

## ACTIVIDAD DE CELULASAS Y LACASAS DE *Pleurotus ostreatus* POR FERMENTACIÓN EN MEDIOS SÓLIDOS CON SUBPRODUCTOS DEL MAÍZ (*Zea mays* L.)

Activity of cellulase and laccase from *Pleurotus ostreatus* by fermentation in solid media with maize (*Zea mays* L.) by-products

Brenda Karina MORALES-CAMPOS, Paulino SÁNCHEZ-SANTILLÁN\*,  
Nicolás TORRES-SALADO, Luis Antonio SAAVEDRA-JIMÉNEZ,  
Jerónimo HERRERA-PÉREZ y Marco Antonio AYALA-MONTER

Universidad Autónoma de Guerrero, Carretera Acapulco-Pinotepa Nacional, kilómetro 197, Cuajinicuilapa, C. P. 41940, Guerrero, México.

\* Autor para correspondencia: [sanchezsantillanp@gmail.com](mailto:sanchezsantillanp@gmail.com)

(Recibido: agosto 2021; aceptado: noviembre 2023)

Palabras clave: actividad enzimática, hongo podredumbre blanca, olote, tiempo de fermentación, totomoxtle.

### RESUMEN

Los subproductos del maíz (olote, totomoxtle y rastrojo) podrían servir como sustrato para producir extractos enzimáticos por fermentación sólida (FS). El objetivo de esta investigación fue cuantificar la actividad de enzimas celulasas y lacasas de cepas de *Pleurotus ostreatus* a cinco y diez días de FS. La FS se realizó en matraces Erlenmeyer con 50 g de sustrato (80 % humedad) inoculados con 5 g de una cepa e incubados a 30 °C. En cada tiempo de fermentación se obtuvo el extracto enzimático y al fermento sólido se le determinó proteína cruda (PC), materia orgánica (MO), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA). El diseño experimental fue un arreglo factorial 2x3x2 en un diseño completamente al azar; usando cepas, sustratos y tiempo de fermentación como factores. La actividad enzimática de las celulasas y la PC no mostraron diferencias entre cepas y tipos de sustrato ( $p > 0.05$ ). La FS a 10 d mostró mayor actividad de las celulasas y PC que a los cinco días; la mayor actividad de las lacasas fue en la FS por cinco días usando la cepa P15 y olote o rastrojo; el fermento con rastrojo presentó menor FDN que totomoxtle y olote; el fermento sólido a diez días mostró mayor FDA que a cinco días de FS; la FS con diez días usando rastrojo y la cepa MR mostró menor MO ( $p < 0.05$ ). En conclusión, olote y totomoxtle son sustratos efectivos en FS para producir extractos enzimáticos de celulasas y lacasas, además el contenido de nutrientes del sustrato se modificó con el tiempo de fermentación.

Key words: Enzyme activity, cob, fermentation time, totomoxtle, white rot fungi.

### ABSTRACT

Maize by-products (corn stover, totomoxtle and stubble) could serve as a substrate to produce enzyme extracts by solid fermentation (SF). The objective of this study was to quantify the activity of cellulase and laccase enzymes of *Pleurotus ostreatus* strains at five and ten days of SF. The SF was carried out in Erlenmeyer flasks with 50 g of substrate (80% humidity) inoculated with 5 g of a strain and incubated at 30 °C. At each fermentation time, the enzymatic extract was obtained and crude protein (CP), organic matter (OM), neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF)

were determined from the solid ferment. The experimental design was a 2x3x2 factorial arrangement in a completely randomized design; using strains, substrates and fermentation time as factors. Cellulase enzyme activity and CP showed no differences between strains and substrate types ( $p > 0.05$ ). The SF at ten days showed higher cellulase activity and CP than at five days; the highest laccase activity was in the SF for five days using strain P15 and corn stover or stubble; the ferment with stubble showed lower NDF than totemoxtle and corn stover; the solid ferment at ten days showed higher ADF than at five days of SF; the SF with ten days using stubble and strain MR showed lower OM ( $p < 0.05$ ). In conclusion, olote and totemoxtle are effective substrates in SF to produce enzymatic extracts of cellulases and laccases, and the nutrient content of the substrate changed with fermentation time.

## INTRODUCCIÓN

El maíz es un cultivo importante en varias partes del mundo debido a su demanda con propósitos de congelación, enlatado y de mesa; cuando se cosecha, se obtiene forraje verde como subproducto de calidad (Aguirre-Rivera et al. 2016). La diversidad del maíz (*Zea mays*) mexicano es notable, ya que México se reconoce como el centro de origen, domesticación y diversificación de esta especie. El maíz se ha adaptado exitosamente a una amplia gama de condiciones climáticas y edafológicas (Barrera-Guzmán et al. 2020) y tiene una diversidad de usos en grano y en planta para la alimentación humana o animal. En México, la mazorca parcialmente inmadura se llama elote y constituye una importante fuente de carbohidratos en la alimentación humana (Ortiz-Torres et al. 2013, Aguirre-Rivera et al. 2016). Por otro lado, el consumo y producción de maíz para elote es importante por el valor económico que genera, que varía en función de su procesamiento (Noriega et al. 2015, Espejel-García 2020).

En 2019, México produjo 17 045 t de elote, con un rendimiento de 14.9 t/ha (SIAP 2021). Una planta de maíz produce de uno a cuatro elotes (Mejía 2003), de los cuales se obtienen subproductos como el olote (cuando se retiran los granos del elote), totemoxtle (hojas que cubren el elote) y rastrojo (Jaramillo-Villanueva 2018). De modo que, al separar el grano y hojas del elote se produce olote y totemoxtle como productos de desecho, lo cuales equivalen a alrededor del 26.6 % de la biomasa, convirtiéndose en desechos con potencial contaminante. Estos productos suelen ser depositados como basura o se secan para su combustión. Se estima que por cada tonelada de maíz se obtienen 170 kg de olote (García-Alaniz et al. 2022). Asimismo, aproximadamente 27 228 242 t de maíz se produjeron en 2019 (SIAP 2019), de las cuales se genera el rastrojo como subproducto, lo que representa cerca de 75 % de los residuos de la cosecha

de maíz (Jaramillo-Villanueva 2018). Este rastrojo se utiliza como alimento para rumiantes, a pesar de tener escaso valor nutricional y baja disponibilidad de nutrientes debido a su estado de lignificación, o se deja en el terreno como acondicionador de suelos o se quema (Fuentes et al. 2001).

El olote, entre otros usos, sirve como sustrato para la producción de enzimas xilanasas (Knob y Cano-Carmona 2010) o para la extracción de celulosa mediante procesos de fermentación controlada (De León 2008). Dicha fermentación en estado sólido es un proceso microbiológico que se lleva a cabo sobre materiales sólidos. Los sustratos deben tener la propiedad de absorber y contener agua (Brea et al. 2020). La fermentación sólida se usa para producir enzimas y metabolitos primarios y secundarios (Barrios-González y Tarrago-Castellanos 2017). Los metabolitos resultantes de la fermentación fúngica tienen impacto en la industria de alimentos, en la industria farmacéutica y en la agricultura (Pineda-Insusti et al. 2014).

En relación con lo anterior, el hongo *Pleurotus ostreatus* tiene la habilidad de crecer sobre residuos de material leñoso o ricos en fibra, como troncos, ramas, bagazos, rastrojos, etc., debido a su capacidad de degradar polímeros como la lignina y la celulosa mediante la secreción de un complejo enzimático (López-Rodríguez et al. 2008). Las lacasas hidrolizan compuestos fenólicos, como diaminas y aminas aromáticas (Mate y Alcalde 2017), mientras que las celulasas rompen enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 presentes en los polisacáridos de la pared celular (Wilson 2009).

El cultivo de *P. ostreatus* mediante fermentación sólida se utiliza para producir metabolitos secundarios como enzimas celulasas y lacasas en sustratos lignocelulósicos como los subproductos del maíz que normalmente se utilizan como combustible y son quemados o arrojados a los basureros y ríos, sin tratamiento previo (López-Rodríguez et al. 2008). El

objetivo de este estudio fue cuantificar la actividad de celulasas y lacasas de las cepas MR y P15 de *P. ostreatus* en una fermentación sólida de cinco y diez días usando como sustratos olote, totomoxtle y rastrojo de maíz.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2 de la Universidad Autónoma de Guerrero, ubicado en el km 197 de la carretera Acapulco-Pinotepa Nacional, Cuajinicuilapa, Guerrero, México.

### Microorganismos

Los microorganismos fueron las cepas P15 y MR del hongo *P. ostreatus*, cultivadas en grano de sorgo; los cuales se adquirieron de la empresa AAC Biolab (Estado de México, México 2018). La preparación del sustrato para producir el inóculo consistió en hervir 500 g de grano entero de sorgo durante 30 min en 1 L de agua destilada que se filtró para eliminar el exceso de agua. Posteriormente, el sorgo se colocó en un matraz Erlenmeyer (Kimax<sup>®</sup>; 500 mL), se tapó con algodón y papel de estraza, y se esterilizó a 121 °C durante 15 min y 15 psi en autoclave (All American<sup>®</sup> 1941X, EUA). En una campana de flujo laminar (Labconco<sup>®</sup>, EUA), el matraz se dejó enfriar a temperatura 30 °C promedio, se inoculó con 50 g de micelio de una cepa de *P. ostreatus* y se incubó a una temperatura promedio de 30 °C durante 10 días sin agitación.

### Sustratos

El rastrojo de maíz se obtuvo de un cultivo de maíz en Cuajinicuilapa, Guerrero (México), el cual comúnmente se quema en las parcelas como fuente de minerales para la tierra. Se colectaron tres muestras de 5 kg de totomoxtle y olote en la localidad antes mencionada. En el laboratorio, se procedió a escoger el olote y el totomoxtle para evitar contaminación por manejo, se enjuagaron con agua corriente para eliminar impurezas. Los sustratos se deshidrataron en una estufa (Felisa<sup>®</sup> FE-293A, México) a 60 °C por 72 h y se molieron en un molino convencional de martillos (Magro TR-3500, México) con malla de 0.5 cm de diámetro.

### Fermentación sólida

En matraces Erlenmeyer (Kimax<sup>®</sup>; 500 mL) se colocaron 50 g de cada tipo de sustrato con 80 % de humedad, se colocó un tapón de algodón y papel de estraza y se esterizaron. En una campana de flujo

laminar (Labconco<sup>®</sup>, EUA), los matraces con sustrato estéril se inocularon con 10 % P/P de micelio P15 o MR de *P. ostreatus* como inóculo. A continuación, se colocó un tapón de algodón y se incubaron a 30 °C en promedio por cinco y diez días. Al término de cada tiempo de incubación, el contenido de cada matraz se dividió en dos para determinar, con una parte actividad enzimática y, con la otra, el análisis químico del fermento sólido (tres repeticiones).

### Actividad enzimática

El fermento sólido se colocó en un mortero (Coorstek, 400 mL) y se agregó agua destilada en una relación 1:1.5, se maceró por 20 min y se filtró con doble gasa. El filtrado se centrifugó durante 25 min a 4 °C y 9710 g en una centrífuga (Metrix<sup>®</sup>, 69-FA15A, México) y el sobrenadante se usó como extracto enzimático (EE) para cuantificar la actividad de las celulasas y las lacasas.

La actividad de las celulasas se midió usando el método de azúcares reductores descrito por Miller (1959). El sustrato fue carboximetilcelulosa (CMC) a 0.5 % {2.5 g de carboximetilcelulosa (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA) aforado a 500 mL con amortiguador de citratos 50 mM y pH 4.8 [10.507 g ácido cítrico (Meyer<sup>®</sup>, México) aforado a 1 L con agua destilada]}. La mezcla de reacción de cada muestra contenía 0.9 mL de CMC 0.5 % y 0.1 mL de EE (se realizó por duplicado cada muestra). A continuación, se incubaron 30 minutos a 50 °C, se agregaron 1.5 mL de solución DNS [14 g NaOH (Meyer<sup>®</sup>, México) + 5.9 g de metabisulfito de Na (Meyer<sup>®</sup>, México) + 29 g tartrato de Na y K (Meyer<sup>®</sup>, México) + 1 g de ácido dinitrosalicílico (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA) + 5.8 mL de fenol líquido (Golden Bell Reactivos<sup>®</sup>, México) aforado a 1 L con agua destilada] y se hirvió por 5 min, e inmediatamente se introdujeron en un recipiente de agua helada. Para cada muestra se preparó un blanco con 0.9 mL de CMC 0.5 %, se incubó 30 min a 50 °C, se agregaron 1.5 mL de solución DNS y 0.1 mL de ECE; se hirvió por 5 min, e inmediatamente se introdujeron en un recipiente de agua helada. Las muestras y los blancos se midieron a una absorbancia de 540 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Jenway<sup>®</sup> 6850, EUA). La curva estándar se preparó con una solución de glucosa 10 mM [0.18 g de dextrosa (Merk<sup>®</sup>, México) aforada con 100 mL de amortiguador de citratos 50 mM y pH 4.8]. Una unidad de actividad de celulasa (U) se definió como la cantidad de enzimas que libera 1  $\mu\text{mol/min}$  de glucosa.

La actividad de las lacasas se determinó por la generación de radicales 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfónico) por la oxidación de ABTS

(Wolfenden y Wilson 1982). La mezcla de reacción de cada muestra contenía 1.6 mL de agua destilada, 0.2 mL de EE y 0.2 mL de reactivo ABTS {0.069 mg ABTS (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA) aforado en 25 mL de amortiguador de citratos 50 mM y pH 5.3 [10.507 g ácido cítrico (Meyer<sup>®</sup>, México) aforado en 1 L con agua destilada]}. La mezcla de reacción se incubó 1 min a 40 °C. La absorbancia a 420 nm se registró cada 10 s por 2 min. Una unidad de actividad de lacasa (U) se definió como la cantidad de enzimas que produce 1  $\mu$ mol/min de ABTS oxidado.

### Análisis bromatológico

Los fermentados sólidos se deshidrataron a 60 °C por 48 h para obtener la materia seca (MS); posteriormente, se molieron con una criba de 1 mm en un molino Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific<sup>®</sup>, Swedesboro, NJ, EUA). Antes (**Cuadro I**) y después de la fermentación sólida, en los sustratos se determinó proteína cruda (PC; método 976.05), cenizas (Ce; método 942.05) y materia orgánica (MO) de acuerdo con la metodología descrita por AOAC (2005); la fibra detergente neutro (FDN) y la fibra detergente ácido (FDA) se determinó utilizando la adaptación de Van Soest et al. (1991), Ankom ficrofilter Technology. La hemicelulosa se calculó por la diferencia entre FDN y FDA.

### Análisis estadístico

La actividad de las celulasas y las lacasas, así como el análisis químico (tres repeticiones independientes por interacción) se analizaron en un arreglo factorial 2x3x2 dentro de un diseño completamente al azar, considerando como factores a las cepas de *P. ostreatus* (P15 y MR), tipo de sustrato (rastrajo, olote y totomoxtle) y tiempo de fermentación sólida (5 y 10 días). Las medias se ajustaron por mínimos cuadrados para compararlas con la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). El modelo estadístico fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

dónde:  $Y_{ijkl}$  = Variable de respuesta;  $\mu$  = Media general;  $A_i$  = Efecto del factor cepa de *P. ostreatus*;  $B_j$  = Efecto del factor tipo de sustrato;  $C_k$  = Efecto del factor tiempo de fermentación sólida;  $(AB)_{ij}$  = Efecto de la interacción entre tipo de cepa y tipo de sustrato;  $(AC)_{ik}$  = Efecto de la interacción entre tipo de cepa y tiempo de fermentación sólida;  $(BC)_{jk}$  = Efecto de la interacción entre tipo de sustrato y tiempo de fermentación sólida;  $(ABC)_{ijk}$  = Efecto de la interacción entre tipo de cepa, tipo de sustrato y tiempo de fermentación sólida;  $\varepsilon_{ijkl}$  = Error aleatorio.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Actividad enzimática

A mayor tiempo de fermentación sólida de *P. ostreatus* en subproductos del maíz, mejora la actividad de las celulasas debido a que el hongo tiene más tiempo para producir celulasas que degradan la pared celular de los subproductos del maíz por su contenido de FDN y FDA (**Cuadro I**). El **cuadro II** muestra la actividad enzimática y el análisis bromatológico según los factores; es decir el comportamiento por tipo de cepa, tipo de sustrato y tiempo de fermentación. La actividad de las celulasas no mostró diferencias entre tipo de cepas y tipo de sustrato ( $p > 0.05$ ), con un promedio de 1.58 U/g (**Cuadro II**). Esto indica que la actividad de las celulasas no se vio afectada por las cepas de *P. ostreatus*, ni por el uso de rastrajo, olote y totomoxtle como sustrato en la fermentación sólida. La fermentación sólida a los diez días produjo 4.5 veces más celulasas que a los cinco días ( $p < 0.05$ ; **Cuadro II**).

Los valores de las celulasas a los cinco días de fermentación sólida de este estudio son similares a los reportados por Sánchez-Santillán et al. (2015a);

**CUADRO I.** ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE SUBPRODUCTOS DEL MAÍZ USADOS COMO SUSTRATO EN LA FERMENTACIÓN SÓLIDA.

Sustrato	MS	PC	FDN	FDA	Hemi	Ce	MO
(g/kg MS)							
Olote	246.3	66.2	750.1	389.0	361.2	17.5	982.5
Rastrajo de maíz	935.3	73.6	784.7	485.0	299.7	65.2	934.8
Totomoxtle	238.0	58.4	805.4	397.0	408.4	28.9	971.1

MS = materia seca, PC = proteína cruda, FDN = fibra detergente neutro, FDA = fibra detergente ácido, Hemi = hemicelulosa, Ce = cenizas, MO = materia orgánica.

**CUADRO II.** ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE FERMENTO SÓLIDO OBTENIDO POR LAS CEPAS MR Y P15 DE *Pleurotus ostreatus* EN SUBPRODUCTOS DE MAÍZ A CINCO Y DIEZ DÍAS DE FERMENTACIÓN SÓLIDA.

Variable	Cepa		Sustrato			Tiempo fermentación (días)		EEM
	MR	P15	Olote	Rastrojo	Totomoxtle	5	10	
Celulasas	1.55	1.60	1.42	1.71	1.60	0.57 <sup>b</sup>	2.59 <sup>a</sup>	0.18
Lacasas	14.10 <sup>b</sup>	20.35 <sup>a</sup>	18.65 <sup>a</sup>	21.76 <sup>a</sup>	11.26 <sup>b</sup>	21.00 <sup>a</sup>	13.44 <sup>b</sup>	2.32
MS	252	263.4	263.9	265.7	243.5	279.1 <sup>a</sup>	236.3 <sup>b</sup>	5.73
Ce	41.3 <sup>a</sup>	40.1 <sup>b</sup>	20.1 <sup>c</sup>	77.6 <sup>a</sup>	24.4 <sup>b</sup>	38.2 <sup>b</sup>	43.2 <sup>a</sup>	4.46
MO	958.7 <sup>b</sup>	959.9 <sup>a</sup>	979.9 <sup>a</sup>	922.4 <sup>c</sup>	975.6 <sup>b</sup>	961.8 <sup>a</sup>	956.8 <sup>b</sup>	4.46
FDN	716.1 <sup>b</sup>	735.6 <sup>a</sup>	767.6 <sup>a</sup>	693.8 <sup>c</sup>	716.2 <sup>b</sup>	695.9 <sup>b</sup>	755.8 <sup>a</sup>	8.56
FDA	393.2	399.8	395.1 <sup>b</sup>	438.5 <sup>a</sup>	356.0 <sup>c</sup>	369.5 <sup>b</sup>	423.5 <sup>a</sup>	8.67
Hemi	322.9	335.9	372.6 <sup>a</sup>	255.3 <sup>b</sup>	360.2 <sup>a</sup>	326.5	332.3	9.9
PC	44.2	50.9	50.6	48.3	43.7	37.5 <sup>b</sup>	57.6 <sup>a</sup>	2.8

<sup>a,b,c</sup> Medias con diferente literal en la misma fila indican deferencias ( $p < 0.05$ ).

Celulasas = U/g, Lacasas = U/g, MS = g/kg MS, Ce = g/kg MS de cenizas, MO = g/kg MS de materia orgánica, FDN = g/kg MS de fibra detergente neutro, FDA = g/kg MS de fibra detergente ácido, Hemi = g/kg MS de hemicelulosa, PC = g/kg MS de proteína cruda, Cepa = MR y P15 de *P. ostreatus*, Sustrato = olote, totomoxtle y rastrojo de maíz, días = cinco y diez días de fermentación sólida, EEM = error estándar de la media.

mientras que a los diez días son mayores a lo publicado por Membrillo et al. (2011), Sánchez-Santillán et al. (2015b) y Soto-Sánchez et al. (2015). Los valores reportados son 0.6 U/g en bagazo de caña de azúcar inoculado con *P. ostreatus* con cinco días de fermentación sólida (Sánchez-Santillán et al. 2015a); 0.225 U/g en bagazo de caña de azúcar inoculado con *P. ostreatus* con siete días de fermentación sólida (Membrillo et al. 2011); 0.3 U/g en bagazo de caña de azúcar inoculado con *P. ostreatus* con 15 días de fermentación sólida (Sánchez-Santillán et al. 2015b), y 1.6 U/g en paja de cebada inoculada con *Pleurotus sapidus* con ocho días de fermentación sólida (Soto-Sánchez et al. 2015).

La actividad de las lacasas por factores mostró que P15 produjo 44.3 % más que MR; el olote y el rastrojo produjeron 79.4 % más que el totomoxtle, y en cinco días de fermentación se produce 56.2 % más que a los diez días ( $p < 0.05$ ; **Cuadro II**). El **cuadro III** muestra las variables que presentaron triple interacción entre factores, es decir, aquellas que presentaron diferencias cuando interactuaron entre cepas, tipos de sustratos y tiempo de fermentación. La mejor actividad de las lacasas se presentó cuando se realizó la fermentación sólida por cinco días usando la cepa P15 y olote como sustrato ( $p < 0.05$ ; **Cuadro III**). Cabe destacar, que ésta no presentó diferencias con la misma cepa y tiempo de fermentación usando el rastrojo como sustrato ( $p > 0.05$ ; **Cuadro III**).

Membrillo et al. (2008), Luna et al. (2013), Méndez-Hernández et al. (2018) y Ganash et al. (2021) publicaron valores inferiores en la cuantificación de

la actividad de lacasas que la cepa P15 con cinco días de fermentación sólida en olote del presente estudio. Membrillo et al. (2008) reportaron 0.02 UI/g MS en bagazo de caña de azúcar (2.9 mm de tamaño de partícula) inoculado con *P. ostreatus* por ocho días; Luna et al. (2013) cuantificaron 3.46 UI/g MS en una fermentación sólida de 12 días con rastrojo de cebada y *P. ostreatus*; mientras, Méndez-Hernández et al. (2018) informaron una cuantificación de 1.4 y 4.1 U/g con una fermentación de cinco y diez días con rastrojo de maíz y *Fomes* sp; y Ganash et al. (2021) publicaron 2.1 y 2.2 U/mL en rastrojo de maíz inoculado con *P. ostreatus* por cinco y diez días.

Márquez et al. (2007) mencionan que *P. ostreatus* presenta mayor actividad de lacasas (13.9 UI/g MS) que de celulasas (1.06 UI/g MS), lo que coincide con lo reportado en el presente estudio (**Cuadros II y III**). Asimismo, la actividad enzimática de *P. ostreatus* varía según las condiciones del proceso de fermentación sólida: tipo de microorganismo a usar, el tiempo de la fermentación sólida, el tipo de sustrato y su tamaño de partícula, la afinidad enzima-sustrato (Kumar et al. 2008, Sánchez-Santillán et al. 2015b, Zárate-Salazar et al. 2020), la composición de la pared celular del sustrato, la naturaleza del inóculo, la temperatura (Park et al. 2002, Sánchez-Santillán et al. 2015a, Zárate-Salazar et al. 2020), la estructura de la planta utilizada (olote o totomoxtle; Luna et al. 2013, Zárate-Salazar et al. 2020, Ganash et al. 2021) y las propiedades mecánicas y físicas de los sustratos (Ganash et al. 2021).

**CUADRO III.** ACTIVIDAD DE LACASAS, CENIZAS Y MATERIA ORGÁNICA DE FERMENTO SÓLIDO CON DIFERENTES SUBPRODUCTOS DE MAÍZ INOCULADOS CON LAS CEPAS MR O P15 DE *Pleurotus ostreatus* DURANTE CINCO Y DIEZ DÍAS DE FERMENTACIÓN SÓLIDA.

Sustrato	Cepa	Tiempo de fermentación (d)	Lacasas	Cenizas	Materia orgánica
			U/g	(g/kg MS)	
Olote	MR	5	14.6 <sup>d</sup>	18.1 <sup>g</sup>	981.9 <sup>a</sup>
	MR	10	8.92 <sup>d</sup>	20.6 <sup>fg</sup>	979.4 <sup>ab</sup>
	P15	5	48.95 <sup>a</sup>	19.1 <sup>g</sup>	980.9 <sup>a</sup>
	P15	10	2.14 <sup>d</sup>	22.8 <sup>ef</sup>	977.2 <sup>bc</sup>
Rastrojo de maíz	MR	5	31.09 <sup>bc</sup>	74.7 <sup>bc</sup>	925.3 <sup>ef</sup>
	MR	10	11.31 <sup>d</sup>	86.9 <sup>a</sup>	913.1 <sup>g</sup>
	P15	5	34.09 <sup>ab</sup>	72.5 <sup>c</sup>	927.5 <sup>e</sup>
	P15	10	10.56 <sup>d</sup>	76.4 <sup>b</sup>	923.6 <sup>f</sup>
Totomoxtle	MR	5	11.35 <sup>d</sup>	22.5 <sup>ef</sup>	977.5 <sup>bc</sup>
	MR	10	7.31 <sup>d</sup>	25.2 <sup>de</sup>	974.8 <sup>cd</sup>
	P15	5	15.45 <sup>cd</sup>	22.6 <sup>ef</sup>	977.4 <sup>bc</sup>
	P15	10	10.92 <sup>d</sup>	27.3 <sup>d</sup>	972.7 <sup>d</sup>
EEM			2.32	4.46	4.46

<sup>a,b,c</sup> Medias con diferente literal en la misma fila indican deferencias ( $p < 0.05$ ).

Cepa = MR y P15 de *P. ostreatus*

### Composición química

El contenido de MS no mostró diferencias ( $p > 0.05$ ) entre las cepas MR y P15 de *P. ostreatus*, ni entre los sustratos rastrojo, olote o totomoxtle (**Cuadro II**); fue 57.7 g mayor que la MS inicial de los sustratos antes de iniciar la fermentación sólida. Sin embargo, la fermentación sólida a los cinco días mostró 18.1 % mayor contenido de MS que la fermentación con diez días (**Cuadro II**). Los cambios en el contenido de MS se asumen a la cantidad de agua que se evaporó durante el tiempo de fermentación sólida evaluado; dado el contenido de MS inicial (20 %) y la cantidad de biomasa fúngica que se sintetizó por el crecimiento de *P. ostreatus*

El contenido de proteína cruda (PC) no presentó diferencias entre sustratos, ni con tipo de cepa de *P. ostreatus* ( $p > 0.05$ ). No obstante, la fermentación sólida con diez días mostró un incremento de 53.6 % respecto a la fermentación con cinco días (**Cuadro II**). Si comparamos el contenido de PC de los sustratos antes y después del proceso de fermentación sólida, se observa que el contenido de PC es menor después del proceso de fermentación sólida.

Esto se puede deber al hecho de que el hongo utiliza la proteína presente en el sustrato para satisfacer

sus necesidades de nitrógeno para biosíntesis de proteína microbiana (Sánchez-Santillán et al. 2015b); mientras, las diferencias entre los tiempos de fermentación se relacionan con el crecimiento del micelio del hongo (Olivera-De la Cruz et al. 2019). Valores inferiores de PC (**Cuadro II**) se reportaron en paja de trigo usada como sustrato en fermentaciones sólidas hasta por 30 días inoculadas con *P. ostreatus* (Shrivastava et al. 2011), así como superiores en fermentaciones sólidas de cinco días en rastrojo de maíz inoculado con *P. ostreatus* (Khonkhaeng y Cherdthong 2019).

El **cuadro IV** presenta las variables por tipo de sustrato a diferentes tiempos de fermentación. Cabe destacar que las cepas no mostraron interacción con el tipo de sustrato, ni con el tiempo de fermentación ( $p > 0.05$ ). El olote sometido a diez días de fermentación sólida mostró el mayor contenido de fibra detergente neutro (FDN), 150.9 g más que el rastrojo fermentado por cinco días, que presentó el menor contenido de FDN ( $p < 0.05$ ; **Cuadro IV**). El sustrato donde se inoculó la cepa MR mostró 2.7 % menos contenido de FDN que la cepa P15; el sustrato a los cinco días de fermentación sólida presentó 8.6 % menos FDN que los sustratos a los diez días; el rastrojo de maíz presentó 3.2 % menor contenido de FDN que el

**CUADRO IV.** ACTIVIDAD DE LACASAS, CENIZAS, MATERIA ORGÁNICA Y FIBRAS DETERGENTES DE FERMENTO SÓLIDO CON DIFERENTES SUBPRODUCTOS DEL MAÍZ DURANTE CINCO Y DIEZ DÍAS DE FERMENTACIÓN SÓLIDA.

Sustrato	Tiempo de fermentación (d)	Lacasas	Ce	MO	FDN	FDA
		U/g	(g/kg MS)			
Oloste	5	28.93 <sup>a</sup>	18.6 <sup>c</sup>	981.4 <sup>a</sup>	740.6 <sup>b</sup>	382.2 <sup>b</sup>
	10	8.37 <sup>c</sup>	21.7 <sup>d</sup>	978.3 <sup>b</sup>	794.6 <sup>a</sup>	407.9 <sup>b</sup>
Rastrojo de maíz	5	22.7 <sup>a</sup>	73.6 <sup>b</sup>	926.4 <sup>d</sup>	643.7 <sup>d</sup>	391.1 <sup>b</sup>
	10	20.83 <sup>ab</sup>	81.7 <sup>a</sup>	918.4 <sup>c</sup>	743.8 <sup>b</sup>	485.8 <sup>a</sup>
Totomoxtle	5	11.38 <sup>bc</sup>	22.5 <sup>d</sup>	977.5 <sup>b</sup>	703.5 <sup>c</sup>	335.0 <sup>c</sup>
	10	11.13 <sup>c</sup>	26.2 <sup>c</sup>	973.8 <sup>c</sup>	728.9 <sup>bc</sup>	376.9 <sup>bc</sup>
EEM		2.32	4.46	4.46	8.56	8.67

a,b,c,d,e Medias con diferente literal en la misma columna indican deferencias (p < 0.05).

\*Variables que presentaron interacción (p < 0.05) entre los factores sustrato y días de fermentación sólida.

Ce = cenizas, MO = materia orgánica, FDN = fibra detergente neutro, FDA = fibra detergente ácido, EEM = error estándar de la media.

totomoxtle, y este 7.2 % menos que el olote (p < 0.05; **Cuadro IV**). Esto se explica porque las cepas MR y P15 consumieron carbohidratos estructurales como fuente de energía para su crecimiento (Okano et al. 2007, Sánchez-Santillán et al. 2015b).

El rastrojo con diez días de fermentación sólida mostró el mayor contenido de FDA, 150.8 g más que el totomoxtle con cinco días de fermentación, que presentó el menor contenido de FDA (p < 0.05; **Cuadro IV**). La inoculación de las cepas MR y P15 de *P. ostreatus* no modificó el contenido de FDA de los sustratos usados en el presente estudio (p > 0.05). El sustrato aumentó 14.6 % el contenido de FDA al pasar de cinco a diez días de fermentación sólida. El contenido de FDA en el rastrojo de maíz fue 10.9 % mayor que en el olote y este mostró 10.9 % mayor contenido que el totomoxtle (p < 0.05; **Cuadro II**).

El contenido de hemicelulosa de los sustratos no varió cuando se usó la cepa MR o la P15 de *P. ostreatus*, ni por el tiempo de fermentación sólida (p > 0.05). Además, el rastrojo presentó el menor contenido de hemicelulosa (p < 0.05; **Cuadro II**). Esto porque la hemicelulosa está unida a la lignina y la actividad de las lacasas de *P. ostreatus* favoreció al hidrolizar de la hemicelulosa al hidrolizar parte de la lignina adherida (Machado et al. 2020). Cabe destacar que después del proceso de fermentación sólida, tanto el rastrojo como el totomoxtle disminuyeron su contenido de FDN, FDA y hemicelulosa (**Cuadros I y II**).

Esto se puede atribuir a la actividad enzimática del hongo sobre la pared celular de los sustratos del maíz.

Comportamientos similares entre factores respecto al contenido de FDN, FDA y hemicelulosa (**Cuadros II y IV**) se publicaron en paja de trigo como sustrato y *P. ostreatus* como inóculo en fermentaciones sólidas de hasta 30 días (Shrivastava et al. 2011). Además, se reportaron valores superiores de FDN (813.5 g/kg MS), FDA (507.6 g/kg MS) y hemicelulosa (341.8 g/kg MS) (**Cuadros II y IV**) en fermentaciones de hasta 24 días con paja de cebada como sustrato y *P. ostreatus* como inóculo (Soto-Sánchez et al. 2015).

La variación en los contenidos de los componentes de la pared celular (FDN, FDA y hemicelulosa) después del proceso de fermentación sólida se puede atribuir a la composición de la pared celular del rastrojo, olote y totomoxtle, así como al complejo lignina-carbohidratos estructurales. Esta disminución es una consecuencia de las enzimas producidas por las cepas MR y P15 de *P. ostreatus* durante su crecimiento (Okano et al. 2006).

La interacción que mostró el mayor contenido de cenizas (Ce) y, por consiguiente, la menor cantidad de materia orgánica (MO) fue la fermentación sólida de 10 días usando rastrojo como sustrato y la cepa MR como inóculo (p < 0.05); con un valor superior en Ce e inferior en MO en comparación con el sustrato antes de iniciar la fermentación sólida. Esto indica que la

cepa MR usó los carbohidratos y PC del sustrato para su metabolismo, lo que se reflejó en una disminución de la MO (Akinfemi et al. 2008). Luna et al. (2013) y Soto-Sánchez et al. (2015) publicaron valores inferiores de MO en fermentaciones sólidas de 24 días con paja de cebada como sustrato y *P. ostreatus* como inóculo (Soto-Sánchez et al. (2015), así como en fermentaciones de 8, 16 y 30 d con paja de cebada como sustrato y *P. ostreatus* como inóculo (Luna et al. 2013). Khonkhaeng y Cherdthong (2019) reportaron mayor contenido de MO en fermentaciones sólidas de cinco días en rastrojo de maíz inoculado con *P. ostreatus*.

## CONCLUSIONES

La cepa P15 exhibe la máxima actividad de lacasas cuando se utiliza olote o rastrojo como sustrato en fermentación sólida de cinco días. No se registraron diferencias en la actividad de las celulasas en función del tipo de sustrato o cepa de *P. ostreatus*. Además, se demostró que los subproductos olote y totomoxtle son sustratos efectivos en la fermentación sólida para la producción de extractos enzimáticos de celulasas y lacasas con *P. ostreatus* como inóculo. Asimismo, el contenido de nutrientes en el sustrato experimentó modificaciones significativas a lo largo del tiempo de fermentación.

## REFERENCIAS

- Aguirre-Rivera J.R., Charcas-Salazar H. y Durán-García H.M. (2016). Productividad de elote en Rioverde, SLP, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7 (7), 1563-1573. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i7.150>
- Akinfemi A., Ogunwole O.A., Ladipo M.K., Adu O.A., Osineye O.M. y Apata E.S. (2008). Enhancement of the nutritive value of maize leaf treated with white-rot fungi: *Pleurotus sajur caju* and *Pleurotus pulmonarius*, and the effects on chemical composition and *in vitro* digestibility. *Journal of Production Agricultural Technology* 4 (1), 106-114.
- AOAC (2005). Official methods of analysis. AOAC International, 18ava. ed., Washington, DC, EUA, 1094 p.
- Barrera-Guzmán L.A., Legaria-Solano J.P. y Ortega-Paczka R. (2020). Diversidad genética en poblaciones de razas mexicanas de maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana* 43 (1), 121-128. <https://doi.org/10.35196/rfm.2020.1.121>
- Barrios-González J. y Tarrago-Castellanos M.R. (2017). Solid-state fermentation: special physiology of fungi. En: *Fungal metabolites*. (J.M. Merillon y K.G. Ramawat, Eds.). Springer, Cham., Suiza, pp. 319-347. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_6)
- Brea M.O., Borrás S.L.M. y Rache C.L.Y. (2022). Fermentación en estado sólido como método para reducir factores antinutricionales en la harina de frutos de *Artocarpus altilis*. *Ciencia en Desarrollo* 13 (2), 201-210. <https://doi.org/10.19053/01217488.v13.n2.2022.15506>
- de León C. (2018). El maíz es algo más que tortillas y tamales. *AgroProductividad* 1 (6), 4-8.
- Espejel-García A., Jáuregui G.C.Z. y Hernández M.A. (2020). Caracterización, innovación y competitividad de la producción de elotes en el estado de Jalisco, México. *Económicas Cuc* 41 (2), 49-64. <https://doi.org/10.17981/econuc.41.2.2020.Org.3>
- Fuentes J., Magaña C., Suárez L., Peña R., Rodríguez S. y Ortiz R. B. (2001). Análisis químico y digestibilidad *in vitro* de rastrojo de maíz (*Zea mays* L.). *Agronomía Mesoamericana* 12 (2), 189-192. <https://doi.org/10.15517/am.v12i2.17232>
- Ganash M., Abdel G.T.M., Al Abboud M.A., Alawlaqi M.M., Qanash H. y Amin B.H. (2021). Lignocellulolytic activity of *Pleurotus ostreatus* under solid state fermentation using silage, stover, and cobs of maize. *BioResources* 16 (2), 3797-3807. <https://doi.org/10.15376/biores.16.2.3797-3807>
- García-Alaniz K., Bautista-Villarreal M., Castillo-Hernández S.L. y Báez G.J.G. (2022). Diseño de aderezos empleando harina de olote obtenida como subproducto agrícola. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos* 7, 273-278.
- Gowthaman M.K., Chundakkadu K. y Moo-Young M. (2001). Fungal solid state fermentation - an overview. *Applied Mycology and Biotechnology* 1, 305-352. [https://doi.org/10.1016/S1874-5334\(01\)80014-9](https://doi.org/10.1016/S1874-5334(01)80014-9)
- Jaramillo-Villanueva J. (2018) Evaluación agronómica y sensorial de ocho genotipos de maíz (*Zea mays* L.) para la producción de elote. *AgroProductividad* 7 (6), 47-51.
- Khonkhaeng B. y Cherdthong A. (2019). *Pleurotus ostreatus* and *Volvariella volvacea* can enhance the quality of purple field corn stover and modulate ruminal fermentation and feed utilization in tropical beef cattle. *Animals* 9, 1-17. <https://doi.org/10.3390/ani9121084>
- Knob A. y Cano-Carmona E. (2010). Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: A novel acidophilic xylanase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162, 429-443. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8731-8>
- Kumar S.S., Sczakas G., Soccol C.R. y Pandey A. (2008). Production of enzymes by solid-state fermentation. En: *Current developments in solid-state fermentation* (A. Pandey, C.R. Soccol y C. Larroche, Eds.).

- Springer, Nueva York, EUA, pp. 183-204. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-75213-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-0-387-75213-6_9)
- López-Rodríguez C., Hernández-Corredor R., Suárez-Franco C. y Borrero M. (2008). Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. *Universitas Scientiarum* 13 (2), 128-137.
- Luna L., Meneses M., Mendoza G., Montalvo C. y Loera O. (2013). Efecto y actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus* en pared celular de rastrojo de cebada. *Livestock Research for Rural Development* 25 (12), 1-13.
- Machado E., Pinto P.T.M., Ítavo L.C.V., Agostinho B.C., Daniel J.L.P., Santos N.W., Bragatto J.M., Ribeiro M.G. y Zeoula L.M. (2020). Reduction in lignin content and increase in the antioxidant capacity of corn and sugarcane silages treated with an enzymatic complex produced by white rot fungus. *Plos One* 15 (2), e0229141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229141>
- Márquez A.A.T., Mendoza M.G.D., González M.S.S., Buntins D.S.E. y Loera C.O. (2007). Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. *Interciencia* 32, 780-785.
- Mate D.M. y Alcalde M. (2017). Laccase: A multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial Biotechnology* 10 (6), 1457-1467. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12422>
- Mejía D. (2003). Maize: post-harvest operation. [en línea]. [https://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/inpho/docs/Post\\_Harvest\\_Compandium\\_-\\_MAIZE.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compandium_-_MAIZE.pdf) 12/09/2021
- Membrillo I., Sánchez C., Meneses M., Favela E. y Loera O. (2008). Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology* 99, 7842-7847. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.083>
- Membrillo I., Sánchez C., Meneses M., Favela E. y Loera O. (2011). Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology* 102, 1581-1586. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.091>
- Méndez-Hernández J.E., Loera O., Méndez-Hernández E.M., Herrera E., Arce-Cervantes O. y Soto-Cruz N.O. (2018). Fungal pretreatment of corn stover by *Fomes* sp. EUM1: simultaneous production of readily hydrolysable biomass and useful biocatalysts. *Waste Biomass Valorization* 10, 2637-2650. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0290-1>
- Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31 (3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Noriega G.L.A., Alvarado V.E., Cerca V.A.A., Ramírez R.B. y González G.M.A. (2015). Productividad de elote y rendimiento de forraje en cuatro criollos de maíz rojo. *Memorias. XII Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia*. León, Guanajuato. 13 -15 de mayo, 2015.
- Okano K., Fukui S., Kitao R. y Usagawa T. (2007). Effects of culture length of *Pleurotus eryngi* grown on sugarcane bagasse on *in vitro* digestibility and chemical composition. *Animal Feed Science and Technology* 136, 240-247. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.08.024>
- Okano K., Iida Y., Samsuri M., Prasetya B., Ssagawa T. y Watanabe T. (2006). Comparison of *in vitro* digestibility and chemical composition among sugarcane bagasses treated by four white-rot fungi. *Animal Science Journal* 77, 308-313. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2006.00353.x>
- Olivera-de la Cruz A.R., Ortega-Jiménez E., Díaz-Rivera P., Aranda-Ibáñez E., Ramos-Juárez J. y Mendoza-Martínez G. (2019). Efecto de *Pleurotus ostreatus* en la degradación de los residuos agrícolas. *Agrociencia* 53, 25-33.
- Ortiz-Torres E., López P.A., Gil-Muñoz A., Guerrero-Rodríguez J.D., López-Sánchez H., Taboada-Gaytán R., Hernández-Guzmán J.A. y Valadez-Ramírez M. (2013). Rendimiento y calidad de elote en poblaciones nativas de maíz de Tehuacán, Puebla. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 19 (2), 225-238. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.02.006>
- Park Y.S., Kang S.W., Lee J.S., Hong S.I. y Kim S.W. (2002). Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 761-766. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0965-0>
- Pineda-Insuasti J.A., Ramos-Sánchez L.B. y Soto-Arroyave C.P. (2014). Producción de *Pleurotus ostreatus* por fermentación en estado sólido: una revisión. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar* 48 (2), 13-23.
- Sánchez-Santillán P., Meneses M.M. y Torres-Salado N. (2015a). Production of lignocellulolytic enzymes with *Pleurotus ostreatus*-IE8 by solid fermentation and its effect on the chemical composition of sugarcane bagasse. *Life Science Journal* 12 (2), 37-41.
- Sánchez-Santillán P., Meneses-Mayo M., Miranda-Romero L.A., Santellano-Estrada E. y Alarcón-Zúñiga B. (2015b). Fibrinolytic activity and gas production by *Pleurotus ostreatus*-IE8 and *Fomes fomentarius* - EUM1 in bagasse cane. *Revista MVZ Córdoba* 20 (supl), 4907-4916. <https://doi.org/10.21897/rmvz.6>

- Shrivastava B., Thakur S., Khasa P.Y., Gupte A., Puniya A.K. y Kuhad R.C. (2011). White-rot fungal conversion of wheat straw to energy rich cattle feed. *Biodegradation* 22, 823-831. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9408-2>
- SIAP (2019). Anuario estadístico de la productividad agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [en línea]. <https://nube.siap.gob.mx/cier-reagricola/> 12/06/2021
- SIAP (2021). Anuario estadístico de la productividad agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [en línea] [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/ResumenProducto.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do). 11/08/2021
- Soto-Sánchez A., Ramírez-Bribiesca J.E., Meneses-Mayo M., Loera-Corral O., Miranda-Romero L.A. y Barcena-Gama R. (2015). Effects of *Pleurotus sapidus* (Schulzer) Sacc. treatment on nutrient composition and ruminal fermentability of barley straw, barley rootless, and a mixture of the two. *Chilean Journal of Agricultural Research* 75 (3), 313-319. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392015000400007>
- Van Soest P.J., Robertson J.B. y Lewis B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal Dairy Science* 74 (10), 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Wilson D.B. (2009) Cellulases. En: *Encyclopedia of microbiology* (M. Schaechter, Ed.). Springer, Nueva York, EUA, pp. 252-258. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00138-3>
- Wolfenden B.S. y Willson R.L. (1982). Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 2 (7), 805-812. <https://doi.org/10.1039/P29820000805>
- Zárate-Salazar J.R., Santos M.N., Caballero E.N.M., Martins O.G. y Herrera A.A.P. (2020). Use of lignocellulosic corn and rice wastes as substrates for oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* Jacq.) cultivation. *SN Applied Sciences* 2 (11), 1904. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03720-z>