cocido rico en enzimas típico de la cocina japonesa (Wang y Yang, 2007).

La fermentación en estado sólido se puede efectuar directamente sobre un gran volumen de residuos agroindustriales y productos agrícolas y a un menor costo en comparación con la fermentación sumergida, pues requiere menor energía y se puede aplicar en grandes cantidades ya que los sustratos prácticamente no tienen agua libre. El principal inconveniente para su aplicación a gran escala en la industria alimentaria del hemisferio occidental radica en que no se cuenta con la información suficiente sobre las cinéticas de crecimiento y la aplicación de tecnologías de biorreactores a gran escala (Wang y Yang, 2007). En ese sentido, el interés en la aplicación de esta tecnología como una forma viable de tratamiento y disposición de los residuos agroindustriales ha aumentado últimamente, puesto que se les puede adicionar valor de manera más económica y sin impactos ambientales negativos.

En todas las posibles aplicaciones que involucren SSF se requiere que el sustrato sea pretratado o acondicionado con el fin de que se lleve a cabo su hidrólisis y se produzcan azúcares fermentables por acción de enzimas lignocelulíticas o modificando la estructura de la lignocelulosa. En muchos casos, mediante SSF se pueden producir enzimas lignocelulíticas que contienen celulasas, hemicelulasas, pectinasas y ligninasas (Singh Nee Nigam y Pandey, 2009b).

El material lignocelulósico también sirve para producir papel e incluso desempeña un papel fundamental en la producción de biocombustibles, enzimas y otros compuestos bioquímicos por medio de SSF.

Los residuos de cultivos como paja, subproductos del maíz y bagazo de caña, entre muchos otros, sirven de materia prima para procesar por medio de SSF, ya que se encuentran en grandes cantidades, poseen baja humedad y son bastante estables (Singh Nee Nigam y Pandey, 2009b).

Esta fermentación se ha reportado en numerosas publicaciones que describen las condiciones de fermentación utilizadas, los tipos de biorreactores, los sustratos, los microorganismos empleados y los productos obtenidos, a saber, proteína unicelular, alimentos para animales, vitaminas, compuestos aromáticos, ácidos orgánicos, pigmentos y colorantes, entre otros (Couto y Sanroman, 2006).

Las condiciones de la SSF son determinantes para el éxito del proceso, dado que hacen posible que los microorganismos generen metabolitos y enzimas capaces de degradar el sustrato, las cuales en condiciones de fermentaciones

sumergidas no se producirían, pues las condiciones actuales son muy similares a las condiciones naturales en sus hábitats de existencia (Arvanitoyannis, Kassaveti y Ladas, 2008).

La identificación de la fisiología de los microorganismos y los factores fisicoquímicos en los ambientes en los cuales se desarrollan permiten evaluar los parámetros más importantes para llevar a cabo el procesamiento de los sustratos. Los factores por controlar en este tipo de fermentación son el tamaño de partícula, la porosidad del sustrato, la composición química, los ingredientes del medio de cultivo, la disponibilidad, la estabilidad, la esterilización del medio, la agitación, la aireación y el costo de producción, aunque el hecho de que se encuentre prácticamente sin agua libre evita el crecimiento de otros microorganismos.

Los anteriores factores deben ser optimizados mediante diferentes diseños experimentales factoriales y una metodología de superficie de respuesta, con el fin de identificar los elementos críticos y determinantes para el desarrollo óptimo del proceso y la interacción entre ellos, ya que cada sistema microorganismo-sustrato es único (Singh Nee Nigam y Pandey 2009b; Thomas, Larroche y Pandey, 2013).

La aireación y el mezclado son aspectos básicos que se deben tener en cuenta porque permiten la liberación de CO_2 acumulado producto del metabolismo de los microorganismos y el control del aspecto aeróbico del proceso. Sin embargo, en algunos casos la aireación es difícil o prácticamente imposible, ya que existen organismos sensibles a las fuerzas de cizallamiento que se generan por la agitación, como por ejemplo enzimas enlazadas al micelio que son importantes para la hidrólisis del sustrato. Otro ejemplo es la producción de enzimas por procesos *koji*, en el cual la agitación es automática, se hace suavemente y de manera periódica y es muy controlada (Singh Nee Nigam y Pandey, 2009b). En Japón, varios procesos de producción de alimentos fermentados utilizan biorreactores de cama rotatorios y humedad controlada, a fin de regular el intercambio de calor y gas.

Es importante resaltar que las SSF son procesos muy económicos por cuanto no requieren esterilización ni agitación y la concentración de producto extracelular es elevada, lo que facilita su recuperación por lixiviación o extracción superficial en la mayoría de los casos y eleva el grado de interés por parte de investigadores de todo el mundo.

Por otro lado, la fermentación en estado sólido es muy apropiada para el cultivo y reproducción de microorganismos sensibles a la agitación, especialmente aquellos que facilitan la producción de aflatoxina, ocratoxina y algunas enzimas.

La aireación es primordial ya que promueve la transferencia de calor, masa y humedad a la fase gaseosa, a diferencia de las fermentaciones sumergidas que favorecen únicamente la transferencia de gas. Esta fase tiene la función de aportar oxígeno al medio y remover el dióxido de carbono del sistema.

Entre los microorganismos utilizados para el proceso de degradación de residuos de la industria vinícola se encuentran *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes hirsuta*, *Lactobacillus* spp., *Pleurotus* spp. y *Aerobasidium pullulans*.

El complejo *Pleurotus ostreatus* es el tercer hongo comestible más cultivado del mundo (Arvanitoyannis, Kassaveti y Ladas, 2008), amén de que degrada material lignocelulósico sin necesidad de pretratamiento, ya que posee un sistema complejo enzimático con peroxidasas y fenol oxidasas (Arvanitoyannis, Kassaveti y Ladas, 2008).

Otros microorganismos empleados incluyen el basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* y *Aerobasidium pullulans*. Gracias a sus potentes sistemas enzimáticos degradan residuos organoclorados provenientes de la industria papelera y de otras industrias ricas en residuos fenólicos. Estos complejos enzimáticos constan de lignino peroxidasas (LiP) y peroxidasas dependientes de manganeso (MnP), responsables de la degradación del material lignocelulósico (Kirk y Farrell, 1987; Rodríguez-Couto, Rodríguez, Gallego y Sanroman, 2003).

Finalmente, un buen entendimiento de los procesos de transferencia de masa y calor es vital para una SSF óptima y para el diseño de los biorreactores y su escalamiento para ser comercializados. Un aspecto que dificulta el diseño de los biorreactores es la variación de la naturaleza de los sustratos, lo que hace difícil el modelamiento y los estudios cinéticos indispensables para el diseño y desarrollo de los biorreactores (Thomas, Larroche, *et al.*, 2013).

La madera se puede transformar en productos de papel con ayuda de procesos efectuados como SSF, a saber, el biopulpeo y el bioblanqueamiento. Muchos residuos agrícolas se pueden convertir en productos para la alimentación animal al ser enriquecidos con biomasa microbiana, enzimas y biopromotores. Además, mediante la SSF se mejora su digestibilidad.

Finalmente, por medio de la SSF se pueden preparar biofertilizantes, biopesticidas y biopromotores y factores de crecimiento con residuos lignocelulósicos (Singh Nee Nigam y Pandey, 2009b).

Sustratos

Muchos microorganismos metabolizan diferentes polímeros naturales con el fin de obtener la energía necesaria para su existencia. Entre esos materiales poliméricos se encuentran las proteínas, la lignina y polisacáridos tales como el almidón, la pectina, la quitina, la celulosa y la hemicelulosa. Estos polímeros deben ser hidrolizados por medio de enzimas hidrolíticas para liberar fuentes de carbono asimilables por los microorganismos, como los azúcares de bajo peso molecular.

En general, las bacterias crecen en la superficie de las fibras o partículas del sustrato y el micelio de los hongos penetra las partículas para nutrirse y reproducirse (Singh Nee Nigam y Pandey, 2009b). Normalmente, sustratos económicos como los residuos agroindustriales pueden ser empleados y son demandados por su bajo costo, pero deben ser analizados con el fin de conocer su contenido de proteína, carbohidratos, cenizas, macro y micro elementos y humedad. Estos sustratos deben ser porosos y contener baja cantidad de agua libre, pero suficiente para permitir el crecimiento de los microorganismos en condiciones similares a las de sus hábitats naturales.

Este tipo de fermentación varía las propiedades organolépticas de los alimentos de tal forma que su olor, color, sabor, textura, aroma y contenido nutricional se ven afectados, bien sea positivamente o negativamente, luego del proceso. En esta técnica se metabolizan moléculas más complejas químicamente que en las fermentaciones en estado líquido, que si bien permiten obtener altos niveles de elementos lo hacen con mayor dificultad, lo cual en muchos casos implica hidrólisis enzimática o pretratamientos que podrían inhibir el crecimiento microbiano y requerir mayores tiempos de procesamiento.

Generalmente, los residuos líquidos que más se han utilizado para la generación de productos de valor agregado tales como molasas y sueros, son los provenientes de industrias lácticas y azucareras, aunque también se han utilizado residuos sólidos de la industria cervecera, entre los que se encuentran granos, maltas residuales y residuos frutales y vegetales (Bambidis y Robinson, 2006; Kamat, Khot, Zinjarde, RaviKumar y Gade, 2013; Kosseva, 2013).

Otro sustrato empleado para el aprovechamiento de residuos a partir de procesos SSF es el suero de queso, utilizado junto con el kéfir (Figura 25) para la producción de cultivos lácticos y productos de panadería, así como también alcohol y ácido láctico a escala piloto y de laboratorio con excelentes resultados (Koutinas, Papapostolou, Dimitrellou, Kopsahelis y Katechaki, 2009; Koutinas, Athanasiadis, Bekatorou, Iconomopoulou y Blekas, 2005).

Figura 25
Kéfir de leche



Fuente: thehealthyeatingsite.com.

Como se discutió anteriormente, es importante la apropiada selección del sustrato sólido para que el proceso de fermentación se lleve a cabo de manera adecuada. Esta selección depende de un análisis cuidadoso de los parámetros fisicoquímicos y las características microbiológicas. En los primeros se debe analizar el punto de humedad crítica (CHP) y el índice de absorción de agua (WAI) (Robledo, Aguilera-Carbó, Rodríguez, Martínez, Garza y Aguilar, 2008). La velocidad de crecimiento del microorganismo también debe ser evaluada como parámetro microbiológico.

Para que un compuesto sea considerado como sustrato para una SSF debe cumplir con los requisitos que se listan a continuación (Orzua, *et al.*, 2009):

- a. Debe ser una matriz sólida, porosa y un área superficial grande por unidad de volumen (entre 10^3 y 10^6 m²/cm³) que garantice el crecimiento microbiano en la interfase sólido/gas.
- b. La matriz debe tener la capacidad de absorber grandes cantidades de agua (varias veces su peso seco) con el fin de garantizar la velocidad adecuada de los procesos bioquímicos en la interfase sólido/líquido.
- c. Las interfases sólido/gas deben ser excelentes hábitats para el desarrollo de microorganismos (bacterias, mohos, levaduras y hongos) y sus mezclas.
- d. La matriz debe ser estable ante procesos de compresión y agitación leves.

- e. El flujo de gases a través de la matriz debe generar una baja presión y mezclarse con el producto de fermentación.
- f. La matriz debe contener compuestos que sirvan como reservorio de alimento para microorganismos, tales como carbohidratos, lípidos, proteínas y minerales.

Orzua y colaboradores (2009) llevaron a cabo un estudio con diez residuos agroindustriales que incluían hojas del arbusto de creosota (*Larrea tridentata*), agave del caribe (*Agave lechuguilla*), cáscara de limón (*Citrus aurantifolia*), cáscara de naranja (*Citrus sinensis*), pulpa de manzana (*Malus domestica*), cáscara de pistacho (*Pistacia vera*), salvado de trigo (*Triticum* spp.), cáscara de coco (*Cocos nucifera*), cáscara de nuez pecan (*Carya illinoensis*) y residuos de frijol (*Phaseolus vulgaris*), para determinar si eran viables para llevar a cabo SSF utilizando una cepa de *Aspergillus niger* Aa-20. El estudio determinó, en primer lugar, el punto crítico de humedad (CHP) que representa el agua ligada al soporte que no se encuentra disponible para el microorganismo; el cual, según Moo-Young *et al.* (1983), no debe superar el 40 % para *Aspergillus niger* en este tipo de fermentaciones; y en segundo lugar, el índice de absorción de agua (WAI), que indica la cantidad de agua que puede ser absorbida por el soporte (Moo-Young, Moreira, y Tengerdy, 1983). Se concluyó que la cáscara de coco, la pulpa de manzana y las cáscaras de limón y naranja son los residuos más promisorios dentro del grupo estudiado para llevar a cabo procesos de SSF, debido a su elevada capacidad de absorción de agua y buena tasa de crecimiento de la cepa de *A. niger* estudiada.

Los materiales que contienen elevados índices de absorción son muy adecuados para un proceso de SSF, ya que la cantidad de agua disponible para el microorganismo se puede modificar durante su cultivo de acuerdo con sus necesidades. La SSF se debe efectuar en sustratos porosos que no tengan agua libre, pero suficiente para permitir su crecimiento, como sucedería en condiciones naturales (Lonsane, Ghildyal, Budiartman, y Ramakrishna, 1985). El contenido de agua no debe ser inferior al 12 %, ya que por debajo de este valor toda actividad microbiana cesa y por tanto no podría haberla en el sustrato (Nigam y Singh, 1994). El rango en el que se encuentra el contenido de agua está comprendido entre 30 % y 80 %, según el tipo de sustrato. Idealmente, los sustratos deben tener un contenido bajo de agua de forma que se pueda ajustar a los requerimientos del microorganismo durante el cultivo (Oriol, Raimbault, Roussos y Viniestra-Gonzales, 1988).

Microorganismos

Los microorganismos utilizados para la conversión de residuos agroindustriales y alimentarios en productos de valor agregado incluyen levaduras, algas, hongos y bacterias (Aggelopoulos, Katsieris, Bekatorou, Pandey, Banat y Koutinas, 2014). Sin embargo, no se han reportado avances que incluyan la combinación de residuos sólidos y líquidos para la generación de productos de valor agregado desde el punto de vista de la biorrefinería, a pesar de ser una posibilidad importante para generar productos de alto valor agregado por su inocuidad, no requerir la adición de otros nutrientes para complementar su contenido, bajos costos de transporte y, especialmente, por la posibilidad de explotarlos a partir de bajos volúmenes sin necesidad de requerir grandes cantidades para este propósito (Aggelopoulos, Katsieris, Bekatorou, Pandey, Banat, y Koutinas, 2014).

Una de las formas de aprovechar residuos líquidos y sólidos mediante el cultivo de una mezcla simbiótica de bacterias y levaduras es el kéfir, que se utiliza para la producción de alcohol. En el kéfir, los microorganismos se encuentran embebidos en la matriz de un polisacárido (kefirán) que se utiliza para la producción de bebidas lácteas mediante fermentación lactoalcohólica (Harta, Iconomopoulou, Bekatorou, Nigam, Kontominas y Koutinas, 2004).

Desde la prehistoria, el hombre –cuya capacidad cerebral era similar a la nuestra– debió notar que cuando ahumaba la carne o la preservaba en un lugar fresco y seco esta se conservaba por más tiempo. De la misma manera, observó que los cereales, los granos y las nueces se conservaban mejor si se mantenían en un lugar seco y en un recipiente cerrado que los protegía del ataque de hongos. Hoy en día se sabe que operaciones como la irradiación, el secado, el calentamiento, la fritura, el ahumado y el curado sirven para conservar el alimento y evitar su deterioro.

Se considera que un alimento se ha deteriorado cuando pierde sus propiedades sensoriales, como el gusto, el color, el sabor, la textura y apariencia, su valor nutritivo o su seguridad, por acción de factores como el ataque de microorganismos, reacciones catalizadas por enzimas, reacciones químicas como el pardeamiento o reacción de Maillard y la oxidación de lípidos y grasas (rancidez oxidativa), o también por daños físicos causados por la cristalización de moléculas como los azúcares, la separación de emulsiones, etc., (Berk, 2009).

Uno de los procesos más comunes de conservación de alimentos es la preservación por aplicación de calor o proceso térmico, mediante el cual se destruyen o inactivan enzimas y microorganismos con el fin de que no afecten los alimentos. Sin embargo, simultáneamente ocurren otras reacciones químicas que alteran su

estructura y la llevan a cambios que en algunos casos son deseables y en otros generan rechazo. Unos afectan las propiedades sensoriales y otros su contenido nutricional, por lo cual resulta esencial controlar el tiempo de exposición y la temperatura y tener un conocimiento idóneo acerca de los microorganismos que dañan los alimentos.

Otros procesos se basan en el enfriamiento o en el congelamiento, los cuales no suprimen las reacciones enzimáticas o la presencia de microorganismos, sino que retardan la velocidad de los procesos mencionados. En este caso es de vital importancia mantener la cadena de frío.

Algunas características únicas de las SSF son ideales para el crecimiento y desarrollo de organismos miceliales. Estos poseen enzimas hidrolíticas extracelulares con capacidad para degradar complejas estructuras poliméricas y liberar nutrientes para su desarrollo, como los azúcares pequeños. Entre este tipo de organismos se encuentran los hongos filamentosos, los actinomicetos y algunas bacterias.

Dos tipos de microorganismos son empleados para llevar a cabo fermentaciones en sustrato sólido. El primer tipo implica el empleo de flora nativa o natural en procesos como el ensilaje y el compostaje, basados en un consorcio simbiótico de microorganismos que actúan y llevan a cabo la degradación de la materia prima. El segundo tipo involucra cultivos puros, en los cuales microorganismos conocidos son empleados solos o en combinación con otros para la degradación de los sustratos (Singh Nee Nigam y Pandey, 2009b). En los procesos industriales se utiliza más el segundo tipo, dado que permite un mayor control sobre las velocidades de crecimiento y formación del producto, aun cuando eleva los costos de producción por la necesidad de esterilización durante el proceso. Ejemplo de esto es la producción de proteína a partir de subproductos agroindustriales utilizando cultivos de *Chaetomium cellulolyticum* y *Candida utilis*.

En cuanto a los hongos filamentosos, se han utilizado principalmente ficomicetos (*Mucor* y *Rhizopus*), ascomicetos (*Aspergillus* y *Penicillium*) y basidiomicetos (Singh Nee Nigam y Pandey, 2009b). El hongo *Aspergillus niger* se ha utilizado para enriquecimiento proteico (Baldensperger, Le Mer, Hannibal y Quinto, 1985), producción de enzimas como la celulasa (Singh, Abidi, Darmwal y Agrawal, 1989), la amilasa, la glucoamilasa (A. Pandey, 1990; Ramakrishna et al., 1982), la β -glusidasa y la proteasa (Malathi y Chakraborty, 1991).

Otros microorganismos empleados son *A. oryzae* para la producción de aldehídos, cetonas y alcoholes a partir de la fermentación de arroz (Ito, Yoshida, Ishikawa y Kobayashi, 1990), *Rhizopus oligosporus* para enriquecimiento proteico

(Rathbun y Shuler, 1983), *R. oligosporus* y *Mucor meihei* para la producción de cuajo fúngico, *Trichoderma* spp. para la producción de enzimas y enriquecimiento proteico (Daubresse, Ntibashirwa, Gheysen y Meyer, 1987) y diversas especies de *Penicillium* para la producción de hidrolasas y enzimas pécticas (Siessere y Said, 1989).

Otros microorganismos y aplicaciones a través de SSF serán discutidos en diferentes secciones de este capítulo.

Productos a partir de la SSF

La fermentación en estado sólido mediante el uso de la biotecnología moderna ha impulsado la preparación y obtención de varios productos de gran utilidad en el laboratorio y en la industria, entre los cuales se encuentran enzimas, ácidos orgánicos, metabolitos secundarios (antibióticos), biocombustibles (etanol), compuestos aromáticos, factores de crecimiento de plantas, micotoxinas y medicamentos (Wang y Yang, 2007). Las enzimas que se producen por SSF son útiles en la producción de ensilajes, en procesos de biorremediación de suelos y en la producción de biopesticidas.

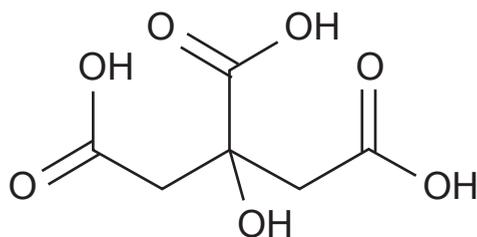
Ácidos orgánicos

Algunos ácidos orgánicos se producen por medio de fermentaciones en sustratos sólidos. El ácido cítrico, por ejemplo, tiene una elevada producción a nivel mundial (un millón de toneladas por año) y se obtiene por fermentación sumergida con cepas de *Aspergillus niger* y *Candida* sp. usando diferentes fuentes de carbohidratos como molasas y almidones (Wang y Yang, 2007). La fermentación en estado sólido también ha sido empleada para la producción de ácido cítrico empleando como soportes bagazos de caña de azúcar (Vandenberghe, Soccol, Pandey y Lebeault, 2000), yuca (Prado, Vandenberghe, Lisboa, Paca, Pande, y Soccol, 2004), pulpa de frutas (Kumar, Jain, Shanker y Srivastava, 2003), remolacha azucarera (Gasiorek y Lesniak, 2002) (Gasiorek y Lesniak, 2002) y cáscara de café (Shojaosadati y Babaeipour, 2002), entre otros sustratos económicos y de fácil acceso.

El ácido cítrico (Figura 27) tiene múltiples aplicaciones en la industria alimentaria y por tal motivo su producción es muy importante a nivel industrial. Muchos estudios se han enfocado en la producción de ácido cítrico mediante procesos de fermentación en estado sólido sobre sustratos provenientes de residuos agroindustriales, como pulpa de manzana (Dhillon, Brar, Kaur y Verma, 2013; Dhillon, Brar, Verma y Tyagi, 2011), musgo de turba (Barrington, Kim, Wang y

Kim, 2009), cáscara de plátano (Karthikeyan y Sivakumar, 2010) y residuos de frutas (Kuforiji, Kuboye y Odunfa, 2010). Estos estudios reportaron los cultivos de microorganismos empleados, los sustratos y el diseño de los reactores y los parámetros más influyentes en las tasas metabólica y de crecimiento para la producción de ácido cítrico, como la temperatura y la velocidad de aireación.

Figura 27
Estructura del ácido cítrico



Fuente: <https://vinmetrica.com/product/citric-acid/>

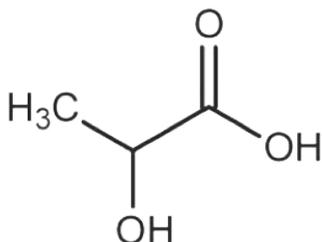
La producción fermentativa de ácidos se ve afectada por múltiples factores, entre los que se encuentran el pH, la concentración de CO₂, la disponibilidad de oxígeno, la presencia de fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y elementos traza, concentración de alcohol y temperatura, entre otros. El rendimiento de la producción de los ácidos, que se expresa en gramos de ácido por kg de sustrato seco (g/kg), dependerá en gran medida de los sustratos utilizados, su humedad y por supuesto, de la actividad de los microorganismos empleados para la fermentación. Diferentes tipos de reactores pueden ser usados para llevar a cabo su producción, entre los que se encuentran los reactores de lecho empacado (de mayor rendimiento que los de tambor), de bandejas y de vaso.

En un estudio reciente, M. Schneider, Zimmer, Cremonese, De C. De S. Schneider y Corbellini (2014) propusieron la preparación, a través de SSF, de ácido cítrico a partir de subproductos del proceso de producción de biodiésel, usando aceite de semilla de *Vernicia fordii* y *Aspergillus niger* por siete días y monitoreando el pH y el crecimiento de la biomasa del hongo sobre el sustrato. El crecimiento del hongo se dio mejor en el “pastel” del aceite crudo, que contenía un 20 % de glicerina (subproducto). El máximo rendimiento obtenido de ácido cítrico fue de 350 g/kg de biomasa. Fue determinado con ayuda de cromatografía de líquida de alto desempeño (HPLC).

El ácido láctico (Figura 28) es otro de los ácidos importantes que pueden ser producidos por fermentación de residuos en estado sólido. Para ello se utilizan diferentes cultivos de microorganismos, aunque normalmente se emplean *Lactobacillus sp.* y el hongo *Rhizopus sp.* El ácido láctico se produce por fermen-

taciones sumergidas con el cultivo de *Lactobacillus*; sin embargo, recientemente ha aumentado el interés por hacer fermentaciones con *Rhizopus oryzae* por su capacidad única de producir ácido L-(+)-láctico ópticamente puro a partir de azúcares como xilosa, glucosa y almidón. Este ácido es altamente demandado en el mercado para la producción, entre otros, de polímeros biodegradables.

Figura 28
Estructura del ácido láctico



Fuente: <http://dir.indiamart.com/impcat/lactic-acid.html>

La producción de ácido láctico por fermentación sumergida tiene serias limitaciones debido a que cuando se usa el hongo, la viscosidad del caldo de fermentación aumenta dramáticamente, especialmente cuando se utiliza almidón como sustrato. Para solucionar el inconveniente, los investigadores emplearon células inmovilizadas que han mejorado la viscosidad de los caldos al controlar las ramificaciones del micelio del hongo, pero también han incrementado la tensión de oxígeno hasta niveles del 90 %, ya que con niveles inferiores no se obtienen buenos rendimientos de fermentación y hace prácticamente inviable el escalado a nivel industrial (Wang y Yang, 2007).

Otro inconveniente en la producción de ácido láctico por fermentación sumergida se presenta cuando se utiliza almidón crudo, pues es insoluble en agua y sus gránulos afectan el proceso de mezcla en la reacción, lo cual impide el proceso de escalamiento. Por esa razón, la fermentación en estado sólido es una buena alternativa para la producción de ácido láctico, como lo han reportado diferentes investigadores, quienes han determinado que la producción es posible utilizando sorgo dulce, mazorca de maíz, caña de azúcar y los residuos del procesamiento de la zanahoria. Con la fermentación en estado sólido se evitan los inconvenientes de la reología de las soluciones, así como el mezclado y la aireación que se limitan en la fermentación en estado líquido.

Otro ácido que se produce a partir de SSF es el ácido succínico, con aplicación en las industrias perfumera, cosmética, alimentaria y de biopolímeros. Du y colaboradores (2008) prepararon por fermentación el ácido succínico con una

metodología novedosa a partir del fraccionamiento del trigo en cascarilla y harinas con y sin gluten a partir de su molienda (Du *et al.*, 2008). La cascarilla sirvió para la obtención de las enzimas glucoamilasa y proteasa vía SSF con *Aspergillus awamori* y *A. oryzae*, respectivamente. Posteriormente, se utilizaron por separado las soluciones resultantes para preparar los hidrolizados de cada tipo de harina que luego de combinarse fueron fermentados por *Actinobacillus succinogenes* para la producción hasta una concentración de 64g/l (Thomas, Larroche, *et al.*, 2013). Con el tiempo, otros investigadores lograron obtener rendimientos más elevados a partir de innovaciones en la estrategia, utilizando diferentes preparaciones del sustrato y manteniendo vigente el concepto de biorrefinería (Du *et al.*, 2008; Leung, Cheung, Zhang, Lam, y Lin, 2012).

El ácido succínico se ha obtenido a partir de SSF incluso de residuos de restaurantes sin tratamiento previo, como lo demostraron Sun, Li, Qi, Gao y Lin (2014). En el estudio se utilizaron los productos de la hidrólisis de los residuos mediada por enzimas hidrolíticas comerciales y producidas de *Aspergillus awamori* y *Aspergillus oryzae* que contenían 31,9 g/l de glucosa y 280 mg/l de nitrógeno libre, un suplemento nutritivo completo para el crecimiento de los microorganismos. En la investigación se determinó que un 90 % de los residuos de restaurante fueron hidrolizados y utilizados en un fermentador de 2,5 litros para producir 29,9 g/l de ácido succínico, lo que representa un rendimiento total de 0,224 g/g de sustrato utilizando el hidrolizado de los residuos de restaurante y *E. coli* recombinante.

Otros ácidos producidos por procesos SSF son el ácido oxálico y el ácido γ -linolénico, un intermediario muy importante en la familia de los ácidos grasos n-6, importantes a su vez en los procesos celulares de las glándulas mamarias (Čertík, Adamechová, y Laoteng, 2012). En el caso del ácido oxálico, su producción se ha llevado a cabo a partir de la fermentación de paja utilizando *Phanerochaete chrysosporum* y se prestó particular atención en el efecto del Pb^{2+} sobre el rendimiento del producto, lo que permitió entender su influencia y mecanismo de acción (N. J. Li *et al.*, 2011).

Muchos hongos filamentosos se han utilizado como alternativa para la producción de ácidos como el itacónico, málico y fumárico a través de SSF, debido a su importancia como materias primas para la producción de otros compuestos químicos de interés. Recientemente, A. H. Mondala (2015b) presentó una extensa revisión de la literatura relacionada con la producción de estos ácidos a partir de cultivos de hongos filamentosos utilizando como sustratos residuos lignocelulósicos, con especial énfasis en los mercados que se pueden alcanzar con estos productos como “bloques de construcción” de compuestos químicos

de interés (Nwobi *et al.*, 2014). Un aspecto relevante que se discute en esta revisión es el concepto de una hidrólisis y fermentación consolidadas en un solo paso, para lo cual se ha planteado una serie de iniciativas como la adición de enzimas hidrolíticas comerciales, con el fin de aumentar y mejorar la capacidad hidrolítica de las enzimas de los cultivos fúngicos y los cultivos mixtos de hongos con capacidades hidrolíticas y fermentativas, que evitan la inhibición de la actividad enzimática por causa de la acumulación de productos de la hidrólisis de los compuestos poliméricos.

Esta iniciativa se utilizó en la preparación de ácido láctico a partir de sustratos sólidos y semisólidos con *Rhizopus oryzae*, usando como sustratos paja de trigo (Saito, Hasa y Abe, 2012), madera procesada (Moldes, Alonso y Parajó, 2001), lodos del procesamiento de papel y pulpa de yuca (Phruksawan, Kulpreecha, Sooksai y Thongchul, 2012), demostrando con ello una mejora en el rendimiento, la calidad y la productividad con la estrategia.

Motta y Santana (2014) reportaron la producción de ácidos húmicos, importantes en aplicaciones agrícolas, en biomedicina, industrialmente y en relación con el medioambiente, a partir del aprovechamiento de un residuo de los frutos de palma que se genera en el procesamiento de aceite, con una cepa de *Trichoderma reesei*, a través de SSF y mediante un sistema de columnas Raimbault. Esta producción es importante dado que actualmente los ácidos húmicos se producen a partir de fuentes no renovables como carbón y hulla. En el estudio se evidenció una producción más elevada de ácidos húmicos que de biomasa, lo cual lo hace muy promisorio para ser escalado a nivel industrial.

Enzimas

Las enzimas son el producto industrial más importante de la biotecnología y están ganando suficiente atención en los últimos años debido a que sus contrapartes químicas generan contaminación ambiental y a los elevados costos que en muchos casos las industrias deben asumir.

El mercado mundial de las enzimas industriales es de unos 3.300 millones de dólares y se espera que alcance los 4.400 millones (Liguori, Amore, y Faraco, 2013). La mayor demanda proviene del mercado del cuero, seguido por el mercado del bioetanol. En cuanto al segmento de las enzimas de alimentos y bebidas las expectativas son de \$ 1.300 millones de dólares en el 2015.

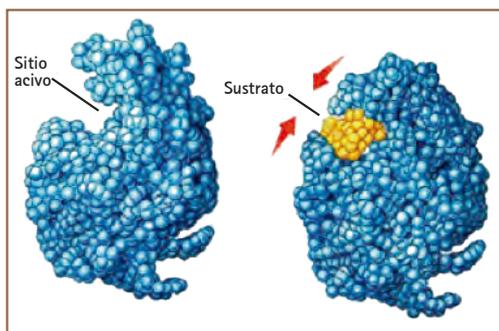
Países como Colombia, poseedores de una gran biodiversidad y cuyas economías son consideradas emergentes, cuentan con una ventaja competitiva respecto de otros países, lo cual podría fomentar el crecimiento empresarial basado en la

aplicación industrial de las enzimas y mejorar sus economías. Sin embargo, esto podría ser una realidad lejana si se tiene en cuenta que existe una gran brecha científica y tecnológica que debe cerrar respecto de los países industrializados. Asimismo, es urgente mejorar las capacidades empresariales y los incentivos para invertir en este campo del conocimiento (Castellanos *et al.*, 2006).

En general, las enzimas (Figura 29) se aplican en la industria para mejorar el procesamiento de una materia prima o cambiar o incrementar las propiedades organolépticas de los productos que se generan en el proceso. El primer caso se lleva a cabo disminuyendo su viscosidad o mejorando su solubilidad. En el segundo caso, se pretende alterar el color, el aroma, el dulzor, la textura e incluso la estabilidad, prolongando de esta manera su vida útil y haciendo el producto más agradable para su consumo. El número de enzimas con aplicación industrial es relativamente pequeño (alrededor de cincuenta), pero de un alto valor comercial y de interés particularmente para las industrias textil, alimentaria, papelera, cuero, vino, zumo de frutas, farmacéutica y el desarrollo de detergentes (Castellanos *et al.*, 2006).

Figura 29

Representación de la interacción entre una enzima y el sustrato



Fuente: <http://readanddigest.com/what-are-enzymes/>

La fermentación en estado sólido resulta muy útil para la producción de enzimas a partir de residuos agroindustriales. En este sentido, es muy interesante cuando el producto crudo de la fermentación se puede usar como fuente para la obtención de las enzimas, por su bajo costo y sencillez técnica. Las enzimas producidas por este tipo de fermentación tienen aplicación en la industria alimentaria, en otro tipo de fermentaciones, en procesos de lixiviación (biolixiviación), biorremediación, en procesos de despulpado, entre otros procesos (Pandey A., Selvakumar, Soccol y Nigam, 1999).

- Entre los diferentes procesos en los que se pueden aplicar las enzimas y las enzimas aplicadas se encuentran (Pandey A., Selvakumar, Soccol y Nigam, 1999):
 - Ensilaje (enzimático) usando celulasas y hemicelulasas fúngicas.
 - Bioprocesamiento de cultivos y de sus residuos usando celulasas y hemicelulasas fúngicas.
 - Procesamiento de fibras usando pectinasas, celulasas y hemicelulasas fúngicas.
 - Suplementos alimenticios usando amilasas, proteasas, lipasas, celulasas y hemicelulasas.
 - Biodespulpado usando xilanasas.
 - Compostaje dirigido usando enzimas hidrolíticas.
 - Biorremediación de suelos usando lacasas y ligninasas.
 - Descomposición de residuos poscosecha usando celulasas de *Trichoderma harzianum*.
 - Biopesticidas usando celulasas de *T. harzianum*.

Entre las enzimas producidas a través de SSF que se encuentran disponibles para las diferentes aplicaciones mencionadas, es importante resaltar las enzimas oxidativas, las cuales se usan para los procesos de biorremediación por su capacidad de degradar un gran número de compuestos tóxicos y recalcitrantes. Hacer estos productos viables comercialmente solo es posible produciendo enormes cantidades, por lo cual su producción se debe hacer a escala industrial aumentando con ello sus costos de producción considerablemente. Por esa razón, se deben investigar y optimizar estos procesos de producción con el fin de disminuir los costos y facilitar su aplicación, especialmente cuando son adecuados para mejorar las condiciones medioambientales.

La producción de enzimas a través de SSF es un proceso que puede motivar a muchos empresarios, especialmente por sus costos bajos y favorabilidad con el medioambiente. R. R. Singhanian, Sukumaran, Patel, Larroche y Pandey (2010), compararon los costos de producción de celulasas a partir de fermentaciones sumergidas y fermentaciones en estado sólido y encontraron una diferencia muy grande (más de diez veces) entre producir la enzima por SSF y por SmF, demostrando con ello la favorabilidad del proceso por SSF.

La mayoría de las enzimas fúngicas se han producido a partir de basidiomicetos, a pesar de que se han investigado numerosos microorganismos para este fin, pues las condiciones en las cuales se lleva a cabo la SSF son muy similares a las condiciones naturales, favoreciendo así el proceso de producción.

Un aspecto fundamental para la producción de enzimas es la selección adecuada del microorganismo que se va a cultivar. Se debe tener en cuenta especialmente, la cantidad de enzimas que un solo microorganismo en determinadas condiciones puede producir, así como la gran variedad de microorganismos que lo pueden hacer. Esta elección se lleva a cabo con base en las condiciones medioambientales y en el sustrato que se va a utilizar. Por ejemplo, la mayoría de las enzimas hidrolíticas (celulasas, xilanasas, pectinasas, entre otras) se producen a partir de hongos, debido a que estos las usan naturalmente para su crecimiento. Normalmente, *Aspergillus* spp. y *Trichoderma* spp. son utilizados con este fin, así como la producción de enzimas amilolíticas se da utilizando hongos filamentosos como *Aspergillus* y *Rhizopus* principalmente (Pandey A., Selvakumar, Soccol y Nigam, 1999). Por otra parte, las alfa-amilasas se producen principalmente con cultivos de bacterias, gracias a su mayor resistencia a las altas temperaturas.

La producción industrial de enzimas a partir de la SSF ha sido exitosa y en esta área se han llevado a cabo numerosas investigaciones que buscan optimizar sus rendimientos de producción, su efectividad y el diseño de propiedades específicas a un menor costo. Las enzimas producidas han sido principalmente las siguientes (Thomas, Larroche, *et al.*, 2013):

- α -amilasa (Roses y Guerra, 2009).
- L-asparaginasa (Mohan, Ramasamy y Manonmani, 2013).
- Celulasas, incluida β -glucosidasa (Singhania, Sukumaran, Patel, Larroche y Pandey, 2010).
- Quitino deacetilasa (Suresh, Sachindra, y Bhaskar, 2011).
- Quitosanasas (da Silva, Honorato, Franco y Rodrigues, 2012).
- Exo y endoglucanasas (R. Mahmood *et al.*, 2013).
- Enzimas fibrinolíticas (Zeng *et al.*, 2013).
- L-glutaminasa (Jesuraj, Praya, Kingsley, Dinesh Kumar y Ravikumar, 2013).
- Inulinasa (Dilipkumar, Rajamohan y Rajasimman, 2013).
- Invertasa (Alegre, Polizeli, Terenzi, Jorge y Guimarães, 2009).
- Lacasa (Karp *et al.*, 2012).
- Levansucrasa (Esawy *et al.*, 2013).

- Lipasa (Coradi *et al.*, 2013).
- Homocisteína γ -liasa (El-Sayed, Khalaf y Aziz, 2013).
- β -mananasa (Yin, Liang, Li, y Sun, 2013).
- Pectateo liasa (Ferreira *et al.*, 2010).
- Fitasa (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2013).
- Liquenasa (Maktouf *et al.*, 2013).
- Alcalino proteasa (Abraham, Gea y Sánchez, 2013).
- Proteasa ácida (Vishwanatha, Rao y Singh, 2010).
- Tanasa (Beniwal, Rajesh, Goel, Kumar y Chhokar, 2013).
- Xilanasas y xilosidasas; Thomas, Joseph, Arumugam y Pandey, 2013).

Un grupo muy importante de enzimas son las celulasas, las xilanasas y las xilosidasas, usadas junto con las hemicelulasas y pectinasas para la degradación y procesamiento de material lignocelulósico y producción de biocombustibles, suplementos alimenticios y compuestos químicos de interés generalizado. Las celulasas (comprenden las endo-1,4- β -D-glucanasa, las exo-1,4- β -glucanasa y las β -D-glucosidasa) y las xilanasas (endo-1,4- β -D-xilanasas), son igualmente importantes para el tratamiento de las fibras en la industria textil (Pandey, Selvakumar, Soccol y Nigam, 1999).

Actualmente, con el fin de producir biocombustibles se procesa material lignocelulósico, el cual luego de un adecuado pretratamiento (ver capítulo 2) queda disponible para su sacarificación mediada por enzimas provenientes de microorganismos, a partir de la conversión de celulosa en glucosa. Este es el paso más crítico y determinante del proceso con miras a su viabilidad comercial (Thomas, Larroche *et al.*, 2013). Las investigaciones más relevantes de los últimos años están dirigidas a mejorar la productividad de las enzimas y al desarrollo de microorganismos con propiedades específicas (P. Binod *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2013; Xin, Zhang y Wong, 2013). En este sentido, se ha prestado mucha atención a la búsqueda de β -glucosidasas (BGL) más tolerantes a la glucosa gracias a que en el proceso de hidrólisis de la celulosa, la BGL se inhibe con la aparición de la glucosa (Reeta Rani Singhania *et al.*, 2013). La BGL es el principal componente enzimático de las celulasas, ya que son las responsables de la transformación de la celulosa a glucosa, por lo que su participación en el proceso de hidrólisis es muy importante. Para solucionar este inconveniente, se han abordado diversas estrategias con el fin de mejorar el proceso de conversión de celulosa a glucosa.

Otro aspecto importante que se debe tener en cuenta en relación con la SSF es que difiere notablemente en la actividad con respecto a la SmF, especialmente en la tasa de crecimiento de los microorganismos y su actividad metabólica. En ese sentido, Li *et al.* (2013) compararon la producción de celulasa en SSF y en SmF con cultivos de *Neurospora sitophila*, usando como soporte paja de trigo pretratada con un proceso de explosión por vapor, y encontraron que las actividades enzimáticas de CMcasa, FPA y β -glucosidasa fueron mucho mayores (entre 53 y 181) en los procesos SSF. Además, el cultivo solamente produjo β -xilosidasa debido a que el proceso SSF se parece más al hábitat natural de los hongos y facilita su crecimiento y actividad metabólica (Li, Guan, y Niu, 2013). La investigación de Barrios-González (2013) permitió concluir que la mayor producción de metabolitos secundarios en los procesos SSF se debe a una mayor transcripción de los genes biosintéticos, lo que permite en muchos casos encontrar estímulos externos que influyen esta transcripción y por ende la producción de estos metabolitos. Un valioso conocimiento que, sin duda, mejora el cultivo y la productividad de estos microorganismos.

Otro conjunto importante de enzimas para la producción de biocombustibles y el procesamiento de material lignocelulósico son las enzimas xilanolíticas (Thomas, Joseph, *et al.*, 2013). Estas facilitan la degradación de las hemicelulosas a azúcares de cinco carbonos (Thomas, Larroche, *et al.*, 2013). Las xilanas son producidas principalmente por hongos, bacterias y actomicetos con diferentes condiciones de cultivo en SSF. Diversos autores han reportado la producción de estas enzimas a partir de residuos agroindustriales utilizando hongos filamentosos como el *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 en procesos SSF, con salvado de trigo como soporte y validando los experimentos mediante cálculos simulados, lo cual permitió corroborar las actividades esperadas (Chapla, Divecha, Madamwar y Shah, 2010).

Finalmente, dentro de este grupo de enzimas importantes para la degradación de material lignocelulósico y producción de biocombustibles se encuentran las lacasas, las cuales facilitan la oxidación de la lignina. Karp *et al.* (2012) analizaron la actividad enzimática de la lacasa producida por un cultivo de *Pleurotus ostreatus* en un sustrato de bagazo de caña de azúcar y encontraron una actividad enzimática relevante (Karp *et al.*, 2012).

Muchas enzimas son básicas en la industria alimentaria, como la fitasa, la α -amilasa, la peptinasa, la proteasa, la lipasa, la glucoamilasa, la inulinasa, la levansucrasa, la invertasa, y la α -galactosidasa, todas producidas por medio de SSF. Actualmente, en el segmento de las enzimas para bebidas y alimentos se considera que aquellas que se aplican en la industria láctea generan la mayor

cantidad de ventas (alrededor de 402 millones de dólares en el 2009) (Thomas, Larroche, *et al.*, 2013). Por otra parte, una segmentación del mercado de los productos destinados para la alimentación animal y humana muestra que estos agrupan el 34 % del mercado (Parameswaran Binod *et al.*, 2013). Entre las actividades comerciales relacionadas con la alimentación animal, las enzimas encuentran múltiples aplicaciones en la preparación de alimentos para cerdos, aves de corral y ganado bovino.

La α -amilasa ha sido producida a partir de *Bacillus acidicola* inmovilizada para su aplicación en alimentación, a partir de fermentaciones sumergidas y fermentaciones en estado sólido, con mejores rendimientos en la segunda (A. Sharma y T. Satyanarayana, 2012, citado por Thomas, Larroche, *et al.*, 2013). Adicionalmente, esta enzima se utilizó a la par con masa ácida para la obtención de pan, con mejores resultados que los obtenidos con la xilanasa de *Bacillus halodurans* y la enzima termoestable α -amilasa obtenida a partir de *Geobacillus thermoleovorans*. Por otra parte, se utilizó *A. niger* UO-01 para la obtención de α -amilasa en SSF a partir de bagazo de caña de azúcar y utilizando el método de superficie de respuesta y un modelo empírico. Se pudo comprobar que estos modelos son bastantes eficaces para la obtención de la enzima (Rosés y Guerra, 2009, citado por Thomas, Larroche, *et al.*, 2013).

Por otra parte, la producción de inulinasa se ha reportado a partir de SSF utilizando cultivos de *Geotrichum candidum* y *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* sobre cachaza. Sus parámetros fueron optimizados y se obtuvo una producción de 535,2 y 300,5 (U/g de materia seca), respectivamente (Dilipkumar *et al.*, 2013; Tasar, Erdal y Algur, 2014).

Otra enzima producida a partir de SSF es la α -galactosidasa, de suma importancia en medicina y en el campo de la biotecnología. Algunos investigadores compararon las condiciones en SmF y SSF con *A. niger* y un derivado mutagénico, con dos medios distintos, licor de maíz y medio basal de Vogel como fuentes de nitrógeno, y encontraron que el mutante podría dar mejores resultados en la fermentación para la obtención de la enzima (Rajoka, Awan, Saleem y Ayub, 2009). También se han reportado estudios en los cuales se variaron los sustratos empleados como residuos de leguminosas, el tipo de reactor y las condiciones para obtener mejores rendimientos de producción con resultados prometedores (Anisha, John, Prema y Pandey, 2010).

Finalmente, se han llevado a cabo otras investigaciones en relación con la producción de invertasas utilizando *Aspergillus caespitosus* sobre salvado de trigo con fermentaciones sumergidas y en estado sólido y obtenido mejor productividad con este último proceso (Alegre *et al.*, 2009). Proteasas y quitina deacetilasas

igualmente se han producido con *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 (Vishwanatha *et al.*, 2010) y *Colletotrichum lindemuthianum* ATCC 56676, respectivamente, utilizando residuos de caparazón de camarón y salvado de trigo con resultados alentadores cuando el medio fue suplementado con salvado de trigo (Suresh *et al.*, 2011).

Otra aplicación importante a nivel industrial de cierto grupo de enzimas es la producción de detergentes y surfactantes. De acuerdo con Thomas, Larroche, *et al.* (2013), un 29 % del total del mercado de los detergentes global pertenece a este sector, lo cual evidencia su alcance y significación en la economía de los países que basan su productividad en la biotecnología. Las enzimas más producidas a partir de SSF son la alcalino proteasa, xilanas, la alcalino α -amilasa y las lipasas. Algunas investigaciones se han enfocado en la producción de estas enzimas por SmF y SSF con diferentes residuos agroindustriales, utilizando *Trichoderma harzianum* para la producción de lipasa (Coradi *et al.*, 2013) y *Halomonas* sp. PV1 para la producción de alcalino proteasas tolerantes a halógenos en diferentes medios surfactantes, como dodecil sulfato de sodio y otros detergentes (Vijayaraghavan y Vincent, 2012). Asimismo, se han producido algunas proteasas termoestables alcalinas a partir de *Streptomyces* sp. CN902 con sustratos agroindustriales combinados (Lazim, Mankai, Slama, Barkallah y Limam, 2009). Incluso lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales (Figura 30) han sido empleados como fuente microbiana para la producción de alcalino proteasas en SSF y residuos de cáscara de café, cabellos, residuos de la industria de taninos y fibras de soya como sustrato. Se ha obtenido mayor cantidad de enzima con este último sustrato (Abraham *et al.*, 2013).

Figura 30

Lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales



Fuente: <http://www.soapsc.gob.mx/realizan-limpieza-en-la-planta-de-tratamiento-de-aguas-residuales-de-cuatla-por-el-acumulamiento-de-lodos/>

Otros reportes especifican la producción con procesos SSF de distintos tipos de enzimas con diversas aplicaciones, incluidas enzimas que degradan la ocratoxina A –una micotoxina muy peligrosa que afecta los alimentos– (Abrunhosa, Venancio y Teixeira, 2012), así como inulinasas, fitasas, tanasas, oligosacárido oxidasas, esterasas de ácido fenólico y ligninasas, estas últimas de suma importancia en el pretratamiento de material lignocelulósico para la producción de biocombustibles, despulpado, degradación de contaminantes e incluso la conversión de lignina en compuestos químicos de alto valor agregado (A. Pandey, Selvakumar, Soccol y Nigam, 1999).

Por otra parte, la mayor desventaja para la producción de enzimas mediante SSF es su dificultad en el *downstream* debido a la complicada estructura sólida de los sustratos. Ello amerita mayor investigación para mejorar el proceso para diversas enzimas de interés.

Luego de esta revisión de las diferentes enzimas producidas por SSF se aprecia que los rendimientos de su producción son mucho más elevados en comparación con las fermentaciones sumergidas, dato importante para su producción a nivel industrial. Es necesario adecuar y optimizar el diseño de los reactores y optimizar las condiciones que se deben emplear para la producción de cada tipo de enzima y sus soportes, así como también el tipo de sustratos que se va a emplear, aunque resulta evidente que los residuos agroindustriales son sin duda útiles para su producción. Los cultivos de microorganismos modificados genéticamente podrían solucionar un sinnúmero de aspectos relacionados con la tolerancia a inhibidores de crecimiento y con las condiciones extremas medioambientales que por décadas han limitado su aplicación industrial. También resulta relevante ampliar el espectro de aplicaciones catalíticas de las enzimas y el desarrollo de nuevas metodologías de inmovilización aplicables a diversos procesos industriales, lo cual facilitaría su expansión en el mercado y disminuiría los costos de producción de esta industria.

Biopolímeros

Con los años, los biopolímeros han cobrado importancia significativa gracias a su potencial degradación en el suelo por medio de compostaje o en el agua, evitando con ello la acumulación nociva en el medioambiente de plásticos y otros polímeros de origen sintético que destruye numerosos ecosistemas alrededor del mundo. Otro aspecto que promueve la producción de biopolímeros con capacidad de reemplazar los polímeros sintéticos, es la disminución del consumo de fuentes no renovables como el petróleo, lo cual favorece una vez más el medioambiente. Estos biopolímeros se pueden obtener a partir de

múltiples residuos agroindustriales, agrícolas y forestales, lo cual contribuye a una correcta disposición de los residuos y a la generación de productos con valor agregado elevado y a la disminución de la contaminación ambiental. Los biopolímeros biodegradables más producidos son los polihidroxibutiratos y los polihidroxialcanoatos a través de rutas biotecnológicas (Leaf y Srienc, 1998; Ojumu, Yu y Solomon, 2004).

More, Yan, Hoang, Tyagi, y Surampalli (2012), reportaron el uso de lodos pretratados como materia prima para la producción de polímeros extracelulares (EPS) usados como agentes floculantes, mediante la utilización de una cepa de *Serratia* sp. 1. A su vez, con lodos pretratados con soluciones alcalinas y térmicamente, se produjeron luego de 72 horas 2,3 y 3.4 g/l de EPS. Cuando se combinaron con suspensiones de kaolina y calcio (150 mg de Ca^{2+} /l de kaolina), se produjo una floculación máxima del 79,1 % y una dehumidificación del 52,2 %, respectivamente. Estos resultados demuestran la capacidad de estos lodos para ser usados como agentes floculantes en el tratamiento de aguas residuales.

El polihidroxibutirato es un biopolímero que ha atraído la atención por su capacidad de degradación similar a los polímeros termoestables y generado numerosos reportes de investigación que buscan cuantificar y analizar los perfiles de degradación y la capacidad de copolimerizarlos con otros polímeros y ver cómo se afecta su degradabilidad (Sudesh y Iwata, 2008). Muchos residuos agroindustriales y urbanos con contenido lignocelulósico se han utilizado como fuente para la producción de biopolímeros, los cuales se caracterizan por su estabilidad térmica, su biodegradabilidad, buenas propiedades mecánicas, capacidad de reciclaje e incluso conductividad eléctrica (Mtui, 2009).

Algunos biopolímeros como los polihidroxialcanoatos (PHA), los exopolisacáridos o polímeros extracelulares (EPS) y derivados del almidón como las dextrinas, se pueden producir a partir de SSF de residuos agroindustriales. Estos biopolímeros revisten gran importancia para la industria gracias a su biodegradación y en algunos casos por su actividad biológica; por ejemplo, antitumoral, hipoglicémica e incluso inmunoestimulante (Thomas, Larroche, *et al.*, 2013). Generalmente, se utilizan hongos tipo setas y bacterias lácticas para su producción. Se ha demostrado que la producción de estos biopolímeros es óptima cuando se utilizan residuos agroindustriales por su bajo coste y compatibilidad medioambiental, en comparación con los procesos en fermentaciones sumergidas que requieren componentes costosos y en muchos casos su purificación es compleja.

Para la producción de EPS mediante SmF y SSF, se han utilizado agua de coco y jugo de caña de azúcar como sustratos y cultivos de *Lactobacillus confusus*

(Seesuriyachan *et al.*, 2012). En las investigaciones se analizó el efecto de la salinidad de las soluciones y se concluyó que el crecimiento microbiano no tiene un efecto directo sobre la cantidad de EPS producido.

Por otra parte, se han derivado polihidroxialcanoatos (PHA) y polímeros biodegradables a partir de bacterias como *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* y *Alcaligenes latus*, entre otras. El uso de residuos agroindustriales en procesos SSF ha demostrado ser una metodología viable para su producción a escala industrial debido al alto costo del proceso en fermentaciones sumergidas (Castilho, Mitchell, y Freire, 2009).

Los PHA se han producido a partir de una amplia variedad de residuos urbanos y agroindustriales, entre los que se encuentran almidones, molasas, derivados hidrolizados lignocelulósicos, residuos líquidos de la producción de biodiésel (glicerol crudo), proteína de huevo y residuos de lípidos (Koller *et al.*, 2012).

Las dextrinas son otro tipo de biopolímeros producidos por SSF a partir de residuos de semillas frescas y utilizando *Sacharomyces cerevisiae*. Se han obtenido buenos rendimientos con este procedimiento, lo que evidencia su viabilidad industrial (Moussa y Khalil, 2012).

Pigmentos

Cuando se habla de partículas insolubles en el medio en el cual se aplica y usadas por sus propiedades colorantes, magnéticas o protectoras, se hace referencia a los pigmentos (Babitha, 2009). Por otra parte, los colorantes o compuestos de color se aplican a los compuestos solubles y de carácter orgánico con aplicación en industrias como la de alimentos. En muchos casos las expresiones son utilizadas indistintamente para referirse a uno u otro caso (Timberlake y Henry, 1986).

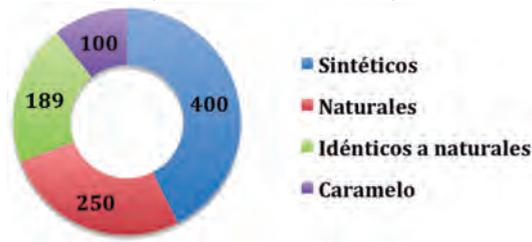
La industria de los colorantes y pigmentos tiene como objetivo fundamental suplir las necesidades de los fabricantes de alimentos y bebidas mediante un amplio portafolio de colorantes y sus aplicaciones de acuerdo con las leyes de cada país (Babitha, 2009). Estas necesidades surgen de la demanda de los consumidores, quienes a su vez responden a factores culturales, medioambientales y sociales a la hora de seleccionar los alimentos. La tendencia actual es a seleccionar alimentos de mayor facilidad y rapidez de preparación dado el afán del día a día de muchas personas. Sin embargo, la tendencia hacia lo natural también es fuerte gracias a la creciente demanda por alimentos más saludables e inocuos.

Aunque no existen datos concretos acerca del tamaño del mercado de los colorantes, se estima que alrededor del mundo se venden unos 940 millones

de dólares al año (Figura 31). Este mercado se encuentra segmentado de la siguiente manera (Babitha, 2009):

- Colorantes sintéticos (400 millones de dólares).
- Colorantes naturales (200 millones de dólares).
- Colorantes idénticos a los naturales (189 millones de dólares).
- Colorantes tipo caramelo (100 millones de dólares).

Figura 31
 Mercado global de los colorantes para la industria de alimentos
 (en millones de dólares)



Fuente: Adaptado de Babitha, 2009

Muchos colorantes son derivados de extractos de plantas y frutas y tienen diversas aplicaciones. Su crecimiento ha sido exponencial en los últimos años gracias a la tendencia hacia lo natural que favorece el desarrollo de colorantes y pigmentos derivados de microorganismos, conocidos como colorantes microbianos. Sus ventajas radican en la seguridad innata de aplicación y su clasificación como sustancias GRAS (seguras para su consumo) por la Agencia Federal de Drogas y Alimentos (U.S. FDA). Asimismo, su producción no depende del clima ni de las estaciones, los rendimientos de producción se pueden predecir, no existen plagas que amenacen su producción y muchos de ellos tienen propiedades medicinales, nutricionales y antioxidantes, lo que los convierte en materias primas para el desarrollo de alimentos funcionales y nutraceuticos. Incluso muchos se pueden producir a partir de residuos de alimentos y residuos agroindustriales, por lo que su producción representa una opción para la correcta disposición y adición de valor de residuos (Babitha, 2009).

Una gran diversidad de microorganismos pueden ser considerados para la producción de color, entre ellos se tienen las bacterias, las levaduras, las algas y los hongos. No obstante, para ser reconocidos como fuente de producción industrial deben cumplir una serie de requisitos que garanticen su inocuidad, sostenibilidad y producción: fácil aislamiento desde su medio de producción; rendimiento de producción sr razonable; no debe ser tóxico; debe ser tolerante

a cambios de pH, temperatura y otros compuestos normalmente inhibidores de crecimiento, y el microorganismo desde el cual se produce se debe reproducir relativamente fácil con las condiciones de producción.

A pesar del gran número de microorganismos considerados para la producción de pigmentos y colorantes, solamente se ha centrado en los hongos ascomicetos, incluso desde tiempos remotos en la cultura oriental (Teng y Feldheim, 2001), como ocurre en el caso del hongo de la especie *Monascus*, gracias a su estabilidad a las condiciones medioambientales como temperatura y pH, pues esto normalmente es un reto cuando se procesan estos colorantes en los alimentos (Babitha, 2009).

Las especies *Monascus* sp. (Figura 32) son conocidas por producir alrededor de seis estructuras distintas de pigmentos, clasificadas según sus coloraciones en tres grupos diferentes (Thomas, Larroche, *et al.*, 2013):

1. Pigmentos amarillos, al cual pertenecen la monascina y la ankaflavina.
2. Pigmentos naranjas, al cual pertenecen la monascorubrina y la rubropunctatina.
3. Pigmentos rojos, al cual pertenecen la rubropuntamina y la monascorrubramina.

Figura 32
Monascus purpureus



Fuente: <http://www.alohaculturebank.com/MonascuspurpureusA.html>

Estos pigmentos forman parte de los policétidos, metabolitos secundarios biosintetizados a partir de unidades de acetilo y propionilo, similar a la biosíntesis de ácidos grasos por hongos, bacterias, plantas y animales (J. A. Robinson,

1991). La producción del pigmento depende fundamentalmente del cultivo y los nutrientes presentes en él. De hecho, si el cultivo es rico en aldohexosas, esto incentivará el crecimiento de *M. purpureus*, mientras que la presencia de azúcares con grupos hidroxilo como el manitol y el sorbitol lo inhiben.

Utilizando procedimientos SSF se han preparado diferentes pigmentos con *M. purpureus* y otros microorganismos.

Monascus se encuentra en principalmente en la comida oriental, en Japón, el sur de China y el sudeste de Asia. Más de cincuenta patentes se han adjudicado en Japón, Estados Unidos, Francia y Alemania, relacionadas con el uso y aplicación de pigmentos derivados de *Monascus* en alimentos (Babitha, 2009). De hecho, el Anka (arroz cultivado con *Monascus*), es un colorante típico de la comida japonesa especialmente usado para enriquecer el contenido proteico y dar pigmentación roja a alimentos tales como cerdo asado y diferentes salsas rojas chinas. Por su capacidad de degradar el almidón y la proteína y producir alcohol, se ha utilizado en la cultura oriental para la producción de vino de arroz rojo y queso rojo de soya fermentada, entre otros. Incluso, numerosos productos de la industria hoy en día como el arroz rojo se desarrollan para constituir productos nutracéuticos capaces de controlar los niveles de colesterol en la sangre, con investigaciones comprobadas en torno al efecto farmacológico del extracto de fermentación de *Monascus* como un producto dietético y como preservante (Babitha, 2009). Los productos de fermentación de *Monascus* se han utilizado también como conservantes en la preservación de carne para reemplazar parcialmente al nitrito de sodio, un conservante sintético cuyos derivados producidos por la combinación de la saliva con este compuesto (nitrosaminas) son considerados cancerígenos y se cree están relacionados con tumores del cerebro, leucemia y cáncer del tracto gastrointestinal (Babitha, 2009).

En una investigación llevada a cabo para la producción de pigmento rojo, se evaluó una cepa de *Monascus purpureus* CMU001 con diferentes condiciones de cultivo y sustratos, con el fin de medir el efecto sobre su crecimiento y producción. Se encontró que la máxima producción de pigmento se daba cuando se cultivaba en dextrosa de papa a 30 °C durante dos semanas con medio de extracto de levadura, glucosa y triptona, y como sustrato harina de maíz (19,4 U/g), en comparación con residuos de coco, harina de maní y de frijol. El máximo rendimiento de producción del pigmento (129,63 U/g) se obtuvo utilizando como sustrato harina de maíz suplementado con 8 % (p/p) de glucosa. Otros sustratos de residuos agroindustriales evaluados fueron residuo de coco (63,50 U/g), harina de maní (52,50 U/g) y harina de frijol (22,50 U/g), suplementados

con glucosa, sorbosa y manitol, y se encontró que favorecieron la producción del pigmento mientras que el xilitol lo inhibió (Nimnoi y Lumyong, 2011).

Por otra parte, Dikshit y Tallapragada (2012) reportaron la producción de pigmento rojo utilizando dos cepas de *Monascus* sp., *Monascus purpureus* MTCC410 y *Monascus sanguineus*. Para las cepas se utilizó arroz integral como sustrato y se dio la máxima producción de pigmento en el día dieciséis (21,9 CVU/ml para *M. sanguineus* y 16,9 CVU/ml para *M. purpureus*). El suplemento del medio con glucosa permitió, por varios órdenes de magnitud, aumentar la producción de pigmento con *M. sanguineus*, pero no así con *M. purpureus* el cual se vio mejorado únicamente con un medio mezclado con un 5 % de extracto de levadura MSG.

En otra investigación, se evaluó la producción de pigmento en un sustrato de arroz, utilizando tanto SSF como SmF y una cepa de *Monascus ruber* (Vidyalakshmi, Singaravadivel y Muruges, 2010). En la investigación se analizó la posibilidad de producción de pigmentos utilizando como única fuente extracto de levadura, lo que generó la producción de 0,524 (370 nm), 1,084 (400 nm) y 0,616 (500 nm) unidades/g para los pigmentos naranja, amarillo y rojo, respectivamente. Al suplementar los medios con fuentes inorgánicas de nitrógeno se incrementó el rendimiento de los pigmentos. El rendimiento de pigmento rojo máximo obtenido fue del 21 % cuando se utilizó extracto de levadura.

La lovastatina, una droga que inhibe la producción de colesterol, ha sido producida a partir de un sustrato de arroz con una cepa de *Monascus purpureus* MTCC 369 con un rendimiento de 3,422 mg/g bajo condiciones óptimas (Panda, Javed y Ali, 2009). La lovastatina inhibe la síntesis de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG CoA reductasa), una enzima que cataliza la conversión de HMG CoA a mevalonato, intermediario en la producción de colesterol. Se ha encontrado que la lovastatina no solamente es una droga que controla la producción de colesterol, sino que además es un agente antiinflamatorio, facilita la apoptosis de células cancerígenas, restaura la función renal y es útil en el tratamiento de desórdenes óseos, entre otras aplicaciones. En general, los pigmentos producidos por *Penicillium* y *Monascus* se parecen estructuralmente, razón por la cual las lovastatinas y las monascolinas producidas por estos y otros hongos, son todas útiles para la inhibición de la biosíntesis de colesterol (Thomas, Larroche, *et al.*, 2013).

Asimismo, algunos pigmentos han sido preparados con el fin de evaluar la capacidad de atrapar radicales libres (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, DPPH) (Dhale y Vijay-Raj, 2009). El cultivo se dispuso a partir del cultivo del hongo *Penicillium* sp. NIOM-02 para la preparación de pigmento rojo a partir

de sustratos de residuos agroindustriales de bagazo de caña de azúcar y trigo. Con este último sustrato se obtuvo un mayor rendimiento del pigmento (9,232 UDO). En este mismo cultivo se produjo amilasa, lo que hace de este cultivo algo prometedor para aplicaciones alimentarias, nutracéuticas y farmacéuticas.

Otros investigadores han estudiado diversos sustratos, optimizado condiciones de producción de los pigmentos y evaluado diferentes cepas de microorganismos y posibles aplicaciones de los compuestos obtenidos, demostrando con ello la versatilidad de la SSF para producir pigmentos de gran interés para la industria en general (Ahmad y Panda, 2014; Čertík, Adamechová, y Guothová, 2013; General *et al.*, 2014; Gortari y Hours, 2013; Hernández-Almanza *et al.*, 2014;).

La capacidad de los hongos filamentosos y de las plantas de producir su propio alimento y el hecho de que existen diversas especies de hongos, hacen que se dé una gran diversidad de estructuras de pigmentos producidos, los cuales, además, presentan funciones variadas como protección contra agentes oxidantes (antioxidantes como los carotenoides), protección de la piel (melanina) contra factores externos y como cofactores que facilitan la acción enzimática de algunos biocatalizadores (flavinas) (Babitha, 2009). Esta diversidad de estructuras químicas cuyas propiedades cromofóricas garantizan pigmentos y coloraciones únicas, es aprovechada en la industria de los alimentos especialmente. Entre la pluralidad de estructuras químicas se cuenta con estructuras tipo quinonas (antraquinonas y naftaquinonas), flavinas (riboflavinas) y policétidos, producidas por los hongos filamentosos.

Durán, Teixeira, De Conti, y Esposito (2002), destacan en su revisión la producción por hongos de diferentes pigmentos y su interés y aplicación en la industria. Entre estos pigmentos resaltaron la catenarina, el crisofanol, la cinodontina, la helmitosporina, la tritisorina y la eritroglauca, producidos por hongos de especies como *Eurotium* spp., *Fusarium* spp., *Curvularia lunata* y *Drechhslera* spp. Por otra parte, los pigmentos amarillos epurpurina A, B y C, han sido aislados de *Emericella purpurea* (Mapari *et al.*, 2005), mientras que las falconensinas A-H y las falconensinas A1 y B2, fueron producidas por *Emericella falconensis* y *Emericella fructiculosa* (Ogasawara, Mizuno, y Kawai, 1997).

Saborizantes y aromatizantes

Los compuestos químicos aromáticos son aquellos que poseen un olor o fragancia especial. Se encuentran naturalmente en extractos de plantas, animales y en aceites esenciales y se utilizan en alimentos, bebidas, perfumes, cosméticos y para la aromaterapia. En la comida son valiosos porque proveen sabor y aroma a los alimentos (Aguedo *et al.*, 2004). Los compuestos aromáticos confieren

propiedades organolépticas y sensoriales a los alimentos y bebidas y su estudio reúne múltiples ramas de la ciencia y la tecnología por su complejidad estructural.

Los compuestos aromáticos pueden ser extraídos de fuentes naturales pero generalmente se requiere gran cantidad de ellos, lo cual hace de este proceso algo altamente costoso e invita a otras formas de obtención a los formuladores de aroma. Algunos de estos compuestos son sintetizados químicamente, aunque esta alternativa pierde interés porque en el mundo los consumidores demandan compuestos provenientes de fuentes naturales asociados a una buena salud. Otra alternativa consiste en la obtención biotecnológica de los compuestos con ayuda de enzimas provenientes de microorganismos.

El mercado de los saborizantes y aromas se estima en unos siete mil millones de dólares al año y constituye el 25 % del mercado de aditivos de alimentos (Armstrong y Yamazaki, 1986, citados por Dastager, 2009).

Los compuestos aromáticos se clasifican según las familias químicas a las cuales pertenecen. Los más importantes son los derivados de los lípidos, como aldehídos, cetonas, ácidos grasos y lactonas, y derivados aromáticos carotenoides. Aunque hay una gran cantidad de compuestos aromáticos, solamente algunos de ellos se han obtenido por vías biotecnológicas; no obstante, su interés crece día a día por su bajo costo (Janssens *et al.*, 1992).

Los microorganismos pueden sintetizar compuestos aromáticos a través de rutas metabólicas (metabolitos secundarios) durante la fermentación de aminoácidos y azúcares como nutrientes presentes en el medio de cultivo. Se dan dos posibilidades de producción mediante la utilización de microorganismos que determinan sus propiedades organolépticas y sensoriales. Por una parte, la producción de alimentos y bebidas con el aroma formando parte del procesamiento, como en el caso del queso, el yogurt, la cerveza y el vino, entre otros. Por la otra, la preparación de cultivos de organismos diseñados específicamente para obtener un compuesto aromático que puede ser aislado y usado como aditivo aromático y saborizante. De esta forma la industria alimentaria obtiene los compuestos aromáticos denominados naturales.

Por su parte, las enzimas han sido utilizadas para catalizar la biosíntesis de diferentes compuestos aromáticos promovida por la adición de intermediarios o precursores que facilitan la producción. Entre estas enzimas se encuentran las lipasas, las proteasas y las glucosidasas, entre muchas otras (Adinarayana *et al.*, 2004).

La catálisis enzimática para la producción de compuestos aromáticos permite obtener compuestos ópticamente activos (un enantiómero puro), de una posible

mezcla racémica, lo cual favorece las características organolépticas del compuesto, evita sobrecostos por procesos de purificación y permite obtener aditivos categorizados como naturales aceptados por la oficina de la FDA (U.S. Drug y Food Administration) como seguros para el consumo humano y cuyos procesos no atentan contra la seguridad del medioambiente. El principal reto para estos procesos consiste en utilizar enzimas altamente activas y sustratos ricos en los compuestos aromáticos de interés, que permitan obtener rendimientos elevados en la forma de g/kg de sustrato y no de mg/kg de sustrato, como normalmente ocurre. El principal inconveniente de este tipo de producción radica en que el costo es más alto que la producción sintética, pero más limpio y seguro (Benjamin y Pandey, 1997; Beuchat, 1982).

A partir de SSF se ha producido ácido vainillínico, un precursor del sabor y aromatizante a vainilla, utilizando residuos lignocelulósicos y un cultivo de *Phanerochaete chrysosporium* con un método de superficie de respuesta, y obtenido 73,69 mg del ácido/g de materia seca. El valor predicho por la simulación (73,58 mg de ácido/g de materia seca) fue bastante cercano, aunque un poco mayor bajo las condiciones óptimas de desarrollo (Thomas, Larroche *et al.*, 2013).

La fermentación en estado sólido se ha empleado para la producción de diversos compuestos aromáticos, con residuos agroindustriales como sustratos y cultivando microorganismos como hongos y levaduras que tienen la capacidad de producir enzimas y diversos compuestos de aplicación en la industria de alimentos y de aromas. Sin embargo, pese a los esfuerzos demostrados por diversos investigadores, los bajos rendimientos siguen siendo un verdadero inconveniente para la producción a escala industrial. En los últimos años, el interés en la aplicación de la SSF para la producción de enzimas (A. Pandey *et al.*, 1999), saborizantes (Beuchat, 1982; Feron *et al.*, 1996), colorantes (Johns y Stuart, 1991) y otras sustancias de interés para la industria alimentaria, se ha renovado gracias a que se están alcanzando mejores rendimientos y características frente a las fermentaciones sumergidas. Adicionalmente, los reducidos costos del uso de materia prima a base de residuos agroindustriales (que, además, generan valor agregado) es un aspecto muy atractivo para su aplicación. Sin embargo, los problemas asociados con el escalamiento, el *downstream*, la homogeneidad del cultivo y la transferencia de masa y calor, dificultan su aplicación en masa. Con el fin de solucionar estos inconvenientes, se han diseñado biorreactores de tambores que rotan (Stuart, Mitchell, Johns y Litster, 1999), mixtos (Nagel, Tramper, Bakker y Rinzema, 2001) y de inmersión (Rivela, Rodríguez Couto y Sanromán, 2000). Esto ha permitido el avance en la investigación y la posibilidad de obtener diferentes compuestos aromáticos (Feron *et al.*, 1996).

Sustratos agroindustriales tropicales fueron utilizados con un cultivo de *Rhizopus oryzae* a través de SSF para la producción de acetaldehído y 3-metilbutanol, dos compuestos aromáticos volátiles (Christen, Bramorski, Revah y Soccol, 2000). De Araújo, Pastore y Berger (2002) reportaron la producción de un compuesto aromático con una fragancia similar al coco –una lactona insaturada, la 6-pentil- α -pirona (6-PP)– utilizando como sustrato bagazo de caña y un cultivo fúngico, demostrando con ello que la SSF produjo resultados superiores sobre la fermentación sumergida (SmF).

Medeiros *et al.* (2001) informaron sobre la producción de compuestos aromáticos con fragancia frutal con cultivos de *Kluyveromyces marxianus*, utilizando como sustrato bagazo de yuca o *Opuntia ficus indica* y mediante la aplicación de SSF con reactores de lecho fijo. Se identificaron nueve compuestos, de los cuales los mayores fueron acetato de etilo, etanol y acetaldehído.

La producción de pirazinas también se ha reportado a través de SSF con buenos rendimientos y características. De esta manera, Besson, Creuly, Gros y Larroche, (1997) relatan la biosíntesis de la 2,5-dimetilpirazina (2,5-DMP) y la tetrametilpirazina (TMP), usando SSF con cultivos de *Bacillus subtilis* sobre residuos de soya.

A través de SSF también se han producido compuestos utilizados como saborizantes en la mesa, como son el ácido butírico, el ácido láctico y el diacetilo en mezclas de cultivos de *Lactobacillus acidophilus* y *Pediococcus pentosaceus*, sobre un sustrato semisólido de maíz (Escamilla-Hurtado *et al.*, 2005). La producción de ácido láctico también ha sido investigada por numerosos científicos, como se detalla en la sección “ácidos orgánicos”. Soccol *et al.* (1994) reportaron la obtención de ácido láctico a partir de bagazo de caña de azúcar como soporte y utilizando una cepa de *Rhizopus oryzae*. En este caso, se encontró un mejor rendimiento que en la fermentación sumergida.

El salvado de trigo y el sorgo dulce han sido empleados como soportes y como sustratos en condiciones de SSF para la obtención de ácido láctico a través de cultivos de *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus amylophilus* GV6 (Naveena, Altaf, Bhadrappa, Madhavendra y Reddy, 2005).

Allegrone *et al.* (1991) obtuvieron metilcetonas como la 2-heptanona, 2-nonanona y 2-undecanona a partir de un cultivo de *Aspergillus niger* a escala comercial, mediante SSF, para lo cual se empleó la grasa de coco como sustrato, con un rendimiento del 40 %.

Otros compuestos aromáticos también han sido obtenidos a partir de SSF, utilizando arroz pregelatinizado, fibras de miso (producto de la fermentación

de soya y malta o cebada) y de celulosa y aplicando cultivos de *Neurospora* sp., *Zygosaccharomyces rouxii* y *Aspergillus* sp (Besson *et al.*, 1997).

La producción de compuestos aromáticos a partir de siete medios preparados a partir de bagazo de yuca, pulpa de manzana, residuos de amaranto y soya, con cultivos de *Ceratocystis fimbriata*, fue expuesta por Bramorski, Soccol, Christen y Revah (1998), quienes encontraron que los medios de pulpa de manzana, bagazo de yuca y soya produjeron un fuerte olor frutal dulce, mientras que el medio de amaranto produjo un olor a piña. Dieciséis compuestos fueron aislados por cromatografía de gases y quince identificados como un compuesto ácido, seis alcoholes, un aldehído, dos cetonas y cinco ésteres.

Soares, Christen, Pandey, y Soccol (2000) reportaron la obtención de un fuerte aroma a piña utilizando como sustrato cáscara de café y un cultivo de *Ceratocystis fimbriata*. Al analizar el sustrato final, se encontraron compuestos como el acetaldehído, el etanol, el isopropanol, el acetato de etilo, el isobutirato de etilo, el acetato de isobutilo, el acetato de isoamilo y el etil-3-hexanoato. La adición de leucina y la producción de acetato de etilo y de acetato de isoamilo generaron un aroma intenso a banano. También se reportó que la adición de sales minerales disminuía el rendimiento de producción de los compuestos volátiles y la adición de aceite de soya no favoreció su producción.

Recientemente, se ha explorado el efecto del uso de inóculos de kéfir para prolongar la vida útil del queso, mejorar su contenido de compuestos volátiles e incrementar la calidad de sus propiedades organolépticas (Beshkova *et al.*, 2003). Katechaki, Panas, Rapti, Kandilogiannakis y Koutinas (2008) reportaron la producción de queso tipo duro a través de cultivos inmovilizados por procesos de congelado-secado para su maduración. El efecto del kéfir, la temperatura, el pH, la concentración inicial del cultivo, la inmovilización celular y el grado de madurez, fueron analizados a través del estudio. El uso del cultivo de kéfir mejoró la resistencia del queso a la maduración gracias a que redujo el ataque microbiano, prolongando con ello su tiempo de vida útil. Las propiedades organolépticas como el olor, el sabor y la textura mejoraron con la aplicación del cultivo, en comparación con el queso sin kéfir. El análisis de los compuestos volátiles demostró una gran diferencia de alcoholes (75 %), compuestos carbonílicos (75 %) y ésteres (64 %) entre el queso inoculado con kéfir y el que no había sido inoculado. Incluso, se ha comparado el efecto del uso de células de kéfir inmovilizadas sobre caseína y células libres de kéfir previamente secadas, sobre las propiedades organolépticas del queso tipo duro y se encontró un aumento del 216 % en la concentración total de compuestos como ésteres, alcoholes, compuestos carbonílicos y ácidos orgánicos, en comparación con el queso sin inóculo de kéfir (Katechaki, Panas, Kourkoutas, Koliopoulos y Koutinas, 2009).

Fadel, Mahmoud, Asker y Lotfy (2015) investigaron la producción de aroma de coco a partir de bagazo de caña de azúcar como sustrato sólido, utilizando *Trichoderma viride* EMCC-107 como cultivo de microorganismos. Los resultados del análisis de compuestos volátiles y de máxima intensidad de olor demostraron que se produjeron al quinto día del período de inducción, con el máximo contenido de compuestos como la 6-pentil-a-pirona (6-PP) y otros compuestos como δ -octalactona, γ -nonalactona, γ -undecalactona, γ -dodecalactona y δ -dodecalactona, también fueron identificados al día 12 del período de inducción en el aroma de coco. En el estudio se logró correlacionar que el incremento en la biomasa de bagazo de caña favorecía la producción de 6-PP, el compuesto que más contribuye al aroma de coco, lográndose concentraciones mayores 3.62 mg/g de materia seca, que en estudios previos bajo las mismas condiciones de fermentación.

La recuperación de compuestos aromáticos es bastante compleja debido a su extrema volatilidad y degradación fácil en la pasteurización y concentración de sustrato por evaporación. Estos cambios pueden no ser deseables y para aislar los compuestos se deben utilizar técnicas como los fluidos supercríticos, condensación parcial y destilación, inyección de gas, pervaporación y adsorción con resina, Aroujalian y Raisi, 2007).

Los compuestos aromáticos además de ser utilizados en perfumería, cosmética, medicina tradicional y alimentación, también se están utilizando como agentes anti y desespumantes, para soluciones oftalmológicas y para prolongar la vida útil de frutas que no han sido prácticamente procesadas (Anese, Manzano, y Nicoli, 1997; Lanciotti *et al.*, 2004).

Metabolitos secundarios

Los compuestos con actividad biológica son producidos por microorganismos cultivados. Durante la última etapa de crecimiento de los microorganismos en el proceso de fermentación se generan y acumulan los metabolitos secundarios, compuestos con poca influencia directa en el crecimiento o desarrollo de los microorganismos como la producción de material celular, sino que aparecen luego de completar la etapa de crecimiento. La mayoría de los metabolitos secundarios son compuestos antibióticos, micotoxinas, alcaloides, inmunosupresores como la ciclosporina y un supresor del crecimiento de tumores y de la angiogénesis, a saber, la fumigilina.

Los metabolitos secundarios se forman a partir de los metabolitos primarios, los cuales se originan a su vez durante el crecimiento de los microorganismos,

hecho que les permite actuar como bloques de construcción para la biosíntesis de los metabolitos secundarios. Estos metabolitos no son esenciales para el crecimiento y reproducción de los microorganismos. Por otra parte, su producción está determinada por la composición del medio de fermentación, lo cual permite controlarla de acuerdo con las necesidades. No se entiende con exactitud la función de los metabolitos secundarios, razón por la cual se postulan profundas teorías sobre su papel, como defensa y como factores determinantes para la generación de otros procesos bioquímicos subsecuentes al desarrollo y crecimiento de los microorganismos.

La producción de los metabolitos secundarios puede ser manipulada a partir de cambios genéticos, lo cual no alterará la producción de los metabolitos primarios; estos cambios que se pueden llevar a cabo para mejorar la producción o alterar la estructura de los mismos, puede ser insertada en el genoma celular y una vez insertado, su producción se convierte en metabolismo primario.

La producción industrial de metabolitos secundarios se lleva a cabo a partir de fermentaciones sumergidas (SmF) con ayuda de cepas de microorganismos cultivados bajo parámetros fácilmente manipulados y controlados, como el pH, la temperatura, la transferencia de masa y de calor, los nutrientes, la agitación, la concentración del producto e incluso el *downstream* del producto. Sin embargo, la fermentación en estado sólido ha ganado terreno gracias a los diseños relativamente sencillos de los reactores y a la baja cantidad de agua del sustrato sólido, lo cual disminuye costos de transporte, almacenamiento y manipulación dentro de la factoría, y facilita la reproducción de los microorganismos debido a la buena simulación de su hábitat natural, especialmente para los hongos que tienen la capacidad de crecer casi en ausencia de agua. Muchos sustratos pueden ser empleados para la fermentación sin pretratamiento o agitación alguno y menor cantidad de procesos de esterilización. La concentración de los productos al final es alta y su purificación es relativamente sencilla.

Los metabolitos secundarios producidos en la fase estacionaria del crecimiento de los microorganismos (tropofase), pueden serlo a escala comercial para un sinnúmero de aplicaciones en agricultura, medicina y farmacéutica y para la producción de alimentos funcionales y pigmentos. Aunque estos metabolitos se continúan produciendo en procesos sumergidos, la SSF permite, con sus ventajas operativas, disminuir drásticamente los costos de producción gracias a que esta se facilita con menor consumo energético y menor área de producción (reactores más pequeños), demostrando así que se trata de un proceso económico, interesante y ambientalmente amigable para la producción de metabolitos secundarios a partir de residuos agroindustriales y forestales. Esta tecnología

puede impulsar notoriamente la economía de los países en vía de desarrollo pues la materia prima es abundante, siempre y cuando se garantice la efectividad del proceso y el control de las variables.

La biosíntesis de los metabolitos secundarios se ha estudiado profusamente para entender los diferentes mecanismos que los originan. Esto ha permitido el descubrimiento de nuevos compuestos, genes y enzimas que intervienen en el proceso, gracias a la secuenciación del genoma de los hongos (Collemare, Billard, Böhnert y Lebrun, 2008). La importancia comercial de estos compuestos radica en los campos de aplicación en los que intervienen, pues algunos son importantes para la salud –como los antibióticos– o estimulan los factores de crecimiento, al tiempo que muchos, como las micotoxinas, son tóxicos para el ser humano y los animales. Así, los microorganismos que producen antibióticos como las cefalosporinas, la monensina y la tilosina, se cultivan sobre sustratos que sirven de alimento a los animales, con el fin de enriquecer el contenido proteico, pues normalmente son deficientes en proteína.

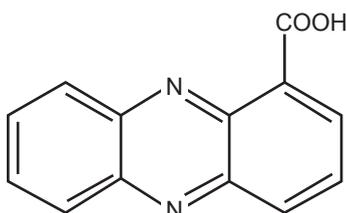
La fermentación en estado sólido se utilizó para la producción de compuestos fenólicos antioxidantes a partir de residuos de frutas, los cuales se introdujeron en empaques comestibles para la prolongación de la vida útil de alimentos. Estos compuestos revisten gran importancia en las industrias alimentarias y farmacéuticas, pues ayudan a reducir el envejecimiento y el cansancio, combaten la producción de cáncer y sirven para conservar los alimentos (Martinez-Avila *et al.*, 2014).

Con el fin de comprender la toxicidad y los mecanismos de descomposición de los alimentos se han cultivado en cereales micotoxinas altamente deletéreas y prestado mucha atención a los factores que favorecen el crecimiento y desarrollo de los hongos en estos alimentos (Greenhalgh, Neish y Miller, 1983). Estas micotoxinas son consideradas con mucha atención por su impacto sobre la economía mundial, entre las cuales uno de los más significativos es el relativo a las pérdidas causadas por contaminación con aflatoxinas de los alimentos para aves de corral, cuyo monto asciende en los Estados Unidos a los cien millones de dólares anuales.

Shah *et al.* (2014), reportaron la producción de unos metabolitos secundarios de color con potencial aplicación en la industria de alimentos, a partir de un hongo nuevo aislado, el *Penicillium verruculosum* SG, junto con su citotoxicidad frente a líneas celulares normales y cancerígenas. El proceso de purificación, que incluyó la aplicación de cromatografía, permitió identificar cinco policétidos y otros compuestos bioactivos. En el caso del oreovactaeno, la monascorubrina

y el piripirropeno, se encontró que tenían buena actividad citotóxica frente a la línea celular cancerígena KA3IT. Por otra parte, estos compuestos exhibieron menor actividad citotóxica frente a las líneas celulares normales IH3T3, HSCT6, HEK293 y MDCK. Finalmente, en esta investigación se logró aislar por primera vez –reportado a partir de un hongo– un antibiótico de largo espectro, el ácido 1-fenazinacarboxílico ($C_{13}H_8N_2O_2$) (Figura 33) gracias a los análisis de la estructura cristalina a través de la difracción de rayos X.

Figura 33
Estructura química del ácido 1-fenazinacarboxílico



Fuente: Adaptado de: http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB1239658_EN.htm

Unos metabolitos secundarios útiles para el diagnóstico de enfermedades, aislados normalmente de la planta *Hypocrella bambuase* y de la *Hypericum*, fueron aislados de microorganismos a partir de SSF. Se trata de los agentes fotodinámicos hipocrelina e hipericina, los cuales se obtuvieron a partir de SSF con cepas de *Shiraia* sp. SUPER-H168 de ocho residuos agroindustriales diferentes, entre los que se encontraban residuos de maíz. Los mejores resultados obtenidos fueron de concentración de hipocrelina A (4,7 mg de Hipocrelina A/g) (Cai *et al.*, 2010, citado por Thomas, Larroche, *et al.*, 2013). Otro metabolito secundario obtenido por SSF y SmF es la cefaloxporina C con el hongo *Acremonium chrysogenum*, único microorganismo capaz de producir esta molécula al limitar la comprensión del mecanismo de su biosíntesis. Por esta razón estudió la expresión de los genes implicados en este mecanismo y se encontraron diferencias y similitudes en los mecanismos de acuerdo con los diferentes parámetros evaluados (Thomas, Larroche, *et al.*, 2013).

Los residuos agroindustriales y forestales son una fuente inagotable que aún no se está utilizando a gran escala –especialmente en países en vía de desarrollo– para la producción de metabolitos secundarios, a pesar de su creciente demanda mundial. Tal parece que las industrias siguen prefiriendo la producción con base en fermentaciones sumergidas debido a la simplicidad del proceso de recuperación del producto, al fácil control de los factores que afectan el proceso

y a su escalabilidad, mientras se ignoran problemas asociados al aumento de la viscosidad por cuenta de los nuevos productos en solución y a la estabilidad del producto.

Se resalta la gran variedad de sustratos que se pueden emplear para la producción de metabolitos secundarios, los cuales según las condiciones de fermentación, podrían favorecer la producción de estos compuestos. Muchos se utilizan en combinaciones para mejorar sus propiedades nutricionales y en algunos casos como soportes inertes para favorecer el crecimiento de los hongos únicamente. Le Goff, Adelin, Cortial, Servy y Ouazzani (2013) notificaron el desarrollo de una planta piloto de dos metros cuadrados utilizando una variante de la fermentación en estado sólido, a saber, la fermentación soportada sobre agar (Ag-SF). En esta investigación se optimizó el rendimiento a partir de la extracción del producto con la técnica de extracción en fase sólida, con el fin de disminuir la contaminación del producto con los componentes del agar. Esta tecnología representa una innovación interesante para mejorar los rendimientos en la producción de metabolitos secundarios, especialmente para las industrias farmacéutica y alimentaria, en donde la pureza del producto es un aspecto considerablemente importante.

Se debe también tener en cuenta la morfología del sustrato como un factor que puede ser determinante a la hora de producir metabolitos secundarios. Un mismo sustrato con distintas morfologías (partículas, fibras, trozos y harina) puede ser metabolizado de diferente manera por el microorganismo. Los más pequeños facilitarán el procesamiento y digestión por el organismo gracias a una mayor área superficial, pero al mismo tiempo implican una mayor dificultad operativa ya que las partículas tienden a empaquetarse mejor, lo que dificulta la transferencia de calor y oxígeno, especialmente en reactores tipo columna o de área superficial amplia. Luego de muchos ensayos de optimización de variables y de sustratos o combinaciones de ellos, se deciden las condiciones de colonización del microorganismo y su reproducción.

Algunos procesos de producción de metabolitos secundarios han enfatizado esta situación, en la cual el tamaño de partícula del sustrato puede afectar seriamente el rendimiento de producción, como ocurrió en la producción de ácido giberélico cuyos máximos rendimientos fueron obtenidos con los tamaños de partículas más grandes del sustrato (salvado de trigo de 0,3 y 0,4 cm), utilizando el cultivo de una cepa de *G. fujikuroi* P-3, seleccionado a partir del *screening* de cinco cepas de *Gibberella fujikuroi* y *Fusarium moniliforme*, y seleccionando las mejores condiciones de fermentación en estado sólido frente a la fermentación sumergida (Singh Nee Nigam, 2009).

En general, se ha encontrado que el rendimiento de producción de metabolitos secundarios es mayor en fermentaciones en estado sólido en comparación con las sumergidas, como ocurrió con la producción de aflatoxina B1 y ocratoxina, cuya mayor producción se logró a partir de SSF. Asimismo, la producción a partir de SSF de la malformina C, un péptido cíclico micotoxínico, utilizando una cepa de *Aspergillus niger*, demostró mayor rendimiento de producción (369 mg/kg), en comparación con la fermentación sumergida (15-200 mg/kg) (Singh Nee Nigam, 2009).

El uso de residuos agroindustriales como sustrato para la producción de metabolitos secundarios se lleva a cabo por varias razones. En primer lugar, los rendimientos de producción en muchos casos son mayores que en fermentaciones sumergidas. En segundo lugar, los microorganismos que se utilizan para este fin generalmente son hongos y actinomicetos, que al ser organismos miceliales se reproducen más fácilmente en este tipo de procesos dada la baja cantidad de agua y la ausencia de agitación. En tercer lugar, en fermentaciones sumergidas este tipo de microorganismos aumenta la viscosidad del medio a medida que se reproducen –especialmente en lo referido a la producción a gran escala– y dificultan la transferencia de oxígeno. Se produce, además, espuma que debe ser contrarrestada con agentes antiespumantes que dificultan aún más la transferencia de oxígeno e interfieren con la purificación del compuesto. En cuarto lugar, en muchos casos los productos deben ser sólidos en su presentación final para facilitar su mecanismo de aplicación, como sucede en la producción de antibióticos. Finalmente, el costo de los procesos en general es menor y los rendimientos en muchos casos son mayores en comparación con los procesos en medio líquido.

Entre los principales sustratos utilizados para la producción de metabolitos secundarios se encuentran los residuos de cereales como trigo y arroz. La aflatoxina, por ejemplo, ha sido producida a partir de maíz (Silman, Conway, Anderson y Bagley, 1979), arroz (Shotwell, Hesseltine, Stubblefield y Sorenson, 1966), maní, harina de maíz y granos de trigo (Chang, Abdel Kader, Wick y Wogan, 1963), así como algunas combinaciones de salvado de trigo y arroz.

Otro aspecto importante para resaltar es el proceso de purificación de los productos finales. Este producto normalmente se puede extraer con diferentes solventes o combinaciones de ellos, principalmente agua y etanol. En general, la concentración de los metabolitos secundarios es mucho mayor cuando se obtiene por SSF. En este proceso de purificación, la SSF presenta una gran ventaja cuando se lleva a cabo a partir de residuos agroindustriales, ya que no es necesario remover las células de los microorganismos antes del proceso de

extracción de los metabolitos secundarios, lo cual disminuye considerablemente el costo de producción, pues se estima que entre el 50 % y el 80 % del costo total de producción de los metabolitos corresponde al costo de purificación (*downstream*), en el caso de la purificación de los metabolitos en procesos de fermentación sumergida. No obstante, en SSF se pueden presentar problemas para la recuperación del producto debido a que los metabolitos secundarios se difunden a través de la matriz sólida, lo que requiere mayores volúmenes de solvente en la extracción y en consecuencia se extraen también cantidades considerables de impurezas, lo que genera la necesidad de purificar el producto crudo especialmente en relación con los metabolitos que van a ser empleados en la industria farmacéutica. Ello incrementa los costos de producción, pero en niveles menores que en el caso de las SmF, en las cuales se extrae toda la masa celular y se hace la separación celular mediante múltiples extracciones por centrifugación. Los factores más importantes para tener en cuenta en una extracción y purificación eficientes, son la cantidad de solvente, la proporción frente a la cantidad de sustrato utilizado y el pH.

La investigación para la búsqueda de las condiciones óptimas de producción de metabolitos secundarios a partir de SSF debe continuar, pues es evidente que el proceso en general es más económico, ambientalmente amigable, operativo y sencillo que las fermentaciones sumergidas si se cuenta con los microorganismos adecuados y en las condiciones óptimas de fermentación, facilitando el diseño correcto del biorreactor. Aún se debe investigar más en los procesos de producción por baches, en otros metabolitos secundarios de interés y en la optimización de las variables de control de proceso.

Biofertilizantes y biopesticidas

Utilizando cepas de *Trichoderma harzianum* SQR-T037 y como sustrato una combinación de estiércol de ganado, residuos de la producción de vinagre y paja de arroz en un proceso SSF, se preparó un fertilizante que contenía el microorganismo y un compuesto, el 6-pentil- α -pirona (6PAP), capaz de controlar la infección del hongo *Fusarium* del pepino, con un excelente rendimiento (1291,73 mg/kg de materia seca) de 6PAP y una excelente eficacia contra el crecimiento del hongo (Thomas, Larroche, *et al.*, 2013).

También se obtuvo un biopesticida basado en *Bacillus thuringiensis*, a partir de una SSF de residuos de cocina como sustrato. Con un diseño de test ortogonal se llevó a cabo la optimización de la composición del sustrato, lo que permitió hacer la mezcla adecuada de los residuos de cocina, salvado de trigo, residuos de soya, cáscara de granos y algunos iones metálicos y la obtención de una capa-

cidad entomopatógena de 15.200 IU/mg. En esta investigación se logró escalar el proceso hasta una producción de 35 kg con buenos resultados (Zhang, Qiu, Gong, Cao, y Wang, 2013).

Biosurfactantes

En la actualidad, muchos investigadores se han centrado en la posibilidad de producir biosurfactantes a partir de la aplicación de SSF, debido a que la utilización de SmF produce cantidades excesivas de espuma por la presencia de exopolisacáridos, que además aumentan la viscosidad del medio. Entre los biosurfactantes producidos se encuentran los soforolípidos, una clase de surfactantes que se encuentra en el medio extracelular de algunas células y es producido por levaduras (Thomas, Larroche, *et al.*, 2013). Los soforolípidos constan de un fragmento de soforosa (extremo hidrofílico) y de un ácido graso con un grupo hidroxilo (extremo hidrofóbico), enlazados por uno o dos uniones. Los soforolípidos presentan múltiples aplicaciones, entre las que se tienen el control de microorganismos; producción de humectantes de la piel; en la industria del petróleo para el control de derrames; en farmacología y medicina para el control del cáncer y proliferación de tumores, y como emulsificante en la industria alimentaria (Thomas, Larroche, *et al.*, 2013). Son muchos los reportes que existen en la literatura de biosurfactantes, tales como los mencionados soforolípidos (Parekh y Pandit, 2012), las surfactinas (Zhu, Zhang, Wei, Ran y Shen, 2013), los ramnolípidos (Camilios-Neto *et al.*, 2011) y los lipopéptidos biosurfactantes (Zhu, Li, Yu, Ran y Shen, 2013).

En una investigación efectuada para analizar la posibilidad de producir soforolípidos a través de una SSF y utilizando *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069, se encontró que el proceso era viable al utilizar como fuente de carbono una mezcla de glucosa (extremo hidrofílico) y tres diferentes extremos lipofílicos (salvado de trigo, polvo de semillas de soya y cáscara de isabgol) (Parekh y Pandit, 2012). El máximo rendimiento de soforolípidos que se obtuvo durante la investigación fue de 18 g por cada 10 g de sustrato con glucosa y ácido oleico (mezclado con salvado de trigo). La estructura de los soforolípidos fue elucidada mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas.

Zhu, Zhang, *et al.* (2013), reportaron la producción de una surfactina a través de una SSF con una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173, paja de arroz y harina de girasol como sustratos. Según los autores, es la primera vez que se reporta la producción de una surfactina por un método SSF con paja de arroz como sustrato. Durante los experimentos, se llegó a la conclusión de que el cultivo del microorganismo se reproducía mejor en un sustrato con una hume-

dad del 62,8 % (v/p) a 26,9 °C durante 48h, y un rendimiento de 15,03 mg de surfactina/g de sustrato seco.

Otra clase de biosurfactante producido por métodos SSF y de especial interés han sido los ramnolípidos por su alta capacidad de biodegradación y baja toxicidad. En una investigación notable por el bajo costo de producción generado, se utilizó un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 en un sustrato compuesto por bagazo de caña de azúcar y salvado de maíz (1:1), lo que generó una alta producción de surfactina (45 g/l de solución impregnante) cuando dicha solución contenía un 6 % (v/v) de aceite de girasol y glicerol (Camilios-Neto *et al.*, 2011).

Los lipopéptidos se han utilizado en procesos de recuperación en derrames de crudo en el mar (Thomas, Larroche *et al.*, 2013). Zhu, Zhang *et al.* (2013), demostraron la obtención de un lipopéptido mediante un proceso SSF de dos etapas y dos temperaturas diferentes: 30 °C y 37 °C, la última de las cuales fue la óptima para el crecimiento microbiano y por ende para la biosíntesis de los lipopéptidos. Los rendimientos de producción en el vaso de vidrio y en el fermentador aumentaron en un 8,4 % y un 13,11 % respectivamente, con una disminución de cuatro horas en el tiempo de fermentación en el fermentador. El proceso se pudo escalar a un volumen mil veces mayor de manera exitosa, demostrando con ello su viabilidad industrial.

Bioprocesos

La SSF se ha utilizado para mediar la producción de muchos otros compuestos de interés y también en procesos que contribuyen a la limpieza y la adecuada disposición de residuos o al mejoramiento y adecuación de productos para su posterior aprovechamiento. En ese vía se tienen varios procesos reportados en diferentes investigaciones, los cuales se describen a continuación.

Biorremediación

Una de las aplicaciones más prometedoras que involucran la SSF es la biorremediación, un proceso que aplica microorganismos y sus enzimas con el fin de retornar un ambiente contaminado con compuestos tóxicos a su estado natural. Este proceso ha sido aprovechado especialmente para el control de colorantes en efluentes industriales (Joshi, Mathur y Khare, 2011). A pesar de que la literatura correspondiente informa acerca de diferentes procesos fisicoquímicos para el control de estos colorantes, dichos tratamientos no son del todo convenientes por sus altos costos y la generación de otros compuestos tóxicos y altamente

peligrosos en muchos casos. Por esa razón, una alternativa viable es el empleo de microorganismos sobre sustratos sólidos con el fin de generar enzimas capaces de degradar estos colorantes.

El grupo de Avinash A. Kadam *et al.* (2013), reportó un 86 % de remoción de un colorante de la industria textil en setenta y dos horas utilizando bagazo de caña pretratado con CaCl_2 en condiciones de SSF, y una cepa de *Providencia staurti* EbtSPG en un biorreactor de bandejas, lo que lo hace un tratamiento muy promisorio para la industria textil y su aplicación a gran escala.

Otros reportes (Kadam, Kamatkar, Khandare, Jadhav y Govindwar, 2013; T. Robinson y Nigam, 2008; Waghmare, Kadam, Saratale y Govindwar, 2014) han demostrando la aplicabilidad de la SSF para la detoxificación y remoción de compuestos peligrosos para la salud y el medioambiente, corroborando con ello su importancia mundial.

Waghmare *et al.* (2014) reportaron un aumento del 60 % al 99 % en la capacidad de adsorción del colorante azul reactivo 172 (RB172) del bagazo de caña, con una cepa de *Providencia staurti* EbtSPG con alta capacidad de degradación del colorante. Luego del proceso de biorremediación, se reportó un aumento en la capacidad de sacarificación enzimática, por lo que el residuo originado se utilizó para la producción de biocombustibles. Este proceso anuncia perspectivas alentadoras en el pretratamiento del residuo utilizado para la biorremediación de un efluente industrial contaminado con un colorante (Figura 34).

Figura 34

Efluente contaminado con un colorante de la industria textil



Fuente: <http://www.cucei.udg.mx/noticia/contaminacion-de-agua-por-colorantes-y-propuesta-de-remediacion>

Biodeslignificación

Otro proceso que se ha fortalecido con la aplicación de SSF es la degradación de la lignina mediante la aplicación de cultivos de diversos microorganismos y la acción de enzimas oxidativas como la lignina peroxidasa (LnP), la manganosa peroxidasa (MnP) y la lacasa, ello gracias a que la SSF permite su obtención a partir de sustratos económicos (residuos agroindustriales). Este proceso tiene una importante aplicación en el tratamiento de efluentes industriales cargados con compuestos tóxicos contaminantes, como colorantes, xenobióticos, fenoles y otros compuestos aromáticos (Niladevi, 2009).

Otro aspecto significativo radica en que durante la preparación de papel se debe separar y degradar la lignina en la pulpa de madera. Al aplicar las enzimas ligninolíticas en el pretratamiento de la pulpa de madera, se facilita la degradación y separación de la lignina mediante un proceso limpio y ambientalmente amigable que conserva intacta la estructura de la celulosa (Kuhad, Singh y Eriksson, 1997).

Actualmente se cuenta con diferentes reportes de la aplicación del sistema enzimático ligninolítico para el blanqueamiento de la pulpa kraft, mediante la aplicación del sistema en sí y de un sistema de lacasa cuyo nombre comercial es Lignozym[®] (Call y Mücke, 1997).

Otras aplicaciones para el sistema enzimático ligninolítico son la estabilización de jugos de la industria vinícola y frutales (Call y Mücke, 1997; Mate y Alcalde, 2015; Minussi, Pastore y Durán, 2002), el lavado de jeans, en la industria cosmética en general (Aaslyng, Roerbaek y Soerensen, 1997) y en la producción de biosensores (Ferry y Leech, 2005).

Entre los microorganismos más empleados para la deslignificación del material vegetal se encuentran los hongos de la podredumbre blanca (Thomas, Larroche *et al.*, 2013). Sin embargo, a la fecha numerosos reportes dan cuenta del uso de actinomicetos (actinobacterias) con este propósito (H. Huang *et al.*, 2008; Kiranmai Reddy, Avasn Maruthi y Aruna Lakshmi, 2010).

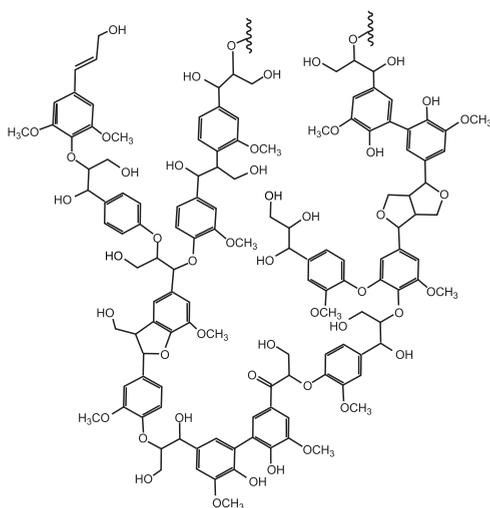
En una investigación llevada a cabo para aprovechar la paja de arroz bajo condiciones SSF, se utilizó una cepa de *Streptomyces griseorubens* ssr38 con el fin de deslignificarla, facilitar el pretratamiento del residuo y aumentar la producción de azúcares. Luego de diez días de inoculación de la paja, se observó una gran capacidad de depolimerización del microorganismo sobre la lignina, evidenciada por un aumento en la cantidad de celulosa, lo que lo convierte en un valioso pretratamiento para la producción de etanol por medio enzimático (Saritha *et al.*, 2013).

La investigación de la dinámica y la actividad enzimática de los sistemas lacasa, Mn-dependiente peroxidasa y Mn-independiente peroxidasa de siete hongos de la madera podrida para la degradación de paja de trigo, fue llevada a cabo por Knežević *et al.* (2013). En el estudio se concluyó que los hongos más promisorios para la producción de lacasa son *Pleorotus ostreatus* y *Pleorotus eryngii*, mientras que *Lenzites betulinus* y *Fomitopsis pinicola* fueron los mejores productores de Mn-dependiente de peroxidasa. Asimismo, *Dichomytus squalens* fue el mejor para la producción de Mn-independiente de peroxidasa, además de ser el mejor sistema para degradar la lignina (34,1%).

La lignina (Figura 35), a diferencia de otros biopolímeros, contiene en toda su estructura enlaces que no sufren fácilmente hidrólisis, lo cual la hace un fuente interesante de carbono (15 % de la biomasa del planeta), pero de acceso complejo (Niladevi, 2009). La mayoría de los residuos agroindustriales contienen material lignocelulósico, por lo cual tener un sistema o mecanismo de aprovechamiento de esta materia prima es de vital importancia para adicionar valor y hacerla más procesable para otras aplicaciones.

Se encuentra en todas las plantas vasculares en su pared celular, entre la celulosa y la hemicelulosa y llena los espacios disponibles unida por enlaces covalentes y presente entre diferente polisacáridos, lo que provee de una increíble fortaleza y estabilidad mecánica a la pared y por ende, a la planta entera (Chabannes *et al.*, 2001).

Figura 35
Estructura propuesta para la lignina



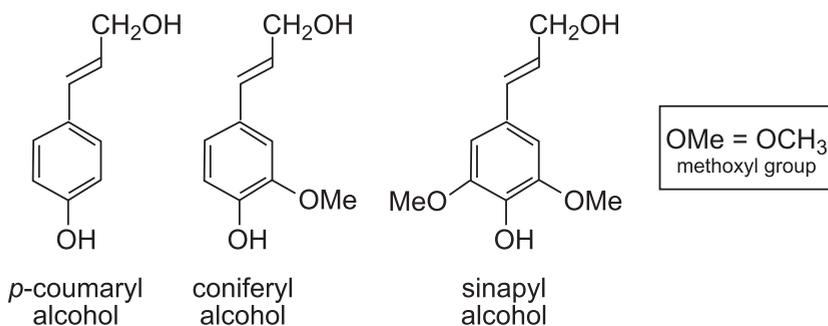
Fuente: adaptado de <http://2008.igem.org/Team:Wisconsin/Project>

La lignina, un polímero altamente polidisperso y heterogéneo tridimensional, se obtiene de la polimerización radicalaria de los precursores fenil propanoides (Figura 36), como el coniferil, el sinapil y los alcoholes *p*-cumarílicos, los cuales contienen anillos aromáticos y una cadena lateral de tres carbonos (Niladevi, 2009).

Esta complejidad molecular es la causante de que la lignina sea uno de los biopolímeros más estables y recalcitrantes de la naturaleza, cuya degradación requiere múltiples reacciones bioquímicas como son el rompimiento de los enlaces intermoleculares, rompimientos de grupos pendientes metílicos, hidroxilaciones, fisión de anillos aromáticos y modificación de las cadenas laterales (Vicuña, 1988). Todo este proceso se puede lograr por medio de los sistemas enzimáticos ligninolíticos de diferentes microorganismos.

Figura 36

Estructura propuesta para los precursores de la lignina



Fuente: <http://dwb4.unl.edu/Chem/CHEM869E/CHEM869ELinks/www.chem.vt.edu/chem-dept/helm/3434WOOD/notes1/lignin>

Debido a la extrema complejidad de la naturaleza de la lignina, es necesario utilizar para su degradación un sistema complejo de enzimas oxidativas, las cuales difieren en características según la fuente de la cual se obtienen.

De la misma manera, los microorganismos productores e estas enzimas varían considerablemente su capacidad de producción en función de la especie involucrada. Además de la LiP, la MnP y Lacasa, se cree que existen otras enzimas con capacidad de degradar la lignina, como son veratril alcohol oxidasa (Bourbonnais y Paice, 1988), aril alcohol dehidrogenasa, quinona oxidoreductasa, ácido aromática reductasa, vanilato hidroxilasa, deoxigenasa, catalasa (Buswell y Eriksson, 1988; Leisola y Fiechter, 1985), glioxal oxidasa (Kersten, 1990) y aldehído aromático oxidasa (Deobald y Crawford, 1989). Sin embargo, se les concede menor importancia a estas enzimas por cuanto se cree que en realidad

producen peróxido de hidrógeno (H_2O_2), requerido por las peroxidasa involucradas en la degradación de la lignina, o que cataliza el rompimiento de la lignina por las enzimas LiP, MnP y lacasa (Niladevi, 2009).

Las enzimas producidas por SSF son más difíciles de purificar que las producidas por SmF, un factor que se debe tener en cuenta a la hora de aplicar este proceso para su producción (Niladevi, 2009). Sin embargo, la pureza de la enzima requerida dependerá de la aplicación industrial a la cual se introducirá. Por ejemplo, la decoloración de compuestos azo, la degradación de fenoles y el bi blanqueamiento, entre otros, no requieren enzimas puras y se pueden aplicar crudas a los medios de reacción para llevar a cabo los procesos de fermentación. Cuando la purificación de las enzimas es requerida, se utilizan generalmente cromatografía de permeación en gel y de intercambio iónico, lo que eleva el costo de producción considerablemente (Kokol, Doliška, Eichlerová, Baldrian, y Nerud, 2007).

Biodetoxicación

Durante el proceso de obtención de aceite de las semillas de *Jatropha curcas* se origina como subproducto una torta que contiene una gran cantidad de proteína útil como suplemento alimentario o para alimentación animal. Sin embargo, también contiene agentes antinutricionales que la contaminan y la hacen inapropiada para esta aplicación, algunos de los cuales son ésteres de forbol y de fitato, un inhibidor de tripsina, lectina y saponina. Por esta razón, no se podría aplicar para alimentación animal o humana a menos que se lleve a cabo un proceso de eliminación de estos agentes tóxicos.

En ese sentido, muchos investigadores han unido esfuerzos para lograr la detoxificación microbiana de este subproducto que podría ser utilizado por la industria alimentaria. Una de esas investigaciones describió el uso de *B. subtilis* y *B. licheniformis* en SSF y SmF para la degradación de los agentes tóxicos presentes en la torta de las semillas. Los mejores resultados se obtuvieron en SmF al analizar el pH, el contenido de los agentes antinutricionales y el crecimiento bacteriano. Se logró una reducción de ésteres de forbol en un 62 %, de fitato en un 42% y del inhibidor de tripsina en un 75 %, aunque la lectina no pudo ser eliminada. Al final se pudo determinar que la detoxificación fue más efectiva en SmF que SSF utilizando las dos cepas bacterianas (Phengnuam y Suntornsuk, 2013). En esa misma dirección, Joshi *et al.* (2011) pudieron degradar completamente los ésteres de forbol utilizando una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PseA en SSF al cabo de nueve días.

Otros autores también han investigado la remoción de toxinas de la torta obtenida mientras se producen enzimas como la lipasa y la proteasa utilizando *Aspergillus versicolor* CJS-98 (Sharath, Mohankumar y Somashekar, 2014; Vee-rabhadrapa, Shivakumar y Devappa, 2014). Bajo condiciones óptimas, este estudio demostró la capacidad de reducir la concentración de agentes tóxicos como ácido fítico, taninos, inhibidores de tripsina, glucósidos cianogénicos y lectinas en un 1,70 %, 0,23 %, 12,5 TIU/g, 560,6 $\mu\text{g}/100\text{g}$ y 0,034mg/ml, respectivamente.

Kadam *et al.* (2015) reportaron el tratamiento efectivo de un lodo con rojo reactivo 120 (RR120) proveniente del tratamiento de aguas de la industria textil, utilizando un tratamiento híbrido entre una coagulación y una fermentación en estado sólido, para la remoción de color. Este consiste de cloruro de zinc (ZnCl_2) y SSF con cepas bacterianas. Incluso, el proceso fue escalado hasta 500 l demostrando con ello completa reducción del color con el tratamiento luego de treinta días.

H. Zhou *et al.* (2014) estudiaron la remoción de agentes tóxicos antinutricionales producidos durante la extracción de flavonoides de *Ginkgo biloba* L., presentes en el residuo (GBLR). En general, este residuo contiene nutrientes en buenas cantidades, pero también agentes tóxicos que lo hacen inviable para aplicaciones alimentarias y para alimentación animal. En este estudio se analizó la posibilidad de utilizar GBLR como sustrato en una SSF mediada por *Candida tropicalis* y *Aspergillus oryzae*, con el fin de producir proteasa y celulasa paralelamente a la detoxificación. Bajo condiciones óptimas de cultivo, se obtuvieron actividades enzimáticas de celulasa y proteasa de 1.168,26 y 3.145,68 U/g, respectivamente. Luego del proceso de fermentación SSF del sustrato GBLR, el ácido gíngkólico –principal agente tóxico– fue reducido de 14,8 a 1,5 mg/g, lo que demuestra la viabilidad de este procedimiento para la detoxificación de este tipo de sustrato y hacerlo útil para su aplicación en alimentación animal.

Rodríguez, Gouiric, Vallejo y Monetta (2014), trataron el alperujo (AL), un residuo del proceso de extracción de aceite de oliva, con una metodología compuesta de dos fases. El alperujo contiene gran cantidad de polifenoles, responsables de fitotoxicidad y de producir antibiosis, por lo que en países como Argentina su disposición directa en aguas no está permitida. Luego de la optimización de las variables determinadas por un diseño de caja de Behnken, se obtuvieron valores de H (47,9 %), SO_4Cu (4,66 %) y de soporte estructural (SS, 36,29 %), que hicieron posible un valor de pérdida de polifenoles (PPL) de 9,8 mg/g de materia seca; es decir, más del 94 % del valor original de polifenoles.

Kadam *et al.* (2014) expusieron la remoción de un colorante azo (rojo disperso 73, DR73), utilizando la adsorción inicial del colorante y bagazo de caña de azúcar como sustrato y posteriormente la fermentación en estado sólido con agentes microbianos rizosféricos promotores del crecimiento de plantas de manera individual, como *Rhodobacter erythropholis* MTCC 4688, *Azotobacter vinelandii* MTCC 1241, *Rhizobium meliloti* NCIM 2757 y el *Bacillus megaterium* NCIM 2054, los cuales mostraron una disminución del color del 44 %, 28 %, 50 % y 61 %, respectivamente. Cuando se utilizó el concepto del consorcio de las rizobacterias, se obtuvo una remoción completa del colorante a las cuarenta y ocho horas de tratamiento.

El campo de la biodetoxicación seguirá expandiéndose debido a su gran impacto en la eliminación de sustancias tóxicas y agentes antinutricionales, especialmente provenientes de la industria textil y de la industria productora de aceites y de biodiésel, abriendo de esta manera un paso acelerado a estos tratamientos biotecnológicos que adicionan valor a los subproductos de una manera segura ambientalmente.

Tipos de reactores en la SSF

En general, la SSF se caracteriza por ser un proceso que se lleva a cabo sobre un soporte sólido en ausencia de agua libre o en muy baja cantidad (entre 0,40 y 0,90), lo cual limita el tipo de microorganismos que pueden efectuar este proceso, como son las levaduras y los hongos, aunque se ha reportado que algunas bacterias también pueden hacerlo. El hecho de que la fermentación se practique sobre un soporte sólido que generalmente proviene de residuos agroindustriales, le da ciertas ventajas en términos de facilidad de purificación, mayor concentración de producto y menor contaminación bacteriana, pero a su vez supone un reto tecnológico sobre todo para su aireación y mezclado a gran escala. Gracias a estas ventajas, los reactores necesarios para ejecutar un proceso SSF son pequeños y con requerimientos energéticos bajos por la baja cantidad de agua libre, lo que también disminuye los costos de esterilización y por ende del proceso en general.

Sin embargo, durante un proceso de SSF la cantidad de calor transferida es menor que en un proceso de fermentación sumergida a causa de la menor cantidad de agua presente, lo cual genera un desafío importante durante el diseño de los reactores. La cantidad de calor generada en un proceso SSF es alta y proporcional a la actividad metabólica presente (Tim Robinson y Poonam Nigam, 2003). El diseño de los reactores y sus consideraciones fueron analizados por Aidoo *et al.*

(1982). Es cierto que en el hemisferio occidental no se ha extendido el uso de esta tecnología tanto como las fermentaciones sumergidas, en comparación con el hemisferio oriental, en donde el conocimiento de más de dos mil años de antigüedad ha sido aplicado y perfeccionado con el paso del tiempo por los investigadores. En las últimas dos décadas han aparecido revisiones en las cuales se discuten en mayor detalle los aspectos de la ingeniería, el desarrollo de los biorreactores y los parámetros que los afectan, entre otros aspectos de vital importancia (Mitchell, Berovič y Krieger, 2006).

Para decidir el tipo de cultivo del sustrato sólido y su diseño se debe considerar el estado físico del sustrato y el tipo de producto que se quiere obtener (Singh Nee Nigam y Pandey, 2009b). Así por ejemplo:

- a. Sólidos con baja humedad se fermentan:
 1. sin ninguna agitación, como se producen Tempeh y Natto.
 2. con agitación ocasional, como se producen Miso y salsa de soya.
 3. con agitación constante, como se produce la aflatoxina.
- b. Sólidos suspendidos se fermentan en columnas de lecho fijo empacadas:
 1. como sucede para la producción de vino de arroz, se circula el líquido a través de la columna.
 2. como sucede con la producción de cerveza kaffir, que contiene un medio líquido estacionario o agitado.

De acuerdo con el diseño del proceso existen dos tipos de sistemas SSF:

1. Fermentación en reactor estático, por ejemplo, fermentaciones en camas (Lonsane, Ghildyal, Budiartman, y Ramakrishna, 1985).
2. El segundo tipo de sistema es fermentación con agitación ocasional o constante; por ejemplo, para la producción de aflatoxina, ocratoxina y enzimas (Silman, 1980; Singh Nee Nigam y Pandey, 2009b). Este sistema comprende cuatro variaciones según la necesidad de agitación: con agitación y con aireación forzada; con agitación sin aireación; sin agitación con aireación, y sin agitación y sin aireación, las cuales se aplican de acuerdo con las necesidades del proceso (Singh Nee Nigam y Pandey, 2009b).

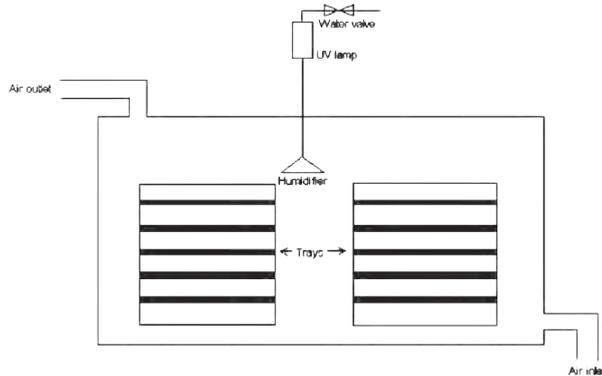
En general, se han clasificado los reactores dentro de tres grandes grupos con base en su tipo de aireación y mezclado: biorreactores de bandeja, biorreactores de tambor y biorreactores de lecho fijo (Tim Robinson y Poonam Nigam, 2003).

Biorreactores de bandeja

Este tipo de biorreactores (Figura 37) utiliza una tecnología relativamente simple, ya que no se aplica aireación forzada ni mezclado para el sustrato. Sin embargo, en estos reactores la cantidad de sustrato que se puede emplear para la fermentación es relativamente pequeña, ya que se deben mantener las condiciones aeróbicas y evitar un sobrecalentamiento, lo que se logra manteniendo una capa delgada de sustrato. Los parámetros que se controlan son temperatura y humedad relativa, haciendo pequeñas perforaciones en la parte posterior del sustrato para permitir su aireación entre bandeja y bandeja, las cuales se organizan una debajo de la otra (Durand, 1998). En general, los reactores de bandeja no han evolucionado mucho, excepto en el cambio de material de bandejas de madera a bandejas plásticas o de aluminio, que favorecen la asepsia del proceso. Su aplicabilidad a escala industrial es poca debido al gran espacio que utilizan, a su manipulación manual necesaria y a su dificultad para adaptación a gran escala (Singh Nee Nigam y Pandey, 2009b).

Figura 37

Biorreactor de bandeja tipo koji



Fuente: adaptado de Tim Robinson y Poonam Nigam (2003)

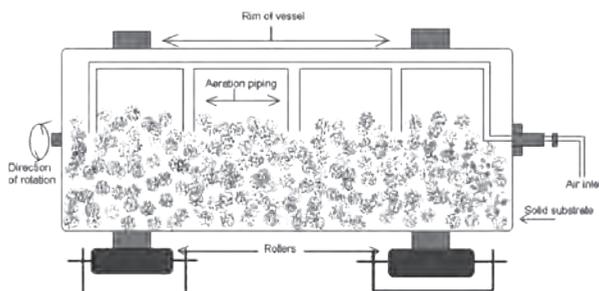
Biorreactores de tambor

Este tipo de reactores (Figura 38) permite una adecuada aireación y agitación, y el cuidado del sustrato y el inóculo de microorganismos de una acumulación excesiva de calor o daño mecánico. El mezclado en este tipo de biorreactores se hace rotando el vaso completo o utilizando diferentes dispositivos como remos y deflectores, con el fin de facilitar y mejorar la transferencia de calor y hacer que los nutrientes se distribuyan de manera eficiente y uniforme. En este tipo

de reactores hay una mayor probabilidad de que las fuerzas de cizallamiento producto de la rotación y agitación que se generan afecten o dañen el cultivo de hongos; sin embargo, en términos generales se considera que el crecimiento del inóculo es mejor y más uniforme en este tipo de biorreactores, frente a los biorreactores de bandejas.

Figura 38

Biorreactor de tambor de rotación



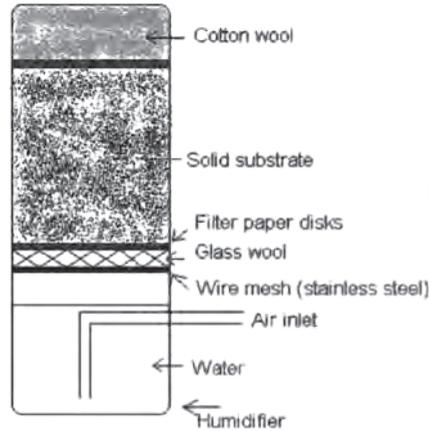
Fuente: adaptado de Tim Robinson y Poonam Nigam (2003)

En este tipo de biorreactores se suministra aire a través de una entrada y el exceso de gas se controla mediante una válvula de salida. Sin embargo, a pesar de la mejora en el mezclado y la aireación, controlar los aumentos de temperatura producto de la actividad metabólica no es una tarea fácil en este tipo de diseños, lo cual afecta el crecimiento del inóculo y el desarrollo de producto.

Biorreactores de lecho fijo

Este tipo de biorreactores (Figura 39) fue diseñado como una alternativa a los mencionados anteriormente. Es en forma de columna sobre una base que contiene el soporte sólido, con vidrio o plástico y con un orificio en el soporte a través del cual se fuerza la aireación. En estos biorreactores se han producido ácidos orgánicos, metabolitos secundarios y enzimas. La aireación se aplica en el fondo de la columna, con un aire relativamente húmedo para controlar el desecamiento del sustrato. Cuando se tienen reactores a escala piloto, la temperatura se controla usando chaquetas de enfriamiento. A escala de laboratorio, los reactores son de 30 cm de altura y la temperatura se controla con baños de agua. Sin embargo, en general los biorreactores de esta clase presentan problemas de remoción del producto, transferencia de calor, crecimiento no uniforme del inóculo y problemas de escalamiento.

Figura 39
Biorreactor de columna empaquetada



Fuente: adaptado de Tim Robinson y Poonam Nigam (2003)

Conclusiones y perspectivas

Gracias a sus ventajas operativas y a su bajo costo, la fermentación en estado sólido puede ser aplicada a diversas clases de residuos agroindustriales, urbanos y agrícolas, para fin de obtener productos como metabolitos secundarios, enzimas, ácidos orgánicos, alimentos funcionales, alimentos para animales, pigmentos, compuestos aromáticos, biocombustibles, biosurfactantes, biofertilizantes y biopesticidas, entre muchos otros. Es importante que los residuos seleccionados se produzcan en cantidad suficiente para alimentar constantemente los sistemas de producción y evitar su agotamiento, así como conocer la composición de los residuos y los procesos que se deben escalar. Se debe continuar el desarrollo de más biorreactores que permitan escalar los procesos, una vez estos han sido optimizados a escala de laboratorio gracias al conocimiento de sus variables y los factores que afectan los rendimientos de producción. Es necesario que en nuestro país se siga contribuyendo con la bioprospección de la microflora a fin de ampliar el portafolio de posibilidades para la producción y mejoramiento de los procesos SSF, aumentando de esta manera los rendimientos, la estabilidad de los microorganismos y su tolerancia a diferentes factores medioambientales.

De acuerdo con la tendencia, en los próximos años los procesos de biorremediación y biodetoxicación que favorecen la estabilidad del planeta y disminuyen la contaminación ambiental, contarán con un mayor número de microorganismos

y posibilidades de procesamiento, gracias a las investigaciones en estos campos que crecen día a día. Los procesos que utilizan consorcio de microorganismos y procesos de hidrólisis y fermentación simultáneas también seguirán aumentando en las próximas décadas, gracias a la creciente necesidad y al profundo conocimiento que se está generando en estos aspectos. La investigación en el escalamiento e industrialización de la producción de enzimas, metabolitos secundarios, pigmentos y compuestos aromáticos, deberá continuar con el fin de mejorar el portafolio de posibilidades para toda la humanidad, el cual a la fecha es deficiente.

Bibliografía

- AASLYNG, D.; ROERBAEK, K. y SOERENSEN, N. (1997). *An enzyme for dyeing keratinous fibres: Google Patents*.
- ABRAHAM, J.; GEA, T. y SÁNCHEZ, A.. (2013). "Potential of the solid-state fermentation of soy fibre residues by native microbial populations for bench-scale alkaline protease production". In: *Biochemical Engineering Journal*, 74(0), 15-19. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.02.008>
- ABRUNHOSA, L.; VENANCIO, A. y TEIXEIRA, J. (2012). "Optimization of process parameters for the production of an OTA-hydrolyzing enzyme from *Aspergillus niger* under solid-state fermentation". In: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112, pp. 351-355.
- ADINARAYANA, K., *et. al.* (2004). "Optimization of process parameters for production of lipase in solid-state fermentation by newly isolated *Aspergillus* species". In: *Indian Journal of Biotechnology*, 3(1), pp. 65-69.
- A.E. ATABANI, A. (2013). "Non-edible vegetable oils: A critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production". In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 18, pp. 211-245.
- AGGELOPOULOS, T., *et. al.* (2014). "Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production". In: *Food chemistry*, 145, pp. 710-716.
- AGUEDO, M., *et. al.* (2004). "The use of enzymes and microorganisms for the production of aroma compounds from lipids". In: *Food Technology and Biotechnology*, 42(4), pp. 327-336.
- AHMAD, M., y PANDA, B. P. (2014). "Optimization of red pigment production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under solid-state fermentation

- using response surface methodology". In: *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 36(4), pp. 439-444.
- AIDOO, K.; HENDRY, R. y WOOD, B. (1982) "Solid Substrate Fermentations". In: Vol. 28. *Advances in Applied Microbiology* (pp. 201-237).
 - AKPAN UG, K. (2005). "The production of ethanol from maize cobs and groundnut shells". In: *AU J Technol*, 9, pp. 106-110.
 - ALBERGARIA, H. et. al. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010, 86 (3), pp. 965-972.
 - ALLEGRONE, G., et. al. (1991). "On the steric course of the microbial generation of (Z6) -gamma-dodecenolactone from (10R,S) 10-hydroxy-oc-tadeca-(E8,Z12)-dienoic acid". In: *Biotechnology Letters*, 13(11), pp. 765-768.
 - ANBUSELVI, S.; AVINASH y JHA, M. (2015). "Optimization of single cell protein from Chinese potato by submerged fermentation". In: *Der Pharmacia Lettre*, 7(4), pp. 281-283.
 - ANESE, M.; MANZANO, M., y NICOLI, M. (1997). "Quality of minimally processed apple slices using different modified atmosphere conditions". In: *Journal of Food Quality*, 20(5), pp. 359-370.
 - ANISHA, G., et. al. (2010). "Investigation on α -Galactosidase Production by *Streptomyces griseoalbus* in a Forcefully Aerated Packed-Bed Bioreactor Operating in Solid-State Fermentation Condition". In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(2), 421-427. doi: 10.1007/s12010-008-8345-6
 - ANNAND, J. y MAINI, S. (1997). "Utilisation of fruit and vegetable wastes". In: *Indian Food Packer*, 51, pp. 45-63.
 - ARANTES V, S. E. (2011). "Optimal recovery process conditions for manganese peroxidase obtained by solid-state fermentation of eucalyptus residue using *Lentinula edodes*". In: *Biomass and Bioenergy*, 35 (9), pp. 4040-4044.
 - ARMSTRONG, D. W. y YAMAZAKI, H. (1986). "Natural flavours production: a biotechnological approach". In: *Trends in Biotechnology*, 4(10), pp. 264-268. doi: 10.1016/0167-7799(86)90190-3
 - AROUJALIAN, A. y RAISI, A. (2007). "Recovery of volatile aroma components from orange juice by pervaporation". In: *Journal of Membrane Science*, 303(1-2), pp. 154-161. doi: 10.1016/j.memsci.2007.07.004

- ARVANITOYANNIS, I. y KASSAVETI, A. (2008). "Fish industry waste: Treatments, environmental impacts, current and potential uses". In: *International Journal of Food Science and Technology*, 43(4), pp. 726-745. doi: 10.1111/j.1365-2621.2006.01513.x
- ARVANITOYANNIS, I.; KASSAVETI, A. y LADAS, D. (2008). "Food waste treatment methodologies". In: *Waste management for the food industries* (pp. 345-359). Elsevier.
- ARVANITOYANNIS, I. S., y LADAS, D. (2008). "Meat waste treatment methods and potential uses". In: *International Journal of Food Science and Technology*, 43(3), pp. 543-559. doi: 10.1111/j.1365-2621.2006.01492.x
- ASKAR, A. y TREPTOW, H. (1998). "Nebenprodukte bei der Verarbeitung tropischer Früchte". In: *Industrielle Obst-und Gemüseverwertung*, 83, pp. 7-13.
- AVELINO, A. et. al. (1997). "Saccharification of tomato pomace for the production of biomass". In: *Bioresource Technology*, 61, pp. 159-162.
- AZCÁRATE GORDILLO, F., et. al. (2013). *Informe de laboratorio: Obtención de biodiésel de aceites de fritura*. Cali: Universidad de San Buenaventura.
- AZIZ, S.; SARKANEN, K. y TAPPI, J. (1989). *Organosolv pulping: a review*. 72 (3), pp. 169-173.
- BABITHA, S. (2009). *Microbial pigments Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues* (pp. 147-162).
- BALAT, M. (2011). "Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review". In: *Energy Conversion and Management*, 52, pp. 858-875.
- BALAT, M.; BALAT, H. y Öz, C. (2008). "Progress in bioethanol processing". In: *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, pp. 551-573.
- BALDENSPERGER, J. et. al. (1985). "Solid state fermentation of banana wastes". In: *Biotechnology Letters*, 7(10), pp. 743-748.
- BALLESTEROS I, N. M. (2006). "Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw". In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 130, 496-508.
- BAMBIDIS, V. y ROBINSON, P. (2006). "Citrus by-products as ruminant feeds: A review". In: *Animal Feed Science and Technology*, 128, pp. 175-217.

- BANERJEE S, M. S. (2010). "Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies". In: *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4, pp. 77-93.
- BARRINGTON, S. et. al. (2009). "Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in a column bioreactor". In: *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26(2), pp. 422-427.
- BENIWAL, Vikas et. al. (2013). "Production of tannase through solid state fermentation using Indian Rosewood (*Dalbergia Sissoo*) sawdust—a timber industry waste". In: *Annals of Microbiology*, 63(2), pp. 583-590. doi: 10.1007/s13213-012-0508-6
- BENJAMIN, S., y PANDEY, A. (1997). "Coconut cake - A potent substrate for the production of lipase by *Candida rugosa* in solid-state fermentation". In: *Acta Biotechnologica*, 17(3), pp. 241-251. doi: 10.1002/abio.370170308
- BENJUMEA HERNÁNDEZ, P.; AGUDELO SANTAMARÍA, J. y RÍOS, L. (2009). *Biodiésel: Producción, calidad y caracterización*. Medellín: Editoria Universidad de Antioquia.
- BERG. (2001). *World bioethanol production, the distillery and bioethanol network*. Retrieved 19 de Junio de 2013 from <http://www.distill.com/worldethanol-production.htm>
- BERK, Z. (2009). "Spoilage and preservation of food". In: Z. Berk, *Food process engineering and technology* (pp. 351-354). Elsevier.
- BESSON, I. et. al. (1997). "Pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation on soybeans". In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(5), pp. 489-495. doi: 10.1007/s002530050961
- BEUCHAT, L. (1982). "Flavor chemistry of fermented peanuts". In: *Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development*, 21(4), pp. 533-536.
- BOCCO, A. et. al. (1998). "Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts". In: *Journal of agricultural and food chemistry*, 46, pp. 2123-2129.
- BOTELLA, C. (2005). "Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace". In: *Biochem. Eng. J.*, 26 (2-3), pp. 100-106.

- BOUALLAGUI, H. *et al.* (2003). "Mesophilic biogas production from fruit and vegetable waste in a tubular digester". In: *Bioresource Technology*, 86(1), pp. 85-89. doi: 10.1016/S0960-8524(02)00097-4
- BOURBONNAIS, R. y PAICE, M. G. (1988). "Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*". In: *Biochemical Journal*, 255(2), pp. 445-450.
- BRAVO, L. y SAURA-CALIXTO, F. (1998). "Characterization of a dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace". In: *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, pp. 135-141.
- BROWN, M. *et al.* (1998). "Engineering-economic studies of energy technologies to reduce greenhouse gas emissions: opportunities and challenges". In: *Annual review of energy environment*, 23, pp. 31-39.
- BUENROSTRO-FIGUEROA, J. *et al.* (2014). "Potential use of different agroindustrial by-products as supports for fungal ellagitannase production under solid-state fermentation". In: *Food and Bioprocess Technology*, 92(4), pp. 376-382. doi: 10.1016/j.fbp.2013.08.010
- BUSSAMRA, B.; FREITAS, S. y COSTA, A. (2015). "Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail". In: *Bioresource Technology*, 187(0), pp. 173-181. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.117>
- BUSTAMANTE, M. A. *et al.* (2008). "Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry". In: *Waste Management*, 28(2), pp. 372-380. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2007.01.013>
- BUSWELL, J. A. y ERIKSSON, K. E. (1988) "NAD(P)H dehydrogenase (quinone) from *Sporotrichum pulverulentum*". In: Vol. 161. *Methods in Enzymology* (pp. 271-274).
- CAI, Yujie, *et al.* (2010). "High-Yield Hypocrellin A Production in Solid-State Fermentation by *Shiraia* sp. SUPER-H168". In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(8), pp. 2275-2286. doi: 10.1007/s12010-009-8728-3
- CALL, H. y MÜCKE, I. (1997). "History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process)". In: *Journal of Biotechnology*, 53(2-3), pp. 163-202. doi: 10.1016/S0168-1656(97)01683-0

- CAMILIOS-NETO, D. *et. al.* (2011). "Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil". In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), pp. 1395-1403.
- CAMPOS, Elena (2012). "Procesos biológicos: la digestión anaeróbica y el compostaje". In: *Tratamiento y valorización energética de residuos* (pp. 2-97). Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- CAMPS, M. y MARCOS, F. (2008). *Energías Renovables: Los biocombustibles* (segunda edición ed.). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- CARDONA CA, Q. J. (2009). "Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives". In: *Bioresource Technology*, 101 (13), pp. 4754-4766.
- CARERE, C. *et. al.* (2008). "Third Generation Biofuels via Direct Cellulose Fermentation". In: *International Journal of Molecular Sciences*, 9, pp. 1342-1360.
- CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. y GIRIO, F. (2008). "Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments". In: *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67, pp. 849-864.
- CARVALHO, A. P. *et. al.* (2004). "Solubility and peptide profile affect the utilization of dietary protein by common carp (*Cyprinus carpio*) during early larval stages". In: *Aquaculture*, 234(1-4), pp. 319-333. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.01.007
- CASCO, J. y MORAL, R. *Compostaje*. Mundiprensa Libros.
- CASTELLANOS, Ó.; RAMÍREZ, D. y MONTAÑEZ, V. (2006). "Perspectiva en el desarrollo de las enzimas industriales a partir de la inteligencia tecnológica". In: *Ingeniería e Investigación*, 26, pp. 52-67.
- CASTILHO, LR; MEDRONHO. RA y ALVES, T. (2000). "Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*". In: *Bioresource Technology*, 71 (1), pp. 45-50.
- CASTILHO, L. R.; MITCHELL, D. y FREIRE, D. (2009). "Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation" In: *Bioresource Technology*, 100, pp. 5996-6009.

- CASTRO C, Z. R. (2011). "Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes". In: *Carboh. Polym.*, 84 (1), pp. 96-102.
- ČERTÍK, M.; ADAMECHOVÁ, Z. y GUOTHOVÁ, L. (2013). "Simultaneous enrichment of cereals with polyunsaturated fatty acids and pigments by fungal solid state fermentations". In: *Journal of Biotechnology*, 168(2), 1 pp. 30-134. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.03.016
- ČERTÍK, M.; ADAMECHOVÁ, Z. y LAOTENG, K. (2012). "Microbial production of γ -linolenic acid: Submerged versus solid-state fermentations". In: *Food Science and Biotechnology*, 21(4), pp. 921-926.
- CHABANNES, M. *et al.* (2001). "In situ analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels". In: *Plant Journal*, 28(3), pp. 271-282. doi: 10.1046/j.1365-313X.2001.01159.x
- CHANG, S. B. *et al.* (1963). "Aflatoxin B₂: Chemical identity and biological activity". In: *Science*, 142(3596), pp. 1191-1192.
- CHAPLA, Digantkumar, *et al.* (2010). "Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification". In: *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), pp. 361-369. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2010.01.012>
- CHEN, H.; YANG, Y. y ZHANG, J. (2009). "Biotechnological potential of cereal (wheat and rice) straw and bran residues". In: *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues* (pp. 327-340).
- CHEN, J. *et al.* (2014). "Screw extrude steam explosion: A promising pre-treatment of corn stover to enhance enzymatic hydrolysis". In: *Bioresource Technology*, 161, pp. 230-235.
- CHEN, W., *et al.* (2013). "Pilot-scale study on the acid-catalyzed steam explosion of rice straw using a continuous pretreatment system". In: *Bioresource Technology*, 128, pp. 297-304.
- CHEN Y, S.-S. R. (2007). "Ensiling agricultural residues for bioethanol production". In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 143, pp. 80-92.

- CHERUBINI, F. (2010). "The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals". In: *Energy Conversion and Management*, 51(7), pp. 1412-1421. doi: 10.1016/j.enconman.2010.01.015
- CHIU, S. y CHAN, S. (1992). "Production of pigments by *Monascus purpureus* using sugar-cane bagasse in roller bottle cultures". In: *World Journal of Microbiology y Biotechnology*, 8(1), pp. 68-70. doi: 10.1007/BF01200689
- CHOI, J. et. al. (2012). "Bioactive peptides in dairy products". In: *International Journal of Dairy Technology*, 65(1), pp. 1-12. doi: 10.1111/j.1471-0307.2011.00725.x
- CHOUCHOULI, Vaya et. al. (2013). "Fortification of yoghurts with grape (*Vitis vinifera*) seed extracts". In: *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), pp. 522-529. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.03.008>
- CHRISTEN, P; VILLEGAS, E. y REVAH, S. (1994). "Growth and aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in various fermentation media". In: *Biotechnology Letters*, 16(11), pp. 1183-1188. doi: 10.1007/BF01020848
- CHRISTEN, P. et. al. (2000). "Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes". In: *Bioresource Technology*, 71(3), pp. 211-215. doi: 10.1016/S0960-8524(99)00084-X
- ClubDarwin.Net. (7 de febrero de 2013). *ClubDarwin.Net*. Retrieved 20 de abril de 2014 from Aumenta producción mundial de frutas y verduras pese a la caída en Europa: <http://www.clubdarwin.net/seccion/negocios/aumenta-produccion-mundial-de-frutas-y-verduras-pese-la-caida-en-europa>
- CODA, R. et. al. (2008). *Applied and Environmental Microbiology*. 74, pp. 7391-7398.
- COLLEMARE, J. et. al. (2008). "Biosynthesis of secondary metabolites in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*: the role of hybrid PKS-NRPS in pathogenicity". In: *Mycological Research*, 112(2), pp. 207-215. doi: 10.1016/j.mycres.2007.08.003
- COLOMBATTO, D. et. al. (2004). "In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage. III. Comparison of enzymes derived from psychrophilic, mesophilic or thermophilic sources". In: *Animal Feed Science and Technology*, 111(1-4), pp. 145-159. doi: 10.1016/j.anifeeds-ci.2003.08.012

- COLOMER, F., y GALLARDO, A. (2013). *Tratamiento y gestión de residuos sólidos*. México D.F.: Limusa.
- CONTRERAS, C. (2006). *Diplomado gestión ambiental empresarial para funcionarios de ETB*. Retrieved 06 de febrero de 2014 from Manejo integral de aspectos ambientales-residuos sólidos: http://www.javeriana.edu.co/ier/recursos_user/IER/documentos/OTROS/Pres_Residuos_CamiloC.pdf
- CORADI, G. *et al.* (2013). "Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*". In: *Annals of Microbiology*, 63(2), pp. 533-540. doi: 10.1007/s13213-012-0500-1
- CORDOVA, J. *et al.* (1998). "Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse". In: *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 5(1-4), pp. 75-78. doi: 10.1016/S1381-1177(98)00067-8
- COUNCIL. (2006). *Biofuels in the european union: a vision for 2030 and beyond*. Retrieved, mayo 3, 2015
- CUNHA, F. *et al.* (2014). "Liquefaction of sugarcane bagasse for enzyme production". In: *Bioresource Technology*, 172(0), pp. 249-252. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.025>
- DAHOD, S. (1999). "Raw materials selection and medium development for industrial fermentation processes". In: A. Demain, y J. Davies, *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* (2 ed., pp. 213-220). Washington DC: ASM Press.
- DALLAGNOL, A. *et al.* (2013) *Applied Microbiology and Biotechnology*. November 2013, 97, pp. 3129-3140.
- DA SILVA, L. *et al.* (2012). "Optimization of Chitosanase Production by *Trichoderma koningii* sp. Under Solid-State Fermentation". In: *Food and Bioprocess Technology*, 5(5), pp. 1564-1572. doi: 10.1007/s11947-010-0479-1
- DAS P, G. A. (2004). "Influence of pretreatment for deashing of sugarcane bagasse on pyrolysis products". In: *Biomass and Bioenergy*, 27, pp. 445-457.
- DAUBRESSE, P. *et al.* (1987). "Process for protein enrichment of cassava by solid substrate fermentation in rural conditions". In: *Biotechnology and Bioengineering*, 29(8), pp. 962-968.

- DE, G. (2003). "Effect of catalyst on yield of liquid products from biomass via pyrolysis". In: *Energy Source*, 25, pp. 753-765.
- DE ARÁUJO, Á.; PASTORE, G. y BERGER, R. (2002). *Production of coconut aroma by fungi cultivation in solid-state fermentation*. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 98-100, pp. 747-751. doi: 10.1385/ABAB:98-100:1-9:747
- DE CASSIA PEREIRA, J. et. al. (2015). "Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification". In: *Journal of Applied Microbiology*, 118(4), pp. 928-939. doi: 10.1111/jam.12757
- DE FREITAS, A. et. al. (2014). "Production and application of amylases of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* from industrial waste in acquisition of glucose". In: *Chemical Papers*, 68(4), pp. 442-450. doi: 10.2478/s11696-013-0466-x
- DELAVIER, H. (1998). "Utilization of bagasse". In: P. Van der Poel, H. Schiweck, y T. Schwartz, *Sugar Technology* (pp. 451-478). Berlin: Bartens.
- DEMIRBAS, A. (2005). "Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass". In: *Energy Sources*, 27, pp. 327-333.
- DEOBALD, L. y CRAWFORD, D. (1989). *Lignin biotransformations by an aromatic aldehyde oxidase produced by Streptomyces viridosporus T7A*. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 20-21(1), 153-163. doi: 10.1007/BF02936480
- DE OLIVERIA, V. (2005). "Ethanol as fuel: energy, carbon dioxide balances, and ecological footprint". In: *BioScience*, 55, pp. 593–602.
- DE SOUSA, J. et. al. (2012). "Cassava rest inclusion levels on initial and growth broilers diets". In: *Revista Brasileira de Saude e Producao Animal*, 13(4), pp. 1044-1053.
- DEVANESAN MG, V. (2007). "Transesterification of jatropha oil using immobilized *Pseudomonas fluorescens*". In: *Afr J Biotechnol*, 6, pp. 2497-2501.
- DEVESA-REY, R. et. al. (2011). "Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling". In: *Waste Management*, 31(11), pp. 2327-2335. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2011.06.001>
- DHALE, M. y VIJAY-RAJ, A. (2009). "Pigment and amylase production in *Penicillium* sp NIOM-02 and its radical scavenging activity". In: *Inter-*

- national Journal of Food Science y Technology*, 44(12), pp. 2424-2430. doi: 10.1111/j.1365-2621.2009.01983.x
- DHILLON, G. *et al.* (2011). "Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*". In: *Biochemical Engineering Journal*, 54(2), pp. 83-92.
 - ————. (2013). "Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor". In: *Industrial Crops and Products*, 41(1), pp. 78-84.
 - DIKSHIT, R. y TALLAPRAGADA, P. (2012). "Comparative study of *monascus sanguineus* and *monascus purpureus* as potential sources for red pigment production". In: *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(4), pp. 885-895.
 - DILIPKUMAR, M.; RAJAMOHAN, N. y RAJASIMMAN, M. (2013). "Inulinase production in a packed bed reactor by solid state fermentation". In: *Carbohydrate Polymers*, 96(1), pp. 196-199. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.078>
 - DOMÍNGUEZ, E. *et al.* (2014). "A biorefinery approach based on fractionation with a cheap industrial by-product for getting value from an invasive woody species". In: *Bioresource Technology*, 173, pp. 301–308.
 - DONG, N. *et al.* (2005). "Effect of replacing soybean meal with soya waste and fish meal with ensiled shrimp waste on the performance of growing crossbred ducks". In: *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18(6), pp. 825-834.
 - DRIEHUIS, F. *et al.* (2008). "Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands". In: *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 1(1), pp. 41-50. doi: 10.1080/19393210802236927
 - DU, C. *et al.* (2008). "A wheat biorefining strategy based on solid-state fermentation for fermentative production of succinic acid". In: *Bioresource Technology*, 99(17), pp. 8310-8315.
 - DUNIÈRE, L. *et al.* (2013). "Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms". In: *Animal Feed Science and Technology*, 182(1-4), pp. 1-15. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2013.04.006
 - DUQUE, S.; CARDONA, C., y MONCADA, J. (2015). "Techno-economic and environmental analysis of ethanol production from 10 agroindustrial

- residues in Colombia". In: *Energy and Fuels*, 29(2), pp. 775-783. doi: 10.1021/ef5019274
- DURÁN, N. *et. al.* (2002). "Ecological-friendly pigments from fungi". In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(1), pp. 53-66. doi: 10.1080/10408690290825457
 - DURAND, A. (1998). "Solid state fermentation". In: *Biofutur*(181), 41-43.
 - EEVERA, T. (2009). "Biodiesel production process optimization and characterization to assess the suitability of the product for varied environmental conditions". In: *Renew Energy*, 34, pp. 762-765.
 - EL-NAGGAR, N. *et. al.* (2014). "Bioprocessing of some agro-industrial residues for endoglucanase production by the new subsp.; *Streptomyces albogriseolus* subsp. *cellulolyticus* strain NEAE-J." In: *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, pp. 743-751.
 - EL-SAYED, A.; KHALAF, S. y AZIZ, H. (2013). "Characterization of homocysteine gamma-lyase from submerged and solid cultures of *Aspergillus fumigatus* ASH (JX006238)". In: *J Microbiol Biotechnol*, 23(4), pp. 499-510.
 - ESAWY, M. *et. al.* (2013). "Levansucrase optimization using solid state fermentation and levan biological activities studies". In: *Carbohydrate Polymers*, 96(1), pp. 332-341. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.089>
 - ESCAMILLA-HURTADO, M. *et. al.* (2005). "Effect of culture conditions on production of butter flavor compounds by *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus acidophilus* in semisolid maize-based cultures". In: *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), pp. 305-316. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.014
 - EVERS, D. y CARROLL, D. (1996). "Preservation of crab or shrimp waste as silage for cattle". In: *Animal Feed Science and Technology*, 59(4), pp. 233-244. doi: 10.1016/0377-8401(95)00908-6
 - FADEL, H. *et. al.* (2015). "Characterization and evaluation of coconut aroma produced by *Trichoderma viride* EMCC-107 in solid state fermentation on sugarcane bagasse". In: *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(1), pp. 5-9. doi: 10.1016/j.ejbt.2014.10.006
 - FAO. (2004). *Depósito de documentos de la FAO: La economía mundial del banano 1985-2002*. Retrieved 20 de abril de 2014 from Capítulo 1: Panorama

- general de la producción y el comercio mundial del banano: <http://www.fao.org/docrep/007/y5102s/y5102s00.htm>
- Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia. (2013). *FedeBiocombustibles*. Retrieved 13 de junio de 2013 from Cifras Informativas del Sector Biocombustibles. Etanol de caña anhidro: <http://www.fedebiocombustibles.com/v3/noticias-fedebiocombustibles-sub-16.htm>
 - Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia. (Mayo de 2013). *FedeBiocombustibles*. Retrieved 13 de junio de 2013 from Cifras Informativas del Sector Biocombustibles. Biodiésel de palma de aceite: http://www.fedebiocombustibles.com/v3/main-pagina-id-4-titulo-proceso_de_los_biocombustibles.htm
 - FERRAZ DE ARRUDA, L.; BORGHESI, R. y OETTERER, M. (2007). "Use of fish waste as silage - A review". In: *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(5), pp. 879-886.
 - FERREIRA, V. et. al. (2010). "Production of Pectate Lyase by *Penicillium viridicatum* RFC3 in Solid-State and Submerged Fermentation". In: *International Journal of Microbiology*, 2010. doi: 10.1155/2010/276590
 - FERRY, Y. y LEECH, D. (2005). "Amperometric detection of catecholamine neurotransmitters using electrocatalytic substrate recycling at a laccase electrode". In: *Electroanalysis*, 17(2), pp. 113-119. doi: 10.1002/elan.200403069
 - FONSECA, R. et. al. (2011). "Development of cereal bar with pineapple skin". In: *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 61(2), pp. 216-223.
 - FREEDMAN B. (1984). "Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils". In: *J Am Oil Chem Soc*, 61, pp. 1638-1643.
 - GARCÍA-CUBERO, M. et. al. (2009). "Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw". In: *Bioresour. Technol*, 100, pp. 1608–1613.
 - GASIOREK, E. y LESNIAK, W. (2002). *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 11, pp. 31-37.
 - ————. (2002). *Prace Naukowe Akademii Ekonomicznej imienia Oskara Langego we Wroclawiu*, 949, 67.
 - GENERAL, T. et. al. (2014). "Fungal utilization of a known and safe macroalga for pigment production using solid-state fermentation". In: *Journal of Applied Phycology*, 26(3), pp. 1547-1555. doi: 10.1007/s10811-013-0168-3

- GLASSNER, D. (1999). "Corn stover potential: recasting the corn sweetener industry". In: E. Janick J (Ed.), *Perspectives on new crops and new uses*. (pp. 74-82). Alexandria: ASHS Press.
- GOLLOP, N.; ZAKIN, V. y WEINBERG, Z. G. (2005). "Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants". In: *Journal of Applied Microbiology*, 98(3), pp. 662-666. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02504.x
- GORTARI, M. y HOURS, R. (2013). "Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: A mini-review". In: *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(3). doi: 10.2225/vol16-issue3-fulltext-10
- GOVINDASWAMY S, V. (2007). "Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast". In: *Bioresource Technol*, 98, pp. 67-85.
- GRANDE, C. (2013). *Manual de prácticas de química orgánica*. Cali, Colombia: Bonaventuriana.
- GRANDE, C. (2014). *Aprovechamiento de residuos agroindustriales. Biocombustibles*. Cali: Bonaventuriana.
- ————. (2015). *Residuos animales y vegetales. Una alternativa sostenible para el desarrollo de la agroindustria*. Editorial bonaventuriana. Universidad de San Buenaventura Cali, pp. 79-90.
- ————. (2016). *Residuos agroindustriales. Biocombustibles*. Lemoine editors, Editorial bonaventuriana, Universidad de San Buenaventura Cali. pp. 61-74.
- GREENHALGH, R.; NEISH, G. A. y MILLER, J. D. (1983). "Deoxynivalenol, acetyl deoxynivalenol, and zearalenone formation by Canadian isolates of *Fusarium graminearum* on solid substrates". In: *Applied and Environmental Microbiology*, 46(3), pp. 625-629.
- GROHMANN, Karel; BALDWIN, ElizabethA, y BUSLIG, BélaS. (1994). "Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45-46(1), pp. 315-327. doi: 10.1007/BF02941808
- GUPTE, A. y MADAMWAR, D. (1997). "Solid State Fermentation of Lignocellulosic Waste for Cellulase and β -Glucosidase Production by Cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*". In: *Biotechnology Progress*, 13(2), pp. 166-169. doi: 10.1021/bp970004g

- GUSTAVSSON, J. *et al.* (2011). *Global Food Losses and Food Waste - Extent, Causes and Prevention, International Congress Save Food!*, Retrieved 25 de Octubre de 2014 from FAO: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/ags/publications/GFL_web.pdf.
- HAMELINCK, H. (2005). "Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term". In: *Biomass and bioenergy*, 28, pp. 384-410.
- HARLAND, J. (1998). "Uses of beet pulp". In: P. Van der Poel, H. Schiweck, y T. Schwartz, *Sugar Technology* (pp. 430-443). Berlín: Bartens.
- HARTA, O., *et al.* (2004). "Effect of various carbohydrate substrates on the production of kefir grains for use as a novel baking starter". In: *Food chemistry*, 88, pp. 237-242.
- HEITZ, M. *et al.* (1986). "Generalized correlations for the aqueous liquefaction of lignocellulosics". In: *Can J Chem Eng* 64, pp. 647-650.
- HENDRIKS, A. y ZEEMAN, G. (2009). "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass". In: *Bioresource Technology*, 100, pp. 10-18.
- HERNÁNDEZ-ALMANZA, A. *et al.* (2014). "Rhodotorula glutinis as source of pigments and metabolites for food industry". In: *Food Bioscience*, 5, pp. 64-72. doi: 10.1016/j.fbio.2013.11.007
- HERRRERA, J. y VÉLEZ, J. (2008). *Caracterización y aprovechamiento del aceite residual de frituras para la obtención de un biocombustible (Biodiésel)*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
- HIDENO, A. *et al.* (2009). "Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw". In: *Bioresource Technology*, 100, pp. 2706–2711.
- HIGGINBOTHAM, J. y McCARTHY, J. (1998). "Quality and storage of molasses". In: P. Van der Poel, H. Schiweck, y T. Schwartz, *Sugar Technology* (pp. 973-992). Berlín: Bartens.
- HORN, S.; ASPMO, S. I. y EIJSINK, V. G. H. (2005). "Growth of *Lactobacillus plantarum* in media containing hydrolysates of fish viscera". In: *Journal of Applied Microbiology*, 99(5), pp. 1082-1089. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02702.x

- HSU, T. *et. al.* (2010). "Effect of dilute acid pre-treatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis". In: *Bioresource Technology*, 101, pp. 4907-4913.
- HUANG, H. *et. al.* (2008). "Effect of biodelignification of rice straw on humification and humus quality by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces badius*". In: *International Biodeterioration and Biodegradation*, 61(4), pp. 331-336. doi: 10.1016/j.ibiod.2007.06.014
- HUERTA, S. *et. al.* (1994). "Absorbed substrate fermentation for pectinase production with *Aspergillus niger*". In: *Biotechnology Techniques*, 8(11), pp. 837-842. doi: 10.1007/BF00152894
- HUITRÓN, C. (1984). *Production of microbial enzymes from agro-industrial by-products*. *Enz. Eng.*, 7, pp. 110-114.
- HUSSAIN, M.; CHOLETTE, Susan y CASTALDI, Richard M. (2008). "An Analysis of Globalization Forces in the Wine Industry". In: *Journal of Global Marketing*, 21(1), pp. 33-47. doi: 10.1300/J042v21n01_04
- IRITANI, S. *et. al.* (1996). *Alkali-treated bagasse, and its preparation and uses: Google Patents*.
- ISTC. (2006). *Feasibility report, small scale biodiesel production*. Waste Management and Research Center.
- ITO, K. *et. al.* (1990). "Volatile compounds produced by the fungus *Aspergillus oryzae* in rice Koji and their changes during cultivation". In: *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70(3), pp. 169-172. doi: 10.1016/0922-338X(90)90178-Y
- J. BULLOCK, B. K. (1987). *Basic Biotechnology*. Londres: Academic Press Inc.
- J., S. (2007). "Agricultural Marketing Policy". Retrieved 17 de junio de 2013 from *Small Scale Biodiesel Production: An Overview.*: <http://www.amcp.montana.edu/policypaper/policy22.pdf>.
- J.F. COSTA, M. A.-F. (2013). *Biodiesel production using oil from fish canning industry wastes*. *Energy Conversion and Management*, 74, pp. 17-23.
- JAIN, A. (1995). "Production of xylanase by thermophilic *melanocarpus albomyces* IIS-68". In: *Process Biochemistry*, 30(8), pp. 705-709. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)00037-9](http://dx.doi.org/10.1016/0032-9592(94)00037-9)

- JARGTIANI, J.; CHAN, H. y SAKAI, S. (1988). "Papaya". In: *Tropical fruit processing* (pp. 105-147). San Diego: Academic Press.
- JAYANI, R.; SAXENA, S. y GUPTA, R. (2005). "Microbial pectinolytic enzymes: A review". In: *Process Biochemistry*, 40(9), pp. 2931-2944. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026>
- JAYAPRAKASHA, G.; SINGH, R. y SAKARIAH, R. (2001). "Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro". In: *Food chemistry*, 73, pp. 285-290.
- JESURAJ, V. et. al. (2013). "Bioprocessing Of Ar Isolates For Economical Production Of L – Glutaminase By Solid State Fermentation". In: *International Journal of ChemTech Research*, 5(4), pp. 1428-1436.
- JOHN, R.; NAMPOOTHIRI, K. y PANDEY, A. (2006). "Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*". In: *Process Biochemistry*, 41(4), pp. 759-763. doi: 10.1016/j.procbio.2005.09.013
- JOHNS, M. y STUART, D. (1991). "Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture". In: *Journal of Industrial Microbiology*, 8(1), pp. 23-28.
- JONGKO, P. (2014). *Milling*. Retrieved 30 de Septiembre de 2014 from <https://sites.google.com/site/duratwas/produksi/milling>
- JOSHI, C.; MATHUR, P. y KHARE, S. (2011). "Degradation of phorbol esters by *Pseudomonas aeruginosa* PseA during solid-state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake". In: *Bioresource Technology*, 102(7), pp. 4815-4819. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.039>
- KADAM, A. et. al. (2013). "Solid-state fermentation: Tool for bioremediation of adsorbed textile dyestuff on distillery industry waste-yeast biomass using isolated *Bacillus cereus* strain EBT1". In: *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2), pp. 1009-1020. doi: 10.1007/s11356-012-0929-6
- KAMAT, S. et. al. (2013). "Coupled production of single cell oil as biodiesel feedstock, xylitol and xylanase from sugarcane bagasse in a biorefinery concept using fungi from the tropical mangrove wetlands". In: *Bioresource Technology*, 135, pp. 246-253.
- KARIMI K, K. (2006). "Conversion of rice straw to sugars by dilute acid hydrolysis". In: *Biomass and Bioenergy*, 30, pp. 247-253.

- KARP, S. *et. al.* (2012). "Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse". In: *Bioresource Technology*, 114(0), pp. 735-739. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.058>
- KARTHIKEYAN, A. y SIVAKUMAR, N. (2010). "Citric acid production by Koji fermentation using banana peel as a novel substrate". In: *Bioresource Technology*, 101(14), pp. 5552-5556.
- KATECHAKI, E. *et. al.* (2008). "Production of hard-type cheese using free or immobilized freeze-dried kefir cells as a starter culture". In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), pp. 5316-5323. doi: 10.1021/jf703585y
- ————. (2009). "Thermally-dried free and immobilized kefir cells as starter culture in hard-type cheese production". In: *Bioresource Technology*, 100(14), pp. 3618-3624. doi: 10.1016/j.biortech.2009.02.061
- KAUSHIK, P.; MISHRA, A. y MALIK, A. (2014). "Dual application of agricultural residues for xylanase production and dye removal through solid state fermentation". In: *International Biodeterioration y Biodegradation*, 96(0), pp. 1-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.08.006>
- KERSTEN, P. J. (1990). "Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(8), pp. 2936-2940.
- KHALDI, Nora *et. al.* (2008). "Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi". In: *Genome Biology*, 9(1), R18.
- KIM S, D. B. (2004). "Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues". In: *Biomass and Bioenergy*, 26, pp. 361-375.
- KIRANMAI REDDY, M.; AVASN MARUTHI, Y. y ARUNA LAKSHMI, K. (2010). "Aspergillus flavus and phanerochaete chrysosporium as potential delignifying mycoflora of dump yard: A case study". In: *Rasayan Journal of Chemistry*, 3(3), pp. 438-444.
- KIRK, T. y FARRELL, R. (1987). "Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin". In: *Ann. Rev. Microbiol*, 41, pp. 465-505.
- KNEŽEVIĆ, Aleksandar *et. al.* (2013). "Lignin degradation by selected fungal species". In: *Bioresource Technology*, 138(0), pp. 117-123. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.182>

-
- KNOTHE, G. (2005). "The history of vegetable oil-based fuels". In: G. Knothe, J. Gerpen, y J. Krahl, *The Biodiesel Handbook* (pp. 4-16). Champaign (Illinois): AOCS Press.
 - KOBBE, B. et. al. (1977). "Production and antibacterial activity of malformin C, a toxic metabolite of *Aspergillus niger*". In: *Applied and Environmental Microbiology*, 33(4), pp. 996-997.
 - KOKOL, V. et. al. (2007). "Decolorization of textile dyes by whole cultures of *Ischnoderma resinosa* and by purified laccase and Mn-peroxidase". In: *Enzyme and Microbial Technology*, 40(7), pp. 1673-1677. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.08.015
 - KOLLER, M. et. al. (2012). "Whey Lactose as a Raw Material for Microbial Production of Biodegradable Polyesters". In: *INTECH Open Access Publisher*.
 - KOOTSTRA, A. et. al. (2009). "Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw". In: *Biochemical Engineering Journal*, 46, pp. 126-131.
 - KOSSEVA, M. R. (2013). "Recovery of commodities from food wastes using solid-state fermentation". In: *Food Industry Wastes* (pp. 77–102).
 - KOUTINAS, A. et. al. (2005). "Kefir yeast technology: scale-up in SCP production using milk whey". In: *Biotechnology and Bioengineering*, 89, pp. 788-796.
 - ————. (2009). "Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production". In: *Bioresource Technology*, 100, pp. 3734-3739.
 - KRISTINSSON, H. G. y RASCO, B. A. (2000). "Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties". In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), pp. 43-81.
 - KUBIKOVA, J. et. al. (1996). "Hydrothermal pre-treatment of wheat straw for the production of pulp and paper". In: *TAPPI J*, 79, pp. 163-169.
 - KUFORJI, O.; KUBOYE, A. y ODUNFA, S. (2010). "Orange and pineapple wastes as potential substrates for citric acid production". In: *International Journal of Plant Biology*, 1(1), pp. 19-21.

- KUHAD, R.; SINGH, A. y ERIKSSON, K. (1997). "Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls". In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 57, pp. 45-125.
- KUHN, D. D. *et. al.* (2008). "Use of microbial flocs generated from tilapia effluent as a nutritional supplement for shrimp, *litopenaeus vannamei*, in recirculating aquaculture systems". In: *Journal of the World Aquaculture Society*, 39(1), pp. 72-82. doi: 10.1111/j.1749-7345.2007.00145.x
- KUMAR, P. y LONSANE, B. (1987a). "Gibberellic acid by solid state fermentation: consistent and improved yields". In: *Biotechnology and Bioengineering*, 30(2), pp. 267-271.
- ————. (1987b). "Potential of fed-batch culture in solid state fermentation for production of gibberellic acid". In: *Biotechnology Letters*, 9(3), pp. 179-182.
- KURBANOGLU, E. B. (2003). "Investigation of the use of ram horn hydrolysate for fungal protein production". In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(11), pp. 1134-1138. doi: 10.1002/jsfa.1514
- KURBANOGLU, E. B. y ALGUR, O. F. (2002). "Single-cell protein production from ram horn hydrolysate by bacteria". In: *Bioresource Technology*, 85(2), pp. 125-129. doi: 10.1016/S0960-8524(02)00094-9
- LADEIRA, S. *et. al.* (2015). "Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility". In: *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(2), pp. 110-115. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.12.008>
- LANCIOTTI, R. *et. al.* (2004). "Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits". In: *Trends in Food Science and Technology*, 15(3-4), pp. 201-208. doi: 10.1016/j.tifs.2003.10.004
- LARGA T. *et. al.* "Activación de la superficie a base de plasma-agua-vapor para la modificación triclorosilano de PMMA". In: *Langmuir* 2006, (22) 4104-9.
- LARRAURI, J. *et. al.* (1996). "Mango peels as a new tropical fibre: Preparation and characterization". In: *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 29, pp. 729-733.
- LAZIM, H. *et. al.* (2009). "Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902". In: *Journal of Industrial Microbiology y Biotechnology*, 36(4), pp. 531-537. doi: 10.1007/s10295-008-0523-6

- LE GOFF, G. *et. al.* (2013). "Application of solid-phase extraction to agar-supported fermentation". In: *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(9), pp. 1285-1290. doi: 10.1007/s00449-012-0873-3
- LEAF, T. y SRIENC, F. (1998). "Metabolic modeling of polyhydroxybutyrate biosynthesis". In: *Biotechnology and Bioengineering*, 57(5), pp. 557-570. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19980305)57:5<557::AID-BIT8>3.0.CO;2-F
- LEE, J. *et. al.* (2015). "Microbial response to single-cell protein production and brewery wastewater treatment". In: *Microbial Biotechnology*, 8(1), pp. 65-76. doi: 10.1111/1751-7915.12128
- LEISOLA, M. y FIECHTER, A. (1985). *New trends in lignin biodegradation* (Vol. 5).
- LEUNG, C. *et. al.* (2012). "Utilisation of waste bread for fermentative succinic acid production". In: *Biochemical Engineering Journal*, 65, pp. 10-15.
- LEUNG, D. (2006). "Transesterification of neat and used frying oil: optimization for biodiesel production". In: *Fuel Process Technol*, 87, pp. 883-890.
- LEUNG, D. y GUO, Y. (2006). "Transesterification of neat and used frying oil: optimization for biodiesel production". In: *Fuel Process Technol*, 87, pp. 883-890.
- LEUNG, D.; WU, X. y LEUN, M. (2010). "A review on biodiesel production using catalyzed transesterification". In: *Applied Energy*, 87, pp. 1083-1095.
- LEVIDOW, L. (2013). "EU criteria for sustainable biofuels: Accounting for carbon, depoliticising plunder". In: *Geoforum*, 44, pp. 211-223.
- LI, N. *et. al.* (2011). "Oxalate production at different initial Pb²⁺ concentrations and the influence of oxalate during solid-state fermentation of straw with *Phanerochaete chrysosporium*". In: *Bioresource Technology*, 102, pp. 8137-8142.
- LI, Y.; GUAN, W. y NIU, C. (2013). "Joint Time-Frequency Analysis of Magnetic Storms during February 1999". In: D. Jin y S. Lin (Eds.), *Advances in Mechanical and Electronic Engineering* (Vol. 178, pp. 493-498): Springer Berlin Heidelberg.
- LIU GR, H. (2008). "Study on the degumming process of acidic oil". In: Z. X (Ed.), *International conference on biomass energy technologies*. Guangzhou.

- LIU, Y. *et. al.* (2014). "Cellulase production by solid-state fermentation with multi-strains". In: *Huaxue Gongcheng/Chemical Engineering (China)*, 42(5), pp. 6-9+34. doi: 10.3969/j.issn.1005-9954.2014.05.002
- LLOBERA, A. y CAÑELLAS, J. (2007). "Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem". In: *Food Chemistry*, 101(2), pp. 659-666. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.025>
- LONSANE, B. *et. al.* (1985). "Engineering aspects of solid-state fermentation". In: *Enzyme Microb. Technol.*, 7, pp. 258–265.
- LOPEZ-MONDEJAR R, B. (2010). "Utilisation of citrus compost-based growing media amended with *Trichoderma harzianum* T-78 in *Cucumis melo* L. seedling production". In: *Biores. Technol.*, 101 (10), pp. 3718-3723.
- M, K. B. (2004). "Principles of Biorefineries". In: *Appl Microbiol Biotechnol*, 64, pp. 137-145.
- M., B. (2005). "Current alternative engine fuels". In: *Energy Sources*, 27, pp. 569-577.
- MA F, H. M. (1999). "Biodiesel production: a review". In: *Bioresour Technol*, 70, pp. 1-15.
- MAHMOOD, R. *et. al.* (2013). "Production, Purification, and Characterization of Exoglucanase by *Aspergillus fumigatus*". In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(4), pp. 895-908. doi: 10.1007/s12010-013-0227-x
- MAKTOUF, S. *et. al.* (2013). "A laundry detergent compatible lichenase: Statistical optimization for production under solid state fermentation on crude millet". In: *Industrial Crops and Products*, 43(0), pp. 349-354. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.055>
- MALATHI, S., y CHAKRABORTY, R. (1991). "Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent". In: *Applied and Environmental Microbiology*, 57(3), pp. 712-716.
- MAMMA, D. y CHRISTAKOPOULOS, P. (2014). "Biotransformation of Citrus By-Products into Value Added Products". In: *Waste and Biomass Valorization*, 5(4), pp. 529-549. doi: 10.1007/s12649-013-9250-y

- MANNETJE, L. (2001). "Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos". In: Volume 161 of Estudio FAO *Producción y protección vegetal*. Food and Agriculture Organization.
- MAPARI, S. *et. al.* (2005). "Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants". In: *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2), pp. 231-238. doi: 10.1016/j.copbio.2005.03.004
- MARTINEZ-ÁVILA, G. *et. al.* (2014). "Fruit Wastes Fermentation for Phenolic Antioxidants Production and Their Application in Manufacture of Edible Coatings and Films". In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(3), pp. 303-311. doi: 10.1080/10408398.2011.584135
- MATA-ÁLVAREZ, J. *et. al.* (1992). "Anaerobic digestion of the Barcelona central food market organic wastes: Experimental study". In: *Bioresource Technology*, 39(1), pp. 39-48. doi: 10.1016/0960-8524(92)90054-2
- MATE, D. y ALCALDE, M. (2015). "Laccase engineering: From rational design to directed evolution". In: *Biotechnology Advances*, 33(1), pp. 25-40. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.007
- MATEO, J. y MAICAS, S. (2015). "Valorization of winery and oil mill wastes by microbial technologies". In: *Food Research International*, 73(0), pp. 13-25. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.007>
- MATEOS-APARICIO, I. *et. al.* (2008). "Soybean, a promising source of dietary fiber". In: *Nutrición Hospitalaria*, 23, pp. 305-312.
- MATSUMOTO T. (2001). "Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production". In: *Appl Microbiol Biotechnol*, 57, pp. 515-520.
- McINTOSH, S. y VANCOV, T. (2010). "Enhanced enzyme saccharification of *Sorghum bicolor* straw using dilute alkali pretreatment". In: *Bioresource Technology*, 101, pp. 6718-6727.
- MEDEIROS, A. *et. al.* (2000). "Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology". *Biochemical Engineering Journal*, 6(1), pp. 33-39.
- MEHER, L. (2006). "Technical aspects of biodiesel production by transesterification. A review". In: *Renewable and sustainable energy reviews*, 10, pp. 248-268.

- MENDOZA, F. y IZQUIERDO, A.G. (2007). *Tratamiento y gestión de residuos sólidos*. Universidad Politécnica de Valencia.
- MIGUEL, I. (16 de Mayo de 2008). "Biocarburante". Retrieved 19 de junio de 2013 from *Biocombustibles transgénicos*: www.biocarburante.com
- MINUSSI, R.; PASTORE, G. M. y DURÁN, N. (2002). "Potential applications of laccase in the food industry". *Trends in Food Science and Technology*, 13(6-7), pp. 205-216. doi: 10.1016/S0924-2244(02)00155-3
- MITCHELL, D.; BEROVIČ, M. y KRIEGER, N. (2006). *Introduction to solid-state fermentation bioreactors Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation* (pp. 33-44).
- MITTELBACH M. (1998). *Patent No. United States Patent 5849939*. Estados Unidos.
- MITTELBACH, M. (2004). *Biodiesel. The comprehensive Handbook*. Viena: Boersedruck Ges. m.b.H.
- MOHAN, N.; RAMASAMY, R. y MANONMANI, H. (2013). "Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid-state fermentation". In: *Ind. crops Prod.*, 43, pp. 150-158.
- MOHIBBE AZAM, M. (2005). "Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India". In: *Biomass and Bioenergy*, 29, pp. 293-302.
- MOLDES, A.; ALONSO, J. y PARAJÓ, J. (2001). "Strategies to improve the bioconversion of processed wood into lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation". In: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(3), pp. 279-284. doi: 10.1002/jctb.381
- MONDALA, A. (2015b). "Direct fungal fermentation of lignocellulosic biomass into itaconic, fumaric, and malic acids: current and future prospects". In: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. doi: 10.1007/s10295-014-1575-4
- MONDALA, A. et al. (2015). "Enhanced microbial oil production by activated sludge microorganisms from sugarcane bagasse hydrolyzate". In: *Renewable Energy*, 78(0), pp. 114-118. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2014.12.073>

- MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A. y TENDERDY, R. (1983). "Principles of solid substrate fermentation. The filamentous fungi". In: J. B. Smith, y J. B. Smith (Ed.), In: *Fungal Technology* (Vol. IV, pp. 117-143). London: Edward-Arnold.
- MORE, T. *et al.* (2012). "Bacterial polymer production using pre-treated sludge as raw material and its flocculation and dewatering potential". In: *Bioresource Technology*, 121, pp. 425-431. doi: 10.1016/j.biortech.2012.06.075
- MORENO, J. (2007). *Compostaje*. Madrid: Mundi-Prensa.
- MOSIER N, H. (2005). "Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover". In: *Bioresource Technology*, 96, pp. 1986-1993.
- MOSIER, N. *et al.* (2005). "Features of promising technologies for pre-treatment of lignocellulosic biomass". In: *Bioresource Technology*, 96, pp. 673-686.
- MOTTA, F. y SANTANA, M. (2014). "Solid-state fermentation for humic acids production by a *Trichoderma reesei* strain using an oil palm empty fruit bunch as the substrate". In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(4), pp. 2205-2217. doi: 10.1007/s12010-013-0668-2
- MOULY, P. *et al.* (1994). "Diferentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavanon glycosides". In: *Journal of agricultural and food chemistry*, 42, pp. 70-79.
- MOUSSA, T. y KHALIL, N. (2012). "Solid-state fermentation for the production of dextran from *Saccharomyces cerevisiae* and its cytotoxic effects". In: *Life Science Journal*, 9(4), pp. 2210-2218.
- MTUI, G. (2009). "Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products". In: *African Journal of Biotechnology*, 8(8), pp. 1398-1415.
- NAGEL, F. *et al.* (2001). "Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation". In: *Biotechnology and Bioengineering*, 72(2), pp. 219-230. doi: 10.1002/1097-0290(20000120)72:2<219::AID-BIT10>3.0.CO;2-T
- NAVARRO, P. *et al.* (2005) "Degradation of wine industry wastewaters by photocatalytic advanced oxidation". In: Vol. 51. *Water Science and Technology* (pp. 113-120).

- NAVEENA, B. *et. al.* (2005). "Direct fermentation of starch to L(+) lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate: Medium optimization using RSM". In: *Process Biochemistry*, 40(2), pp. 681-690. doi: 10.1016/j.procbio.2004.01.045
- NEVES MA, K. (2007). "State of the art and future trends of bioethanol production, dynamic biochemistry, process biotechnology and molecular biology". In: *Global Science Books*, pp. 1-13.
- NGOAN, L. *et. al.* (2000). "Ensiling Techniques for Shrimp By-Products and their Nutritive Value for Pigs". In: *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 13(9), pp. 1278-1284.
- NIBEDITA SARKAR, S. (2012). "Bioethanol production from agricultural wastes: An overview". In: *Renewable Energy*, 37, pp. 19-27.
- NIGAM, J. (2000). "Continuous production of ethanol from pineapple juice waste using immobilized yeast cells". In: *Journal of Biotechnology*, 80, pp. 189-193.
- NIGAM, P y SINGH, D. (1994). "Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology". In: *Journal of Basic Microbiology*, 34(6), pp. 405-423.
- NILADEVI, K. (2009). *Ligninolytic enzymes Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues* (pp. 397-414).
- NIMCEVIC, D. (2000). "Preparation of rapeseed oil esters of lower aliphatic alcohols". In: *JAOCS*, 77, pp. 275-280.
- NIMNOI, P y LUMYONG, S. (2011). "Improving Solid-State Fermentation of *Monascus purpureus* on Agricultural Products for Pigment Production". In: *Food and Bioprocess Technology*, 4(8), pp. 1384-1390. doi: 10.1007/s11947-009-0233-8
- NOUT, M. y MOTARJEMI, Y. (1997). "Assesment of fermentation as a household technology for improving food safety: A joint FAO/WHO workshop". In: *Food control*, 8 ((5-6)), pp. 221-226.
- NWOBI, A. *et. al.* (2014). "Simultaneous saccharification and fermentation of solid household waste following mild pretreatment using a mix of hydrolytic enzymes in combination with *Saccharomyces cerevisiae*". In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(2), pp. 929-938. doi: 10.1007/s00253-014-5977-z

- OFD. (1999). "Review of the research strategy for biomass- derived transportation fuels. In: *Committee to review the R and D strategy for biomass- derived ethanol and biodeisel transportation fuels*. National Academy. Washington D.C.: National Academy.
- OGASAWARA, N.; MIZUNO, R. y KAWAI, K. I. (1997). "Structures of a new type of yellow pigments, falconensones A and B, from *Emericetta falconensis*". In: *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 1*(17), pp. 2527-2530.
- OGAWA M. (2005). "Nitrous oxide emission from the burning of agricultural residue". In: *Atmospheric Environment*, 39 (19), pp. 3421-3429.
- OJUMU, T.; YU, J. y SOLOMON, B. (2004). "Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer". In: *African Journal of Biotechnology*, 3(1), pp. 18-24.
- OLIVEIRA, L. (2006). "Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes". In: *Biores. Technol.*, 97 (6), pp. 862-867.
- OLIVEIRA, D. *et al.* (2013). "Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids". In: *Journal of Biotechnology*, 164(3), pp. 423-432. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.09.014>
- ORIOL, E. *et al.* (1988). "Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*". In: *Appl. Microbiol. Biot.*, 27, pp. 498-503.
- ORZUA, M. *et al.* (2009). "Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation". In: *Industrial Crops and Products*, 30, pp. 24–27.
- OSORIO, F y TORRES, J. (2009). "Biogas purification from anaerobic digestion in a wastewater treatment plant for biofuel production". In: *Renawable Energy*, 34, pp. 2164-2171.
- PADRAIGÍN A. y RICHARD J. (2012). *Functional Foods and Nutraceuticals*, 46 (2), pp. 437-572.
- PAIVA ALEGRE, A. *et al.* (2009). "Production of thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using

- agroindustrial residues as carbon source". In: *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, pp. 612-622.
- PANDA, B.; JAVED, S. y ALI, M. (2009). "Statistical analysis and validation of process parameters influencing lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under solid-state fermentation". In: *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(1), pp. 123-127. doi: 10.1007/s12257-008-0016-5
 - PANDEY, A. (1990). "Improvements in solid-state fermentation for glucoamylase production". In: *Biological Wastes*, 34(1), pp. 11-19. doi: 10.1016/0269-7483(90)90140-N
 - PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P. y SOCCOL, C. (1999). "Solid state fermentation for the production of industrial enzymes". In: *Curr. Sci.*, 77, pp. 149-162.
 - PANDEY, A. (2000). "Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse". In: *Bioresource Technology*, 74, pp. 69-80.
 - PANDEY, A. et al. (2000). "Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: Cassava bagasse". In: *Bioresource Technology*, 74(1), pp. 81-87. doi: 10.1016/S0960-8524(99)00143-1
 - PANDEY, A. et al. (2001). *Solid state fermentation in Biotechnology-Fundamentals and Applications*. Asitech Publishers N. Delhi.
 - PANJAITAN, T. et al. (2015). "Spirulina (*Spirulina platensis*) algae supplementation increases microbial protein production and feed intake and decreases retention time of digesta in the rumen of cattle". In: *Animal Production Science*, 55(4), pp. 535-543. doi: 10.1071/AN13146
 - PARAMESWARAN, B. (2009). "Sugarcane Bagasse". In P. Singh Nee Nigam y A. Pandey (Eds.), In: *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (pp. 239-252): Springer Netherlands.
 - PAREKH, V. J. y PANDIT, A. B. (2012). "Solid state fermentation (SSF) for the production of sophorolipids from *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069 using glucose, wheat bran and oleic acid". In: *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 6(4), pp. 418-424.
 - PAZMINO-DURAN, E. et al. (2001). "Anthocyanins from Banana Bracts (*Musa paradisiaca*) as potential food colorant". In: *Food Chemistry*, 27, pp. 327-332.

- PEIJI G, Y. Q. (1997). "Screening microbial strain for improving the nutritional value of wheat and corn straws as animal feed". In: *Enzyme and Microbial Technology*, 20, pp. 581-584.
- PELIZER, Lúcia Helena; DE CARVALHO, João Carlos Monteiro y DE OLIVEIRA MORAES, Iracema. (2015). "Protein production by *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in solid state cultivation using sugarcane bagasse as support". In: *Biotechnology Reports*, 5(0), pp. 70-76. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2014.12.006>
- PHENGNUAM, Thanyarat y SUNTORNSUK, Worapot. (2013). "Detoxification and anti-nutrients reduction of *Jatropha curcas* seed cake by *Bacillus* fermentation". In: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(2), pp. 168-172. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.08.017>
- PHRUEKSAWAN, P. et. al. (2012). "Direct fermentation of L(+)-lactic acid from cassava pulp by solid state culture of *Rhizopus oryzae*". In: *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(8), pp. 1429-1436. doi: 10.1007/s00449-012-0731-3
- PINELO, Manuel, ARNOUS, Anis, y MEYER, Anne S. (2006). "Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release". In: *Trends in Food Science y Technology*, 17(11), pp. 579-590. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2006.05.003>
- PINKOWSKA, H., WOLAK, P, y ZLOCINSKA, A. (2011). "Hydrothermal decomposition of xylan as a model substance for plant biomass waste e Hydrothermolysis in subcritical water". In: *Biomass and bioenergy*, 35, pp. 3902-3912.
- PRICE, K. y RHODES, M. (1997). "Analysis of the major flavonol glycosides present in four varieties of onion (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from autolysis". In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, pp. 331-339.
- PURAVANKRA, D.; BOGHRA, V. y SHARMA, R. (2000). "Effect of antioxidant principles isolated from mango (*Mangifera indica* L.) seed kernels on oxidative stability of buffalo ghee (butter-fat)". In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, pp. 522-526.
- QIANG LI, J. X. (2013). "Ethanol as the acyl acceptor for biodiesel production". In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 25, pp. 742-748.

- RAHARDJO, Y.; TRAMPER, J. y RINZEMA, A. (2006). "Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives". In: *Biotechnol. Adv.*, 24, pp. 161-179.
- RAJAGOPALAN, G.; HE, J. y YANG, K. L. (2014). "Production, Purification, and Characterization of α -Amylase from Solventogenic *Clostridium* sp. BOH3". In: *Bioenergy Research*, 7(1), pp. 132-141. doi: 10.1007/s12155-013-9356-x
- RAJAGOPALAN, G. y KRISHNAN, C. (2008). " α -Amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate". In: *Bioresource Technology*, 99(8), pp. 3044-3050. doi: 10.1016/j.biortech.2007.06.001
- RAJOKA, M. *et al.* (2009). "Solid-state fermentation-supported enhanced production of α -galactosidase by a deoxyglucose-resistant mutant of *Aspergillus niger* and thermostabilization of the production process". In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(2), pp. 171-178. doi: 10.1007/s11274-008-9886-0
- RAMAKRISHNA, S. *et al.* (1982). "Recovery of amyloglucosidase from moldy bran". In: *Indian Journal of Technology*, 20(12), pp. 476-480.
- RASMUSSEN, J.; STEDRONSKY, E. y WHITESIDES G. (2007). *Introducción, modificación y caracterización de los grupos funcionales en la superficie de una película de polietileno de baja densidad.* (99) pp. 4736-45.
- RATANAKHANOKCHAI, K., *et al.* (30 de abril de 2013). *Intech*. Retrieved 06 de 10 de 2014 from Biomass Now - Cultivation and Utilization: www.intechopen.com
- RATHBUN, B. y SHULER, M. (1983). "Heat and mass transfer effects in static solid-substrate fermentations - design of fermentation chambers". In: *Biotechnology and Bioengineering*, 25(4), pp. 929-938.
- REDONDO-CUENCA, A.; VILLANUEVA-SUÁREZ, M. y MATEOS-APARICIO, I. (2008). "Soybean seeds and its by-products okara as sources of dietary fibre. Measurements by AOAC and Englyst method". In: *Food Chemistry*, 108, pp. 1099-1105.
- "Renewable energy: biofuels gaining momentum in the EU". (2006). In: *Focus on Catalysts*, 2006 (9), p. 2.

- RIVELA, I.; RODRÍGUEZ COUTO, S. y SANROMÁN, A. (2000). "Extra-cellular ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in a new solid-state bioreactor". In: *Biotechnology Letters*, 22(18), pp. 1443-1447. doi: 10.1023/A:1005607000999
- RIZZELLO, C. (2009). *International Journal of Food Microbiology*, 131, 189–196.
- RIZZELLO, C.. et al. (2011). *Food Chemistry*, 127, pp. 952–959.
- ROBINSON, J. (1991). *Polyketide Synthase Complexes: Their Structure and Function in Antibiotic Biosynthesis* (Vol. 332).
- ROBINSON, T.; SINGH, D., y NIGAM, P. (2001). "Solid state fermentation: A promising microbial technology for secondary metabolite production". In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, pp. 284-289.
- ROBINSON, T. y NIGAM, P. (2008). "Remediation of textile dye waste water using a white-rot fungus *Bjerkandera adusta* through solid-state fermentation (SSF)". In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151(2-3), pp. 618-628. doi: 10.1007/s12010-008-8272-6
- ROBINSON, T. y NIGAM, P. (2003). "Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation". In: *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), pp. 197-203. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00132-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00132-8)
- ROBL, D. et al. (2015). "Enhancing of sugar cane bagasse hydrolysis by *Anulohyphoxylon stygium* glycohydrolases". In: *Bioresource Technology*, 177(0), pp. 247-254. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.082>
- ROBLEDO, A. et al. (2008). "Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues". In: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, pp. 507–513.
- ROCKENBACH, I. et al. (2011). "Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking". In: *Food Research International*, 44(4), pp. 897-901. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.049>
- RODRÍGUEZ DE SOTILLO, D.; HADLEY, M. y WOLF-HALL, C. (1998). "Potato peel extract a nonmutagenic antioxidant with potential antimicrobial activity". In: *Journal of Food Science*, 63, pp. 907-910.

- RODRÍGUEZ, L. *et al.* (2014) "Detoxification of alperujo using solid-state fermentation: Statistic optimization of the process". In: Vol. 1057. *Acta Horticulturae* (pp. 655-660).
- RODRÍGUEZ-COUTO, R. *et al.* (2003). "Biodegradation of grape cluster stems and ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* during semi-solid state cultivation". In: *Acta Biotechnol*, 23, pp. 65-74.
- RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. *et al.* (2013). "Concentration by ultrafiltration and stabilization of phytase produced by solid-state fermentation". In: *Process Biochemistry*, 48(2), pp. 374-379. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.12.021>
- ROSES, R., y GUERRA, N. (2009). "Optimization of amylase production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation using sugarcane bagasse as solid support material, *World J. Microbiol. Biotechnol.*" 25 (2009) pp. 1929–1939. In: *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 1929-1939.
- PÉREZ ROSÉS, R. y GUERRA PÉREZ, N. (2009). "Optimization of amylase production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation using sugarcane bagasse as solid support material". In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11), pp. 1929-1939. doi: 10.1007/s11274-009-0091-6
- ROUSSOS, S. *et al.* (1992). "Efficient leaching of cellulases produced by *Trichoderma harzianum* in solid state fermentation". In: *Biotechnology Techniques*, 6(5), pp. 429-432. doi: 10.1007/BF02447483
- RT Sepa más. (14 de junio de 2013). RT. Retrieved 06 de febrero de 2014 from ONU: "La población mundial alcanzará los 9.600 millones en 40 años": <http://actualidad.rt.com/actualidad/view/97314-poblacion-mundial-crecimiento-onu>.
- RUBERTO, G. *et al.* (2008). "Volatile components of grape pomaces from different cultivars of Sicilian *Vitis vinifera* L". In: *Bioresource Technology*, 99(2), pp. 260-268. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.025>
- SAHA BC, C. (2006). "Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw". In: *Biotechnology Progress*, 22, pp. 449-453.
- SAITO, K.; HASA, Y. y ABE, H. (2012). "Production of lactic acid from xylose and wheat straw by *Rhizopus oryzae*". In: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(2), pp. 166-169. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.03.007

- SAKA S, K. (2001). *Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol*. *Fuel*, 80, pp. 225-231.
- SANTOS, D. *et al.* (2008). "Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xylitol production". In: *Journal of Food Engineering*, 86(4), pp. 542-548. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2007.11.004
- SCHIEBER, A.; KELLER, P. y CARLE, R. (2001). "Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance chromatography". In: *Journal of chromatography A*, 910, pp. 265-273.
- SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C. y CARLE, R. (2001). "By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments". In: *Trends in Food Science y Technology*, 12(11), pp. 401-413. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00012-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00012-2)
- SCHNEIDER, M. *et al.* (2014). "By-products from the biodiesel chain as a substrate to citric acid production by solid-state fermentation". In: *Waste Management and Research*, 32(7), pp. 653-660. doi: 10.1177/0734242X14539788
- SCHNEIDER, O. *et al.* (2006). "The potential of producing heterotrophic bacteria biomass on aquaculture waste". In: *Water Research*, 40(14), pp. 2684-2694. doi: 10.1016/j.watres.2006.05.008
- SEADI, T. Al y HOLM-NIELSEN, J. (2004). VI.1 "Utilization of waste from food and agriculture". In: H. E. A. A. F. K. Irena Twardowska y J. L. William (Eds.), *Waste Management Series* (Vol. Volume 4, pp. 735-756): Elsevier.
- SEESURIYACHAN, P. *et al.* (2012). "Optimization of Exopolysaccharide Overproduction by *Lactobacillus confusus* in Solid State Fermentation under High Salinity Stress". In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(5), pp. 912-917. doi: 10.1271/bbb.110905
- SERNA COCK, L. y TORRES LEÓN, C. (2014). "Agro industrial potential of peels of mango (*Mangifera indica*) Keitt and Tommy Atkins". In: *Acta Agronomica*, 64(2). doi: 10.15446/acag.v64n2.43579
- SHARATH, B.; MOHANKUMAR, B. y SOMASHEKAR, D. (2014). "Bio-detoxification of phorbol esters and other anti-nutrients of *Jatropha curcas* seed cake by fungal cultures using solid-state fermentation". In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5), pp. 2747-2757. doi: 10.1007/s12010-013-0698-9

- SHARMA, D.; TIWARI, M. y BEHERA, B. (1995). "Solid-state fermentation of new substrates for production of cellulase and other biopolymer-hydrolyzing enzymes". In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 51-52(1), pp. 495-500. doi: 10.1007/BF02933450
- SHARMA, S.; MANDHAN, R. y SHARMA, J. (2012). "Utilization of agro-industrial residues for pectinase production by the novel strain *Pseudozyma* sp. SPJ under solid state cultivation". In: *Annals of Microbiology*, 62(1), pp. 169-176. doi: 10.1007/s13213-011-0243-4
- SHARMA, S. y MAGUER, M. (1996). "Lycopene in tomatoes and tomato pulp fractions". In: *Italian Journal of Food Science*, 2, pp. 107-113.
- SHENG M, T. (2008). *Production of biodiesel fuel from wast edible oil*. China Academic.
- SHOJAOSADATI, S. y BABAEIPOUR, V. (2002). "Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor". In: *Process Biochemistry*, 37(8), pp. 909-914. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00294-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00294-1)
- SHOTWELL, O. *et al.* (1966). "Production of aflatoxin on rice". In: *Applied microbiology*, 14(3), pp. 425-428.
- SIESSERE, V. y SAID, S. (1989). "Pectic enzymes production in solid-state fermentation using citrus pulp pellets by *Talaromyces flavus*, *Tuberculariavulgaris* and *Penicillium charlessi*". In: *Biotechnology Letters*, 11(5), pp. 343-344. doi: 10.1007/BF01024515
- SILMAN, R. (1980). "Enzyme formation during solid-substrate fermentation in rotating vessels". In: *Biotechnology and Bioengineering*, 22(2), pp. 411-420.
- SILMAN, R. *et al.* (1979). "Production of aflatoxin in corn by a large-scale solid-substrate fermentation process". In: *Biotechnology and Bioengineering*, 21(10), pp. 1799-1808.
- SINGH NEE' NIGAM, P. (2009). "Production of Bioactive Secondary Metabolites". In: P. Singh Nee Nigam y A. Pandey (Eds.), *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (pp. 129-145): Springer Netherlands.
- SINGH P, S. (2008). "Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars". In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, pp. 667-673.

- SINGH, A. *et al.* (1989). "Production of protein and cellulase by *Aspergillus niger* in solid state culture". In: *Mircen Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 5(4), pp. 451-456. doi: 10.1007/BF01741820
- SINGHANIA, R. *et al.* (2010). "Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases". In: *Enzyme and Microbial Technology*, 46(7), pp. 541-549. doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.03.010
- SINGHANIA, R. *et al.* "Recent advances in solid-state fermentation". In: *Biochemical Engineering Journal*, 44, pp. 13-18.
- SINGHANIA, R. *et al.* (2013). "Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production". In: *Bioresource Technology*, 127(0), pp. 500-507. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.012>
- SLOTTNER, D. y BERTILSSON, J. (2006). "Effect of ensiling technology on protein degradation during ensilage". In: *Animal Feed Science and Technology*, 127(1-2), pp. 101-111. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2004.10.007
- SOARES, M. *et al.* (2000). "Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation". In: *Process Biochemistry*, 35(8), pp. 857-861. doi: 10.1016/S0032-9592(99)00144-2
- SOLIS-PEREYRA, S., *et al.* (1996). "Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations". In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(3), pp. 257-260.
- Soluciones prácticas. (2013). *Soluciones prácticas*. Retrieved 18 de junio de 2013 from Qué es el biodiésel: www.solucionespracticass.org.pe
- SOMEYA, S.; YOSHIKI, Y. y OKUBO, K. (2002). "Antioxidant compounds from bananas (*Musa cavendish*)". In: *Food Chemistry*, 79, pp. 351-354.
- SORIANO Jr NU, V. (2009). "Biodiesel synthesis via homogeneous Lewis acid-catalyzed transesterification". In: *Fuel*, 88, pp. 560-565.
- SOUQUET, J. *et al.* (2000). "Phenolic Composition of Grape Stems". In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), pp. 1076-1080. doi: 10.1021/jf991171u

- STORM, I. *et. al.* (2010). "Dynamics in the microbiology of maize silage during whole-season storage". In: *Journal of Applied Microbiology*, 109(3), pp. 1017-1026. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04729.x
- STUART, D., *et. al.* (1999). "Solid-state fermentation in rotating drum bioreactors: Operating variables affect performance through their effects on transport phenomena". In: *Biotechnology and Bioengineering*, 63(4), pp. 383-391. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990520)63:4<383::AID-BIT1>3.0.CO;2-N
- SUBAGIO, A.; MORITA, N. y SAWADA, S. (1996). "Carotenoids and their fatty-acid esters in banana peels". In: *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 42, pp. 553-566.
- SUDESH, K. y IWATA, T. (2008). "Sustainability of biobased and biodegradable plastics". In: *Clean - Soil, Air, Water*, 36(5-6), pp. 433-442. doi: 10.1002/clen.200700183
- SUGUMARAN, K.; JOTHI, P. y PONNUSAMI, V. (2014). "Bioconversion of industrial solid waste - Cassava bagasse for pullulan production in solid state fermentation". In: *Carbohydrate Polymers*, 99, pp. 22-30. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.08.039
- SUDHIR, K; ROCKTOTPAL, K; y ASHIS, K. (2009). "Purification, characterization and biotechnological application of an alkaline-keratinase produced by *Bacillus subtilis* RM-01 in solid-state fermentation using chicken-feather as substrate". In: *Biochem. Eng. J.*, 45 (3), pp. 218-225.
- SUH, M., *et. al.* (2012). "Hydrogen Storage in Metal–Organic Frameworks". In: *Chemical Reviews*, 112 (2), pp. 782-835.
- SUN Y, C. J. (2002). "Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review". In: *Bioresource Technology*, 96, pp. 673-686.
- ————. (2003). "Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review". In: *Bioresource Technology*, 96, pp. 673-686.
- SUN, Y. y CHENG, J. (2002). "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review". In: *Bioresource Technol.*, 83, pp. 1-11.
- SUN, Z., *et. al.* (2014). "Mixed Food Waste as Renewable Feedstock in Succinic Acid Fermentation". In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(5), pp. 1822-1833. doi: 10.1007/s12010-014-1169-7

- SURESH, P. V.; SACHINDRA, N. y BHASKAR, N. (2011). "Solid state fermentation production of chitin deacetylase by *Colletotrichum lindemuthianum* ATCC 56676 using different substrates". In: *Journal of Food Science and Technology*, 48(3), pp. 349-356. doi: 10.1007/s13197-011-0252-0
- TAHERZADEH, M. y KARIMI, K. (2007). "Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review". In: *BioResources*, 2, pp. 472-499.
- ————. (2008). "Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review". In: *International Journal of molecular sciences*, 9, pp. 1621-1651.
- TALEBNIA F, K. (2010). "Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation". In: *Bioresource technology*, 101 (13), pp. 4744-4753.
- TAN, H.; LEE, K. y MOHAMED, A. (2010). "Pretreatment of lignocellulosic palm biomass using a solvent-ionic liquid [BMIM]Cl for glucose recovery: An optimization study using response surface methodology". In: *Carbohydrate Polymer*, 83, pp. 1862-1863.
- TASAR, O.; ERDAL, S. y ALGUR, O. (2014). "Utilization of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) for inulinase production". In: *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(6), pp. 596-604.
- TENG, S. y FELDHEIM, W. (2001). "Anka and anka pigment production". In: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(5), pp. 280-282. doi: 10.1038/sj.jim.7000126
- Textoscientíficos.com. (07 de febrero de 2005). Textoscientíficos.com. From Moldeado, inyección, extrusión: <http://www.textoscientificos.com/polimeros/moldeado>
- THANAPIMMENTHA A, L. (2012). *Value added waste of *Jatropha curcas* residue: Optimization of protease production in solid state fermentation by Taguchi DOE methodology*. *Ind. Crops Prods.*, 37 (1), pp. 1-5.
- thehealthyeatingsite.com. (n.d.). The healthy eating site. Retrieved 19 de enero de 2015 from <http://thehealthyeatingsite.com/kefir-recipes-making-kefir-yogurt/>

- THOMAS, L., *et. al.* (2013). "Production, purification, characterization and over-expression of xylanases from actinomycetes". In: *Indian Journal of Experimental Biology*, 51(11), pp. 875-884.
- THRING, R.; CHORNET, E. y OVEREND, R. (1990). "Recovery of a solvolytic lignin: effects of spent liquor/acid volume ration, acid concentration and temperatur". In: *Biomass*, 23, pp. 289-305.
- TIMBERLAKE, C. y HENRY, B. (1986). "Plant pigments as natural food colours". In: *Endeavour*, 10(1), pp. 31-36. doi: 10.1016/0160-9327(86)90048-7
- TOMME, P.; WARREN, R. y GILKES, N. (1995). "Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi". In: *Advances in Microbial Physiology*, 37, pp. 1-81.
- TORRES, J. y BOBET, R. (2001). "New flavonol derivatives from grape (*Vitis vinifera*) by-products. Antioxidant aminoethyl-flavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of flavanols". In: *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, pp. 4627-4634.
- TORTOSA, J.; RUBIO, M. y DEMETRIO, G. (1995). "Autodrólisis de tallo de maíz en suspensión acuosa". In: *Afinidad*, 52, pp. 181-188.
- TRIPATHI, P. y DUBEY, N.K. *Postharvest Biology and Technology* 2004, 32, pp. 235-245.
- TSUKAMOTO, J.; DURÁN, N. y TASIC, L. (2013). "Nanocellulose and bioethanol production from orange waste using isolated microorganisms". In: *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(9), pp. 1537-1543. doi: 10.5935/0103-5053.20130195
- TURKAY S, C. (1991). "Deacidification of sulfur olive oil. I. Single-stage liquid-liquid extraction of miscella with ethyl alcohol". In: *J Am Oil Chem Soc*, 68, pp. 83-86.
- UGWUANYI, J.; McNEIL, B. y HARVEY, L. (2009). *Production of protein-enriched feed using agro-industrial residues as substrates Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues* (pp. 77-103).
- ULBRICHT RJ, S. (1984). "A review of 5-hydroxymethylfurfura HMF in parental solutions". In: *Fundam Appl Toxicol*, 4, pp. 843-853.
- ValenciaFruits.com. (27 de Septiembre de 2012). AGRONoticias América Latina y el Caribe. Retrieved 20 de Abril de 2014 from La producción mundial

- de fruta tropical alcanzará 82 millones de toneladas en 2014: <http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/es/c/159358/>
- VALENZUELA B, A.; SANHUEZA C, J. y DE LA BARRA D, F. (2012). "El aceite de pescado: ayer un desecho industrial, hoy un producto de alto valor nutricional". In: *Revista chilena de nutrición*, 39, pp. 201-209.
 - VAN GERPEN J, S. (2004). *Biodiesel production technology*. 1617 Coulen boulevard, Golden: National Renewable Energy Laboratory.
 - VAN GERPEN JH, D. (2002). *The effect of phosphorus level on the total glycerol and reaction yield of biodiesel bioenergy*. The 10th Biennial Bioenergy Conference. Boise: The 10th Biennial Bioenergy Conference.
 - VANDAMME, E. (2009). "Agro-Industrial Residue Utilization for Industrial Biotechnology Products". In: P. Singh Nee Nigam y A. Pandey (Eds.), *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (pp. 3-11): Springer Netherlands.
 - VANDENBERGHE, L., et. al. (2000). *Bioresource Technol.*, 74, p. 175.
 - VARDANEGA, R.; PRADO, J. y MEIRELESS, M. (2014). "Adding value to agri-food residues by means of supercritical technology". In: *The Journal of Supercritical fluids*, pp. 1-25.
 - VEERABHADRAPPA, M.; SHIVAKUMAR, S. y DEVAPPA, S. (2014). "Solid-state fermentation of Jatropha seed cake for optimization of lipase, protease and detoxification of anti-nutrients in Jatropha seed cake using *Aspergillus versicolor* CJS-98". In: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(2), pp. 208-214. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.07.003
 - VENDRUSCOLO, F, et. al. (2008). "Apple Pomace: A Versatile Substrate for Biotechnological Applications". In: *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(1), pp. 1-12. doi: doi:10.1080/07388550801913840
 - VENUGOPAL, V, y SHAHIDI, F. (1995). "Value-added products from underutilized fish species". In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(5), pp. 431-453.
 - VICUÑA, R. (1988). "Bacterial degradation of lignin". In: *Enzyme and Microbial Technology*, 10(11), pp. 646-655. doi: 10.1016/0141-0229(88)90055-5
 - VIDYALAKSHMI, R.; SINGARAVADIVEL, K. y MURUGESH, S. (2010). "Optimization of fermentation conditions and effect of nutritional supple-

- mentation in production of food grade pigments by *monascus ruber*". In: *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 4(2), pp. 779-784.
- VIERA, M. *et. al.* (2005). "Suitability of three red macroalgae as a feed for the abalone *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve". In: *Aquaculture*, 248(1-4), pp. 75-82. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.03.002
 - VIJAYARAGHAVAN, P, y VINCENT, S. (2012). "Cow dung as a novel, inexpensive substrate for the production of a halo-tolerant alkaline protease by *Halomonas* sp. PV1 for eco-friendly applications". In: *Biochememical Engineering Journal*, 69, pp. 57-60.
 - VISHWANATHA, K.; RAO, A. y SINGH, S. (2010). "Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters". In: *Journal of Industrial Microbiology y Biotechnology*, 37(2), pp. 129-138. doi: 10.1007/s10295-009-0654-4
 - VISSER, E., *et. al.* (2015). "Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse from enzyme recycling". In: *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 5.
 - VLASENKO EY, D. (1997). "Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw". In: *Bioresource Technology*, 59, pp. 109-119.
 - WAGHMARE, P, *et. al.* (2014). "Enzymatic hydrolysis and characterization of waste lignocellulosic biomass produced after dye bioremediation under solid state fermentation". In: *Bioresource Technology*, 168, pp. 136-141. doi: 10.1016/j.biortech.2014.02.099
 - WAN, C.; ZHOU, Y., y LI, Y. (2011). "Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility". In: *Bioresource Technology*, 102, pp. 6254-6259.
 - WANG, L. y YANG, S. (2007). "Chapter 18. Solid State Fermentation and Its Applications". In: S.-T. Yang, *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* (pp. 465-489). Columbus, Ohio, USA: Elsevier.
 - WATI L, K. (2007). "Paddy straw as substrate for ethanol production". In: *Indian Journal of Microbiology*, 47, pp. 26-29.
 - Wikipedia. (8 de agosto de 2013). Lignina. Retrieved 11 de Agosto de 2013 from http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lignin_structure.svg

- WILKINS, M. *et al.* (2007). "Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes". In: *Bioresource Technology*, 98(8), pp. 1596-1601. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.06.022>
- WROLSTAD, R. y LING, W. (2001). Patent No. 6224926. United States.
- XIA, E., *et al.* (2010). "Biological Activities of Polyphenols from Grapes". In: *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), p. 622.
- XU, X., *et al.* (2014). "Enzymatic saccharification of cassava residues and glucose inhibitory kinetics on β -glucosidase from *Hypocrea orientalis*". In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(47), pp. 11512-11518. doi: 10.1021/jf5039663
- YEPES, S.; MONTOYA NARANJO, L. y SÁNCHEZ OROZCO, F. (2008). "Valorización de residuos agroindustriales - Frutas- en Medellín y el sur del Valle del Aburrá, Colombia". In: *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*, 61 (1), pp. 4422-4431.
- YIN, D., *et al.* (2011). "Improved pretreatment of lignocellulosic biomass using enzymatically-generated peracetic acid". In: *Bioresource Technology*, 102, pp. 5183-5192.
- YIN, J., *et al.* (2013). "Optimization of production conditions for β -mannanase using apple pomace as raw material in solid-state fermentation". In: *Annals of Microbiology*, 63(1), pp. 101-108. doi: 10.1007/s13213-012-0449-0
- YU, J. y STAHL, H. (2008). "Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates". In: *Bioresource Technology*, 99(17), pp. 8042-8048. doi: 10.1016/j.biortech.2008.03.071
- ZADRAZIL, F. y PUNIYA, A. (1995). "Studies on the effect of particle size on solid-state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi". In: *Bioresource Technology*, 54(1), pp. 85-87. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00119-0](http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524(95)00119-0)
- ZENG, W., *et al.* (2013). "Non-sterilized fermentative co-production of poly(γ -glutamic acid) and fibrinolytic enzyme by a thermophilic *Bacillus subtilis* GXA-28". In: *Bioresource Technology*, 142(0), pp. 697-700. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.020>
- ZHANG, Y. (2008). "Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries". In: *J Ind Microbiol Bioethanol*, 35, pp. 367-375.

- ZHANG Y, L. (2008). "Study on the coupling process of catalytic esterification and extraction of high acid value waste oil with methanol". In: Z. X (Ed.), *International conference on biomass energy technologies*. Guangzhou: *International conference on biomass energy technologies*.
- ZHANG, W. et. al. (2013). "Solid-state Fermentation of Kitchen Waste for Production of *Bacillus thuringiensis*-based Bio-pesticide". In: *BioResources*, 8(1), pp. 1124-1135.
- ZHAO X, C. (2009). "Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis". In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, pp. 815-827.
- ZHAO, Y. et. al. (2015). "The antibiotic activity and mechanisms of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) bagasse extract against food-borne pathogens". In: *Food Chemistry*, 185(0), pp. 112-118. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.120>
- ZHOU, H. et. al. (2014). "Solid-state fermentation of *Ginkgo biloba* L. residue for optimal production of cellulase, protease and the simultaneous detoxification of *Ginkgo biloba* L. residue using *Candida tropicalis* and *Aspergillus oryzae*". In: *European Food Research and Technology*. doi: 10.1007/s00217-014-2337-2
- ZHU, Z. et. al. (2013). "Enhancement of lipopeptides production in a two-temperature-stage process under SSF conditions and its bioprocess in the fermenter". In: *Bioresource Technology*, 127(0), pp. 209-215. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.119>
- ————. (2013). "The usage of rice straw as a major substrate for the production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid-state fermentation". In: *Journal of Environmental Management*, 127(0), pp. 96-102. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.04.017>

En este libro se pretende introducir al lector en algunas aplicaciones biotecnológicas para el aprovechamiento de residuos agroindustriales, como son las fermentaciones en estado sólido, los ensilajes y la generación de proteína unicelular, entre otras. Igualmente, es su objetivo presentar algunas investigaciones que sobre este importante asunto se han llevado a cabo con el fin de familiarizar al interesado en estos ámbitos y darle a conocer el amplio panorama que este tipo de procesamiento presenta.

El libro está organizado en cuatro capítulos. El primero es una introducción a la aplicación de procesos biotecnológicos para la valorización de los subproductos agroindustriales y alimentarios. En el segundo se hace un análisis del pretratamiento que se debe llevar a cabo para acondicionar los subproductos, principalmente de tipo lignocelulósico, por métodos fermentativos con ayuda de microorganismos, y se estudia la composición química de estos subproductos. El tercer capítulo describe los procesos de aprovechamiento conocidos y popularizados en todo el mundo en granjas y fincas, como el ensilaje y la producción de proteína unicelular. Finalmente, el capítulo cuatro da cuenta del proceso de fermentación en sustratos sólidos, sus principales condiciones, los microorganismos, los productos generados y los reactores, así como de los procedimientos descritos por múltiples autores, especialmente aquellos considerados clave para el entendimiento de estos procesos, los que a su vez podrían ser aplicados en otros procesos de aprovechamiento de residuos agroindustriales.



**UNIVERSIDAD DE
SAN BUENAVENTURA
CALI**

Av. 10 de Mayo, La Umbría,
carretera a Pance
PBX: 4882222
www.usbecali.edu.co

ISBN 978-958-8785-81-3



9 789588 785813 >

EB
EDITORIAL
BONAVENTURIANA



[editorialbonaventuriana](https://www.facebook.com/editorialbonaventuriana)



[@EdiBonaventuri](https://twitter.com/EdiBonaventuri)



[EditorialBonaventuriana](https://www.youtube.com/channel/UC...)



[editorial-bonaventuriana](https://www.linkedin.com/company/editorial-bonaventuriana)

www.editorialbonaventuriana.usb.edu.co