

Producción de azúcares fermentables a partir de fibra prensada de palma de aceite pretratada biológicamente por *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium*

Production of fermentable sugars from press fiber oil palm pre-treated biologically by *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium*

Lilia Carolina Rojas Pérez^{1*}; Yineth Piñeros-Castro²; Mario Enrique Velásquez Lozano¹

¹Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

²Facultad de Ciencias e Ingeniería. Programas Ingeniería de Alimentos e Ingeniería Química. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.

*lcrojasp@unal.edu.co

Fecha Recepción: 30 de marzo de 2011

Fecha Aceptación: 7 de octubre de 2011

Resumen

La industria de palma de aceite en Colombia, primera en producción en Latino América y cuarta a nivel mundial, genera cerca de 11,6 a 15,1% p de fibra prensada respecto a la carga inicial de los frutos procesados, este residuo presenta una estructura compleja compuesta de lignina, hemicelulosa y celulosa; haciéndolo susceptible de ser procesado para la obtención de diversos productos biotecnológicos de alto valor agregado. En este trabajo se evaluó la obtención de azúcares fermentables a partir de la fibra prensada de palma, realizando un pre-tratamiento biológico con los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* en fermentación en estado sólido y medio de cultivo Kirk, realizando seguimiento en el tiempo durante cuatro semanas. Posteriormente se realizaron las hidrólisis enzimáticas del material pre-tratado evaluando dos enzimas comerciales (celulasa+ β -glucosidasa) en combinación por un tiempo de 72 h. Tanto la materia prima como los sólidos pre-tratados se caracterizaron en cuanto a su contenido de lignina y azúcares estructurales. Después de la hidrólisis enzimática se encontró un porcentaje de sacarificación de 18,4 g de glucosa en la HE/100 g de glucosa potencial en la fibra pre-tratada. Se encontró además, que el parámetro más relevante: el rendimiento global de azúcares fermentables fue de 7,4 g/100 g de materia prima. Los resultados hallados ratifican el potencial de este residuo para la producción de azúcares aplicando el pre-tratamiento biológico con *P. ostreatus*, el cual presenta ventajas ambientales y económicas.

Palabras clave: fibra prensada de palma, pre-tratamiento biológico, fermentación en estado sólido, hidrólisis enzimática, azúcares fermentables.

Abstract

The oil palm industry in Colombia, first in production Latin America and fourth worldwide, generates about 11.6 to 15.1% w pressed fiber on the initial load of processed fruits, this residue has a complex structure of lignin, hemicellulose and cellulose, making it liable to be prosecuted for obtain various biotech products with high added value. In this work, we assessed the trials for obtaining sugars fermented from palm pressed fiber, making a pre-biological treatment with fungi *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* in solid state fermentation medium Kirk during four weeks. In the next step on this study, we make the enzymatic hydrolysis of the material pretreated evaluating two commercial enzymes (cellulase+ β -glucosidase) in combination for a period of 72 h. Both the raw material pre-treated solids were characterized as to its content structural lignin and sugars. When the enzymatic hydrolysis was finish, the rate of saccharification measured was 18.4 g of glucose HE/100 g potential glucose in pre-treated fiber. The most relevant parameter is the overall yield of fermentable sugars that was calculated as 7.4 g/100 g of raw material. The results obtained confirm the potential of this waste to produce sugars applying the pre-biological treatment with *P. ostreatus*, which environmental and economic advantages.

Keywords: palm press fiber, biological treatment, state solid fermentation, enzymatic hydrolysis, fermentable sugars.

Introducción

Actualmente, la producción de azúcares fermentables enfrenta una crisis socio-energética ya que estos se derivan exclusivamente del sector alimenticio, una alternativa atractiva es la producción a partir de materiales lignocelulósicos, residuos que no compiten directamente con los alimentos destinados al consumo humano y animal y, además, permite aprovechar grandes cantidades de biomasa que generan los procesos agroindustriales. La industria de palma de aceite en Colombia, primera en producción en Latino América y cuarta a nivel mundial, genera cerca de 11,6 a 15,1% p de fibra prensada de palma respecto a la carga inicial de los frutos procesados [1]. Los materiales lignocelulósicos presentan estructuras complejas compuestas de lignina, hemicelulosa y celulosa, siendo matrices resistentes al ataque microbiano, razón por la cual la obtención de azúcares fermentables a partir de estas materias primas comprende las etapas de pre-tratamiento e hidrólisis.

En el pre-tratamiento sea físico, químico, térmico o biológico, se busca aumentar el área superficial, reducir la cristalinidad de la celulosa y disociar el complejo celulosa-lignina. Esta operación favorece la exposición del sustrato a la segunda etapa del proceso, la hidrólisis, la cual puede ser ácida o enzimática. Dentro de los pre-tratamientos que incrementan la digestibilidad de la biomasa lignocelulósica se encuentran los siguientes: mecánicos, hidro-térmicos (explosión con vapor y agua caliente), ácidos, alcalinos, de oxidación y combinaciones de estos [2]. Además, existe el pre-tratamiento biológico que emplea hongos o bacterias deslignificadoras tales como el *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoleris*, *Ceriporiopsis subvermispota*, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Pleurotus ostreatus* a través, de la acción de enzimas ligninasas y peroxidases [3]. Estos tratamientos tienen como ventajas el bajo consumo de energía, bajo costo de capital, condiciones ambientales favorables y reducción en la concentración de inhibidores de fermentación [4]. Este tratamiento de deslignificación biológica se ha estudiado sobre residuos de palma utilizando *Pleurotus ostreatus*, logrando valores del 43,1% [5], tallos de algodón utilizando *Phanerochaete chrysosporium* obteniendo porcentajes de degradación de la lignina de 19,4% y 35,5%, mediante cultivo sumergido y en cultivo en estado sólido respectivamente [6]. Dorado [7]

estudió el pre-tratamiento de paja de trigo con 19 hongos causantes de la podredumbre blanca y encontró que el 35% del trigo fue convertido en azúcares reductores por *Pleurotus ostreatus* en 5 semanas. Una conversión similar fue obtenida en el pre-tratamiento por *Phanerochaete sordida* 37 y *Pycnoorus cinnabarinus* 115 en 4 semanas [8]. El propósito del presente estudio fue investigar la hidrólisis enzimática de la fibra prensada de palma pre-tratada biológicamente con los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* en medio de cultivo Kirk y fermentación en estado sólido. Esta investigación puede proporcionar información importante sobre el uso comercial de la fibra prensada de palma para la producción de productos de alto valor agregado a partir de azúcares fermentables.

Metodología

Materia prima

La fibra prensada de palma (8,6% p de humedad) fue obtenida de una planta extractora de aceite de palma del municipio de Cumaral, Meta; el material se lavó, secó y homogenizó, previo a su uso. Se caracterizó en cuanto a su contenido de extraíbles, celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas de acuerdo a la metodología de la NERL [9]. El contenido elemental se realizó de acuerdo a la norma ASTM:5373-07(07) en el Laboratorio de Carbones de Ingeominas Bogotá-Colombia.

Pre-tratamiento biológico

En el pre-tratamiento biológico se emplearon dos hongos: *Phanerochaete chrysosporium* cepa ATCC 24725 y *Pleurotus ostreatus*, el primero de ellos inoculado como suspensión de esporas ($1,42 \times 10^8$ esporas/mL) luego de cultivar el hongo en agar PDA por seis días a 30° C y el segundo utilizando un inóculo del hongo crecido sobre semillas de trigo durante 20 días, el que se colocó al 5% p. La fermentación en estado sólido se inició con la adecuación del material a una humedad del 70% p con el medio de cultivo Kirk (2 g/L KH_2PO_4 , 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,06 g/L NaCl, 0,006 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,06 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,06 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,012 g/L CuSO_4 , 0,012 g/L $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,012 g/L H_3BO_3 , 0,012 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,012 g/L Extracto de levadura, 0,2 g/L tartrato de diamonio y 1 mg/L de tiamina). Las unidades experimentales fueron de 20 g en bolsas de polietileno, las cuales se esterilizaron, inocularon e incubaron a 30°C durante cuatro semanas.

Se tomaron tres muestras semanales de forma aleatoria, se determinó el peso, composición y se les realizó hidrólisis enzimática.

Hidrólisis enzimática (HE)

Los sólidos pre-tratados fueron sometidos a hidrólisis enzimática, 5% (p/v) de sustrato (en base seca), tampón citrato de sodio 0,1 M pH de $4,8 \pm 0,2$, 72 h, 150 rpm y 50°C . Se utilizaron las enzimas de Novozymes, Celluclast 1,5L 65 FPU/mL y NS50010 590 UI/mL con una carga de 15 U/g.

Métodos analíticos

Para la determinación de lignina y carbohidratos estructurales tanto de material sin tratar como pre-tratado se utilizó la metodología reportada NREL/TP-510-42618 [9]. Los azúcares reductores se determinaron mediante el método DNS [10]. Para determinar los azúcares estructurales se utilizó cromatografía líquida de alta eficiencia "HPLC" con un detector de índice de refracción, una columna Aminex HPX-87H marca Biorad, temperatura de la columna 65°C , fase móvil: solución de ácido sulfúrico 0,0005 M a un flujo de 0,6 mL/min. El contenido de humedad se realizó mediante balanza de humedad Mettler Toledo HB43-S Halogen Classic Plus a 105°C .

Resultados y discusión

La Tabla 1 muestra la composición de la materia prima. Los carbohidratos representan el 56,6% del peso seco, lo que hace de esta biomasa un sustrato adecuado para la producción de azúcares fermentables. La fibra de palma utilizada presentó un alto contenido de lignina del 30,1% p, valor semejante al reportado para la fibra en Malasia [11] pero diferente significativamente del reportado en Tailandia [12]. Diferencia que seguramente se debe a la alta heterogeneidad de la fibra colombiana, que no consta solamente de los residuos fibrosos de la palma de aceite, sino también de los cuescos y raquis. Cabe destacar que la fibra prensada de palma colombiana presenta el doble de contenido de nitrógeno en comparación con el residuo analizado en Malasia [13], lo que hace de esta material un residuo interesante por sus propiedades para ser utilizado como fertilizante e inclusive como suplemente en el mismo pre-tratamiento biológico, reduciendo la necesidad de una fuente externa de este elemento.

Como se observa en la Figura 1 el mayor grado de deslignificación fue llevado a cabo por el

hongo *P. ostreatus* en medio de cultivo Kirk al alcanzar 33,4% a la cuarta semana, a diferencia de *P. chrysosporium* que alcanzó 30,2% en el mismo tiempo. La mayor deslignificación se alcanza después de transcurrida la primera semana de tratamiento.

En este estudio la degradación de la lignina se realizó sin aireación. Rodríguez-Vázquez [14] reportaron condiciones similares cuando realizaron la fermentación en estado sólido con tasas de aireación bajas con *P. chrysosporium*.

La máxima biodegradación de la lignina 30% es similar a los resultados obtenidos por otros autores por ejemplo en cultivos sobre paja de arroz por *P. chrysosporium* se obtuvo un grado de deslignificación de 35% [15].

Tabla 1. Composición de la fibra prensada de palma, en materia seca (%).

Composición	Colombia	Malasia [11,13]	Tailandia [12]
Extraíbles	8,1 \pm 0,5	6,9	-
Lignina	30,1 \pm 0,6	27,7	17,28 \pm 0,18
Celulosa	30,6 \pm 1,8	33,9	32,06 \pm 0,64
Hemicelulosa	26,0 \pm 2,9	26,1	25,83 \pm 1,12
Cenizas	3,1 \pm 0,1	3,5	8,30 \pm 0,02
Otros	1,2	1,9	-
Carbono	47,6	47,2	-
Nitrógeno	0,7	1,4	-
Hidrogeno	6,2	6	-

Cuando se pretrató paja de trigo (con un contenido de 24% p de lignina) a los 7, 14 y 21 días en fermentación en estado sólido, con el *P. chrysosporium* no hubo pérdida de lignina a través del tiempo, mientras que el *P. ostreatus* a los 21 días presentó una pérdida del 21% con respecto a la lignina inicial [16]. Taniguchi et al., evaluaron el efecto del pre-tratamiento biológico sobre paja de arroz; encontrando que de los cuatro hongos que probó (*P. chrysosporium*, *T. versicolor*, *C. subvermispota* y *P. ostreatus*), *P. ostreatus* logro después de 60 días de tratamiento una degradación de 41% de la lignina Klason de la materia prima [17]. Además, de la deslignificación, otro criterio importante para evaluar el desempeño del pretratamiento biológico es la disponibilidad de los carbohidratos,

ya que un alto contenido de celulosa en los sustratos a fermentar eventualmente proporciona una accesibilidad alta a los carbohidratos y a la sacarificación ácida o enzimática [6]. En la Tabla 2, se observa como el porcentaje de celulosa va aumentando en función del tiempo en la fibra pre-tratada con el *P. ostreatus*, mientras que el contenido de celulosa en el material pre-tratado por el *P. chrysosporium* permanece casi constante, lo que se relaciona con el mayor rendimiento alcanzado en el material previamente tratado con *P. ostreatus* vs. *P. chrysosporium* (Figura 3). Finalmente, el resultado evidencia para que el porcentaje de hemicelulosa no es afectado durante el tiempo de pre-tratamiento.

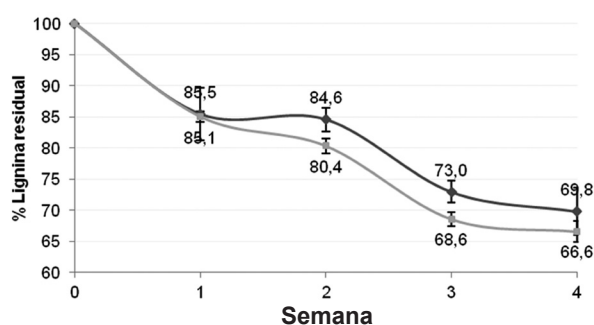


Figura 1. Porcentaje de lignina residual a través del tiempo ■ *P. ostreatus* ◆ *P. chrysosporium*.

Tabla 2. Recuperación gravimétrica (% p) y composición de la fibra prensada de palma (lignina, celulosa y hemicelulosa % p) después del pre-tratamiento biológico en función del tiempo.

Semana	%Celulosa		% Hemicelulosa	
	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. ostreatus</i>
1	28,2	28,2	22,7	22,3
2	29,0	29,1	23,0	21,4
3	27,9	31,5	22,3	22,0
4	28,8	33,3	22,8	21,7

En cuanto al porcentaje de sacarificación o rendimiento de hidrólisis enzimática en la Figura 2 se observa que el mayor valor alcanzado fue de 18,4 g de glucosa en la HE/g de glucosa potencial en la fibra pre-tratada con *P. ostreatus*, mientras que la biomasa no pre-tratada (tomada como control), tuvo un rendimiento de hidrólisis enzimática de 5,6 g de glucosa/g de glucosa potencial en la fibra prensada. Cabe resaltar que el pre-tratamiento biológico con *P. ostreatus* superó este valor desde la primera semana de tratamiento,

lo cual demuestra que este hongo actúa de forma positiva, destruyendo la estructura del material, lo que favorece la hidrólisis enzimática posterior. Este resultado es prometedor ya que en comparación con pre-tratamientos físicos, por ejemplo cuando se emplea ácido diluido sobre otros materiales lignocelulósicos como cardo *Cynara cardunculus* genera un rendimiento de HE de 28,5% a 160° C, sin adición de ácido y un máximo de 80,2% a 200° C en presencia de 0,2% de ácido sulfúrico [18].

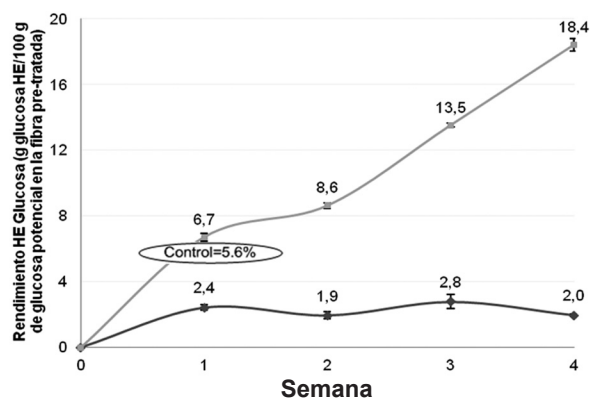


Figura 2. Rendimiento de glucosa en la hidrólisis enzimática (HE) a través del tiempo ■ *P. ostreatus* ◆ *P. chrysosporium*.

Los resultados con el hongo *P. chrysosporium* no arrojan rendimientos promisorios, pues los valores obtenidos de HE están por debajo del control; esto se puede deber a que el hongo *P. chrysosporium* degradada no solamente la lignina sino también la celulosa [19]. Por ejemplo, en el estudio obtenido por Salvachúa *et al.*, se evaluaron 21 basidiomicetos sobre paja de trigo y se encontró el mismo comportamiento de la conversión de los azúcares fermentables respecto al material de control a los 21 días de pre-tratamiento, únicamente ocho de las cepas estudiadas incrementaron la digestibilidad respecto al control entre los 14 y 21 días de tratamiento y sólo una de ellas, *P. tigrinus*, fue capaz de mejorar el rendimiento después de los 7 días [16]. Existen varios estudios que sustentan que aunque *P. chrysosporium* es el hongo de la podredumbre blanca más estudiado por lograr grados de degradación de la lignina significativos, también causa una pérdida importante de la fracción de carbohidratos [17,20], lo que puede estar relacionado con rendimiento bajos en la generación de azúcares fermentables. Otros investigadores han reportado mejor desempeño del hongo *P. ostreatus* comparado con *P. chrysosporium*, en pre

tratamientos biológicos previos a la obtención de azúcares fermentables, aunque se han encontrado mejores resultados para *I. lacteus* (62%) y *P. subvermispota* (61%) sobre paja de trigo como sustrato, con tiempo de incubación de 21 días [16]. En la Figura 3, se encuentran los valores del rendimiento global de azúcares a partir de la materia prima original; estos valores permiten evaluar el tratamiento aplicado y el potencial para la producción de azúcares fermentables; se observa que el mayor rendimiento correspondió al material pre-tratado con *P. ostreatus* en medio de cultivo Kirk con 7,4 g glucosa/100 g de materia prima, valor superior a los obtenidos en los pre-tratados con *P. chrysosporium* (0,6 g glucosa/100 g de materia prima) y en el control (2,6 g glucosa/100 g de materia prima). De manera semejante para el pre-tratamiento realizado por *Pleurotus ostreatus* sobre paja de trigo se encontró que después de 60 días de fermentación el rendimiento neto de azúcares (basados en las cantidades de holocelulosa y celulosa de la paja de trigo no tratada respectivamente) fue de 33% para los azúcares totales solubles de la holocelulosa y 32% para los de la glucosa de la celulosa [17], valores superiores a los encontrados en este trabajo, esto debido posiblemente al tiempo del tratamiento previo el cual correspondió a la mitad del estudiado con la paja de trigo.

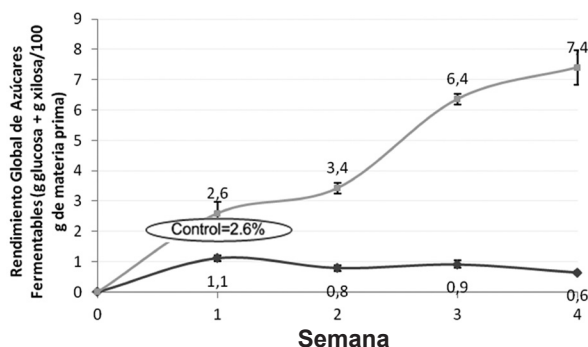


Figura 3. Rendimiento global de azúcares fermentables en función del tiempo ■ *P. ostreatus*
◆ *P. chrysosporium*.

Según los datos obtenidos anteriormente para el rendimiento global de azúcares fermentables, aunque el ataque a la lignina es esencial para la eficacia de la hidrólisis enzimática de los polisacáridos presentes en la pared celular, el mayor grado de degradación de esta fracción no siempre está correlacionada positivamente con los altos niveles de digestibilidad de la hemicelulosa y celulosa. Estos resultados están de acuerdo con

reportes previos [21, 22], los cuales señalan que el nivel de deslignificación no se puede considerar como el único parámetro a evaluar cuando se emplea un microorganismo en el pre-tratamiento biológico [17].

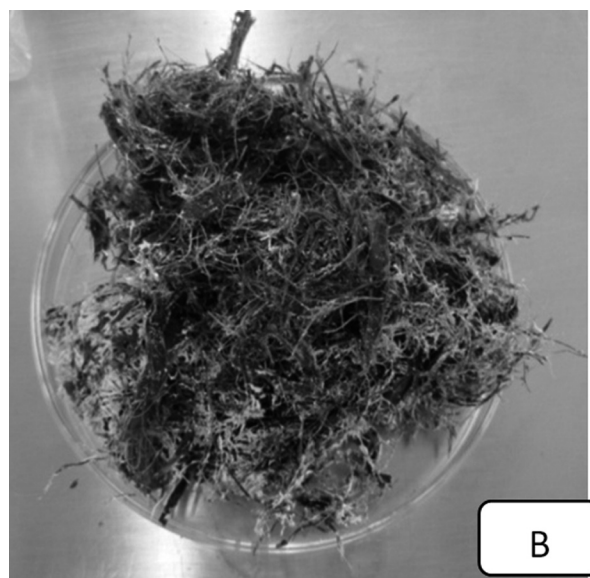
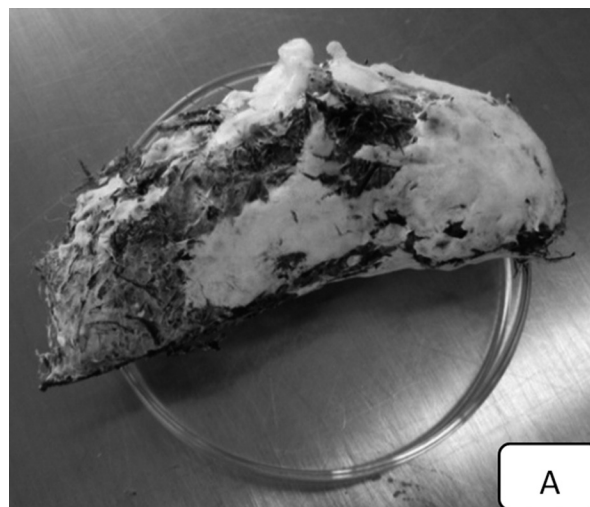


Figura 4. Vista de la fibra prensada de palma pre-tratada con *P. ostreatus* (A) y *P. chrysosporium* (B) a la cuarta semana de tratamiento.

Conclusiones

La fibra prensada fue caracterizada y se encontró que presenta un alto contenido de lignina (30,7%). En cuanto a la deslignificación biológica el mayor porcentaje se obtuvo en el material pre-tratado con el hongo *P. ostreatus* (33,4%), valor superior al obtenido con *P. chrysosporium* (30,2%).

En relación a la hidrólisis enzimática para la producción de azúcares fermentables se logró el aumento pasando de 2,6% en el control a 7,4% en material pre-tratado por *P. ostreatus*. Los resultados hallados en la presente investigación ratifican el potencial de este residuo para la producción de azúcares fermentables aplicando el pre-tratamientos biológico con el hongo *Pleurotus ostreatus*, el cual presenta ventajas interesantes como el bajo consumo de energía, inversión de capital, condiciones ambientales favorables y reducción en la concentración de inhibidores de fermentación.

Se recomienda hacer combinaciones con tratamientos fisicoquímicos o hidrotérmicos para aumentar la producción de azúcares fermentables por hidrólisis enzimática, así como ampliar el tiempo de deslignificación biológica.

Agradecimientos

Al proyecto “Hidrólisis de residuos lignocelulósicos derivados de la explotación de la palma de aceite hasta azúcares fermentables” financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS y ejecutado por la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá en convenio con la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.

A Colciencias y el programa Jóvenes Investigadores e Innovadores Virginia Gutiérrez de Pineda año 2009.

Referencias

- [1] Anuario estadístico. Área cultivada y capacidad de las plantas de beneficio. Fedepalma. Disponible en: http://www.fedepalma.org/document/2008/area_cultivada.pdf. Acceso el 3 de noviembre 2010.
- [2] Hendriks A, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 2008;100(1):10-8.
- [3] Kumar KS, Manimaran A, Permaul K, Singh S. Production of b-xylanase by a *Thermomyces lanuginosus* MC 134 mutant on corn cobs and its application in biobleaching of bagasse pulp. *J. Biosci. Bioeng.* 2009;107(5):494-8.
- [4] Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 2009;101:4851-61.
- [5] Ospina A, Piñeros Y. Estudio de la producción de ligninasas a partir del cultivo de *Pleurotus sp.* sobre residuos de palma, efecto del pH y la temperatura (trabajo de grado). Bogotá, Colombia: Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano; 2007.
- [6] Shi J, Chinn M, Sharma-Shivappa R. Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresour. Technol.* 2008;99:6556-64.
- [7] Dorado J, Almendros G, Camarero S, Martínez A, Vares T, Hatakka A. Transformation of wheat Straw in the course of solid-state fermentation by four ligninolytic basidiomycetes. *Enzyme Microbiol. Technol.* 1999;25:605-12.
- [8] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 2002;83:1-11.
- [9] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP) NRLE “National Renewable Energy Laboratory” Issue Date: 4/25/2008*
- [10] Miller GL. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 1959;31:425-8.
- [11] Kelly-Yong TL, Lee KT, Mohamed AR, Bhatia S. Potential of hydrogen from oil palm biomass as a source of renewable energy worldwide. *Energy Policy.* 2007;35(11):5692-701.
- [12] Riansa-ngawong W, Prasertsan P. Optimization of furfural production from hemicellulose extracted from delignified palm pressed fiber using a two-stage process. *Carbohydr res.* 2011;346(1-3):103-10.
- [13] Husain Z, Zainac Z, Abdullah Z. Briquetting of palm fibre and shell from the processing of palm nuts to palm oil. *Biomass Bioenerg.* 2002;22(6):505-9.
- [14] Rodríguez-Vázquez R, Cruz-Cordova T, Fernández-Sánchez JM, Roldán Carillo T, Mendoza Cantu A, Saucedo Castana G, et al. Use of sugarcane bagasse pith as solid substrate for *P. chrysosporium* growth. *Folia Microbiol.* 1999;44:213-8.
- [15] Huang D, Zeng G, Peng Z, Zhang P, Hu S, Jiang X, et al. Biotransformation of rice straw by *Phanerachaete chrysosporium* and the related ligninolytic enzymes. *IJBT.* 2008;10(1):86-92.
- [16] Salvachúa D, Prieto A, López-Abelairas M, Lu-Chau T, Martínez ÁT, Martínez MJ. Fungal pretreatment: An alternative in second-

- generation ethanol from wheat straw. *Bioresour. Technol.* 2011;102:7500-6.
- [17]Taniguchi M, Suzuki H, Watanabe D, Sakai K, Hoshino K, Tanaka T. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. *J Biosci Bioeng.* 2005;100(6):637-43.
- [18]Ballesteros I, Ballesteros M, Manzanares P, Negro MJ, Oliva JM, Sáez F. Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production. *Biochem Eng J.* 2008;42(1):84-91.
- [19]Lucas R, Robles A, Gálvez A, García T, Pérez R, Álvarez G, Biodegradación de la celulosa y la lignina. Universidad de Jaen. 2001.p. 14-28, 31-33, 65-69.
- [20]Kuhar S, Nair LM, Kuhad RC. Pretreatment of lignocellulosic material with fungi capable of higher lignin degradation and lower carbohydrate degradation improves substrate acid hydrolysis and the eventual conversion to ethanol. *Can J Microbiol.* 2008;54(4): 305-13.
- [21]Capelari M, Zadrazil F. Lignin degradation and *In vitro* digestibility of wheat straw treated with Brazilian tropical species of white rot fungi. *Folia Microbiol.* 1997;42(5):481-7.
- [22]Müller H, Trösch W. Screening of white-rot fungi for biological pretreatment of wheat straw for biogas production. *Appl Microbiol Biot.* 1986;24(2):180-5.