

Redesign and start up operation a bioreactor at pilot plant scale for solid-state fermentation processes

Nicolino Bracho, Miguel Rondón, Cateryna Aiello
Alexis Ferrer¹ y Arelis López

Laboratorio de Análisis Químico, Departamento de Química
Coordinación de Ciclo Básico, Facultad de Ingeniería.

¹ Laboratorio de Alimentos, Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias
Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo, Venezuela

Abstract

A stainless steel bioreactor was redesigned in order to facilitate the production of microbial protein by solid-state fermentation. A double-helix stirrer was built to replace a blade-stirrer. Mixing time was set at 12 min every two hours. An air-manifold was built and installed at the bottom of the reactor. It allowed uniform bubbling in the water reservoir, providing a continuous flow of saturated air through the biomass. The intermittent mixing provided it a uniform substrate with minimum damage to the mycelial biomass. Along with the saturated air, allowed removal of the metabolic heat produced and prevented formation of dead zones in the biomass. A fermentation with *Trichoderma reesei* QM 9414 on water-treated sugar cane bagasse was carried out to test the operation of the bioreactor. The fermented product reached 7% crude protein at 48 h. A maximum of 10.96% was reached at 96h. This value was much higher than the laboratory value, confirming that the design allows a more efficient fermentation process.

Key words: Bioreactor, solid state fermentations, sugar cane bagasse, microbial protein, *Trichoderma reesei*.

Rediseño y puesta en marcha de un biorreactor a escala piloto para fermentación en estado sólido

Resumen

Se rediseñó un biorreactor en acero inoxidable a fin de adaptarlo para la producción de proteína microbiana por fermentación en estado sólido. Se construyó un mezclador de doble hélice, en sustitución de uno de paletas y se controló el tiempo de mezclado en doce minutos cada dos horas. Se instaló un distribuidor de aire en el fondo del reactor, cuyo diseño permite un burbujeo uniforme en el depósito de agua, garantizando un flujo continuo de aire saturado para toda la mezcla. El mezclado intermitente garantiza la uniformidad del sustrato durante toda la fermentación con el mínimo daño a la biomasa micelial y junto con la entrada de aire saturado permite remover el calor metabólico generado y evita la formación de zonas muertas en la mezcla. A fin de comprobar el funcionamiento del biorreactor, se realizó una fermentación de *Trichoderma reesei* QM 9414, en bagacillo de caña de azúcar tratado con agua como sustrato. A partir de las 48 h. el producto obtenido alcanza contenidos de proteína mayores al 7%, valor este necesario para mantener el consumo voluntario del alimento por los animales. El máximo valor se obtiene a las 96 h y es de 10.96%. Estos valores son superiores a los obtenidos a nivel de laboratorio (6.7%), lo cual

confirma que las adaptaciones y diseños realizados al biorreactor permiten mayor eficiencia en el proceso de fermentación.

Palabras clave: Biorreactor, fermentación en estado sólido, bagacillo de caña de azúcar, proteína microbiana, *Trichoderma reesei*.

Introducción

En Venezuela la irregularidad en los periodos de lluvia durante el año, afecta a las unidades de producción que emplean pastos como fuente principal de alimento de su ganado. Las alternativas para combatir este problema son la conservación de los pastos y el uso de alimentos concentrados, siendo esta última muy costosa. Una alternativa de gran interés y que ha motivado numerosas investigaciones, es el mejoramiento de sustratos de baja digestibilidad y con contenidos de nitrógeno muy bajos, principalmente desechos lignocelulósicos, para convertirlos en sustratos de alta digestibilidad, lo cual aumentaría en forma inmediata y significativa el volumen de tales alimentos disponibles para la nutrición de rumiantes.

Muchos materiales han sido reportados como potenciales sustratos para la producción de proteína y enzimas por procesos de fermentación tanto sumergida como en estado sólido. En Venezuela se producen grandes volúmenes de desechos, residuos y desperdicios, producto de la actividad agrícola y del procesamiento de alimentos, pero su utilización está sujeta a la rentabilidad de su uso en procesos fermentativos frente a otras alternativas. Estudios realizados sobre la disponibilidad y localización de los residuos lignocelulósicos en Venezuela, con miras a lograr nuevas formas de producción de proteína microbiana, enzimas y metabolitos, muestran que los residuos con mayor potencialidad de uso son los follajes de sorgo y de maíz, el bagacillo y bagazo de caña de azúcar [1]. El bagacillo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es un residuo agrícola que contiene más de 30% de celulosa [2] y puede encontrarse en abundancia en varias regiones del país. Así por ejemplo, se estimó que para 1987-1988 se generaron alrededor de 2.300.000 toneladas métricas de bagazo y 600.000 toneladas métricas de bagacillo de caña de azúcar en nuestro país [1].

La fermentación en estado sólido (FES), presenta grandes ventajas en relación con la fermentación sumergida [3, 4, 5, 6, 7] y con las técnicas convencionales ya aplicadas y que se basan en la

agricultura [8], pues no está sujeta a las variaciones climáticas. Los espacios utilizados son muy reducidos, permitiendo controlarlos de manera efectiva y el producto final puede ser usado directamente o ser incorporado como suplemento al alimento de los animales.

Se han diseñado muchos equipos para realizar los cultivos sólidos, tanto para escala de laboratorio como para escala piloto [3, 4, 9, 10, 11, 12], sin embargo en el campo de la Bioingeniería de las fermentaciones en estado sólido existe poca información y no se conocen principios generales ni reglas establecidas y aceptadas para la construcción de biorreactores [13]. Cada sistema sustrato-microorganismo requiere de un diseño y condiciones de ingeniería específicos. Tanto el diseño como los criterios de escalamiento se basan en estudios de transferencia de calor y masa y principalmente en resultados y experiencias acumuladas de las investigaciones realizadas en fermentaciones en estado sólido tomando como base, algunas de las normas de diseño de equipos de fermentación sumergida. Este trabajo presenta una alternativa que puede aumentar de forma inmediata y significativa el volumen de alimentos energéticos disponibles para la alimentación de rumiantes.

Parte Experimental

Diseño del Biorreactor

La Figura 1 muestra el esquema del biorreactor original, con una capacidad de dos kilos de bagazo seco (10 litros). Este equipo fue diseñado por Ferrer y col. [2], a partir de las dimensiones de la columna de vidrio recomendada por Raimbault y col. [4] y utilizada para las fermentaciones en estado sólido a escala de laboratorio [6, 7]. A este diseño original del biorreactor se le realizaron modificaciones, las cuales se detallan a continuación y que se muestran en la Figura 2.

Diseño y construcción del mezclador

Se diseñó y construyó un mezclador tipo helicoidal tomando como referencia el prototipo

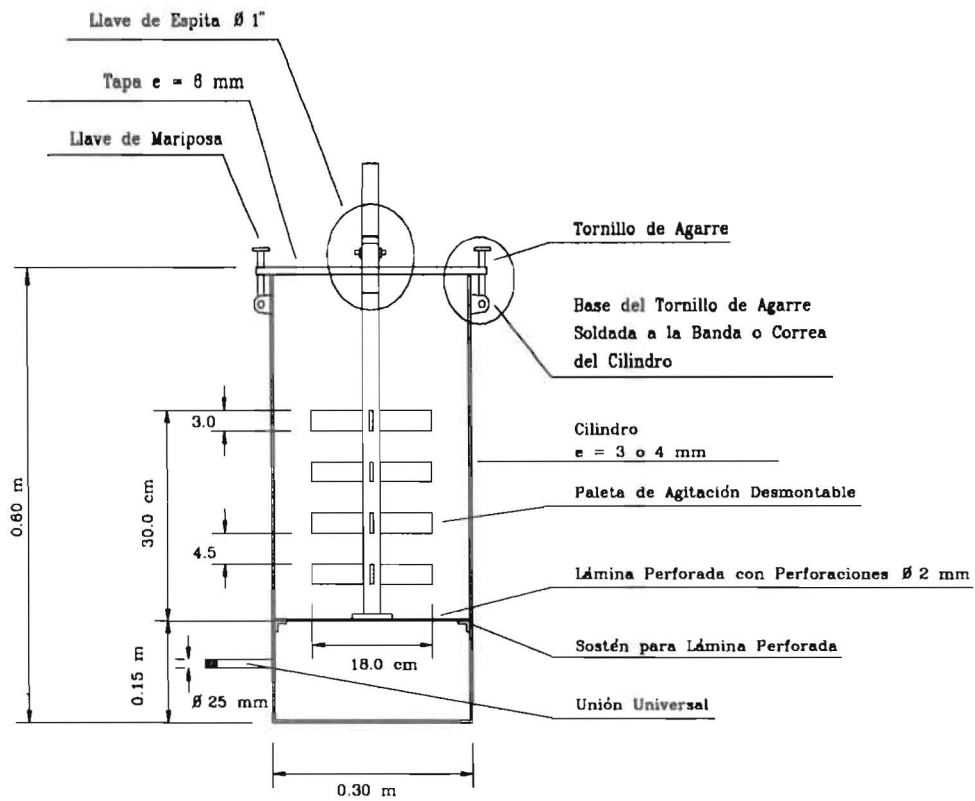


Figura 1. Vista frontal del biorreactor original.

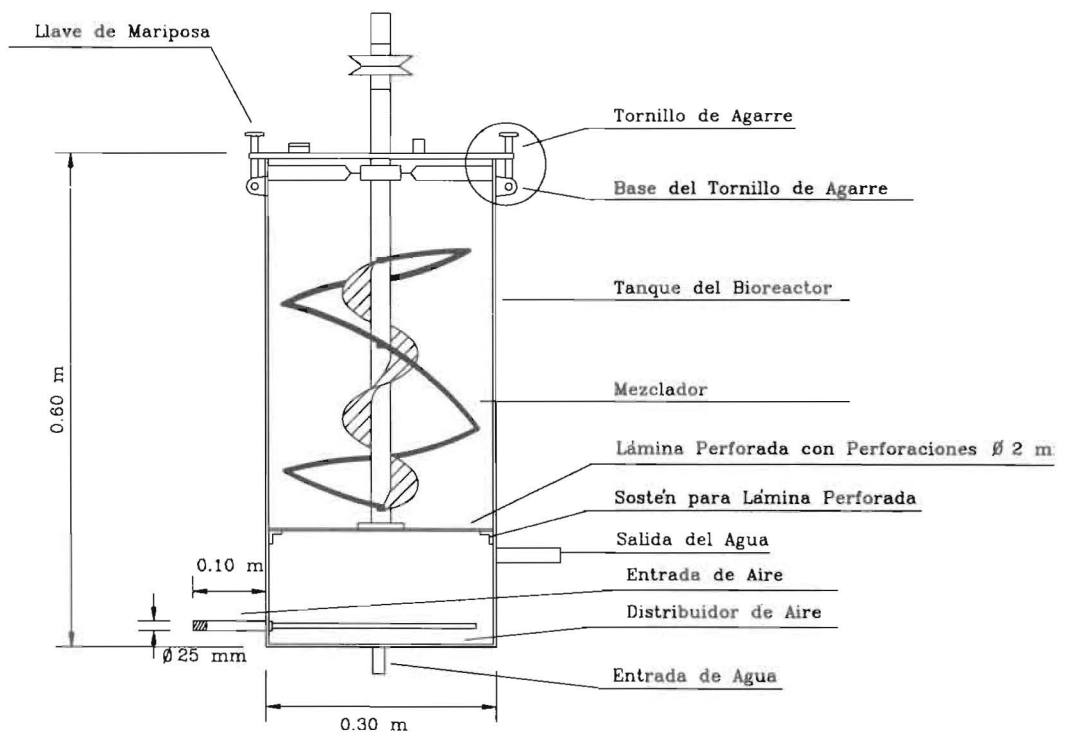


Figura 2. Vista frontal del biorreactor modificado.

propuesto por Tengerdy [9], ya que el movimiento generado por éste permite homogeneizar el material, sin ocasionar ruptura del micelio del hongo. La Tabla 1 muestra las dimensiones obtenidas para el mezclador, luego de la aplicación de las ecuaciones y cálculos recomendados para tal fin [14].

Con estos parámetros, se procedió a la construcción de las superficies helicoidales, con una lámina de acero inoxidable 316, calibre 3 mm, la cual es cortada en forma circular en el torno, hasta obtener un anillo plano con las dimensiones requeridas. Se estira el anillo una longitud igual al paso de la hélice, generándose así una vuelta de superficie helicoidal. Luego se unen las superficies helicoidales al eje mediante soldadura. Se utilizó como eje un tubo cilíndrico de acero inoxidable 316 con un diámetro interno de 1 1/4" (3.175 cm).

Tapa del biorreactor

Se construyó una tapa de acero inoxidable 316 de 0.5 cm de espesor y 32 cm de diámetro. Se colocó una válvula de seguridad de 1/4" (0.635 cm) de diámetro y 5 atm para alivio de presión y una válvula de bola de 1" (2.54 cm) para la toma de la muestra.

Soporte del sustrato

Como soporte del sustrato se construyó una bandeja en acero inoxidable 316 con espesor de 3 mm (0.3 cm) y un diámetro de 30 cm con perforaciones de 2 mm (0.2 cm) de diámetro para permitir la entrada del aire. Se le colocó en el centro un rodamiento con un soporte para garantizar que el mezclador esté centrado y facilitar su rotación. Se colocó una empacadura en el borde de la bandeja para evitar el paso del bagacillo hacia el depósito de agua.

Entrada y salida de agua

En el biorreactor original la cantidad de agua necesaria para la saturación del aire era suministrada por carga al inicio de la fermentación, y para retirarla, era necesario desarmar el equipo. Se modificó el diseño para permitir la entrada y salida de agua al depósito en cualquier tiempo durante la fermentación. Se instaló un sistema que consta de tuberías galvanizadas de 1/2" (1.27 cm) de diámetro y una válvula de bola para controlar el flujo de entrada.

Tabla 1

Dimensiones del Mezclador Helicoidal (V_T : velocidad tangencial, V_A : Velocidad axial, V_R : Velocidad resultante, A_t : área transversal, Q : caudal arrastrado, D_e : Diámetro externo, D_i : Diámetro interno)

Parámetros	Hélice Externa	Hélice Interna
V_T (cm/s)	7.33	4.25
V_A (cm/s)	1.50	1.50
V_R (cm/s)	7.48	4.51
A_t (cm ²)	163.36	176.46
Q (cm ³ /s)	1222.29	1222.29
D_{ext} (cm)	28.00	16.24
D_{int} (cm)	24.00	6.25

Distribuidor de aire

Se diseñó y construyó un distribuidor de aire, en tubo de cobre de 1/4" (0.635 cm) de diámetro con perforaciones de 1/16" (0.159 cm) de diámetro, que permite la entrada uniforme de aire al biorreactor, garantizando su saturación en todo momento.

Panel de control

Se encuentra colocado a la derecha del biorreactor y consta de los siguientes componentes:

- Indicador de temperatura, marca Venetrol, conectado con una termocupla ubicada dentro del eje del mezclador, la cual registra la temperatura durante la fermentación.
- Rotámetro, marca Gilmont, que permite regular la cantidad de aire de entrada.
- Interruptor horario, para fijar el tiempo de arranque y mezclado al motor del biorreactor. Se fijó un tiempo de arranque de 2 horas y un tiempo de mezclado de 12 minutos. Al finalizar el tiempo de mezclado, el motor se detiene y arranca nuevamente al cabo de 108 minutos.
- Interruptor para encendido/apagado del equipo, para encender o apagar el equipo con todos sus instrumentos eléctricos. Hace posible no tener que desconectar el equipo cuando éste se encuentre fuera de servicio.
- Interruptor automático / manual del motor, que cumple dos funciones, en posición manual para arrancar el motor, homogenizar la

mezcla y tomar muestras cuando el biorreactor no se encuentra en su período normal de mezclado; en posición de automático, cuando se quiere que el motor del mezclador arranque de acuerdo con el tiempo que se le haya fijado con el interruptor horario.

- F. Válvula de bola, para regular el flujo de entrada de agua al biorreactor durante la fermentación.

Motor

Para el funcionamiento del mezclador se seleccionó un motor que cumpliera con los requerimientos del sistema. Se calculó la potencia mínima de trabajo, la velocidad de salida y el torque [14]. La fermentación requiere una velocidad máxima de mezclado de 50 rpm para evitar la ruptura del micelio y lograr un crecimiento óptimo del microorganismo. Se seleccionó un motor de 100 rpm reduciendo a la mitad la velocidad a través de un sistema de poleas.

Puesta en marcha del Biorreactor

Se realizaron pruebas preliminares para comprobar el funcionamiento del equipo y sus accesorios. Para ello, se cargó el biorreactor con dos kilogramos de bagacillo húmedo, se accionó el interruptor de encendido manual del motor y se comprobó el funcionamiento del mezclador. Se calibró el interruptor horario para que encendiera el motor y proporcionara un mezclado intermitente por doce minutos cada dos horas. Se comprobó el funcionamiento del sistema con el interruptor de encendido automático. Posteriormente se realizaron dos fermentaciones para comprobar la eficiencia en la producción de proteína microbiana.

Sustrato

El sustrato utilizado es bagacillo de caña de azúcar tomado de un mismo lote, proveniente del Central Azucarero "El Palmar", ubicado en el Estado Aragua. El bagacillo de caña de azúcar se sometió a un tratamiento acuoso, a la relación líquido/sólido de 5 durante 30 minutos [7].

Microorganismo

El microorganismo utilizado en este estudio fue el hongo *Trichoderma reesei* QM 9414. Como medio de mantenimiento se utilizó agar papa con 0.025% de glucosa [15] en botellas con el agar en

forma de cuña. A 28°C el hongo cubre la superficie del agar con esporas de color verde en tiempos de 3-5 días. A fin de lograr una abundante esporulación, se siguió el procedimiento recomendado por Aiello [7] en floras de 250 ml con 70 g de arroz previamente lavado, escurrido y esterilizado a 121°C por 20 minutos.

Medio mineral

El medio mineral utilizado en las fermentaciones fue el recomendado por Mandels y Weber [16].

Preparación del inóculo

El inóculo para las fermentaciones fue de 10^7 esporas por gramo de bagacillo. La cantidad de suspensión de esporas para inocular se pasó a medio mineral, para provocar su germinación y se incubaron a 28°C y 150 rpm de agitación. El tiempo de germinación, determinó mediante observaciones en el microscopio y tomándose como criterio que la longitud de la hifa formada sea aproximadamente igual al diámetro de la espora [17].

Fermentaciones

Se realizó una fermentación y su respectivo duplicado. Ambas se realizaron con una relación Carbono/Nitrógeno de 10, utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La cantidad de medio mineral por gramo de sustrato, se calculó utilizando el valor de humedad de saturación del sustrato. La humedad de saturación del sustrato se consideró como la humedad inicial del medio sólido. Una parte del medio mineral se utilizó como medio de germinación de las esporas y la cantidad de sulfato de amonio necesaria para la relación C/N se disolvió en el medio mineral restante. El sustrato sólido inoculado se transfirió al biorreactor y una vez empacado el equipo se dejó durante cinco días, suministrando aire saturado a razón de 12-20 L/min y manteniendo la temperatura en un rango (28 - 30) °C.

Tratamiento de las muestras

Se tomó una muestra cada 12 horas, la cual consistió en tomas de material del reactor después de ser agitado. Previo a los análisis, la muestra se colocó en un recipiente y se uniformizó con ayuda de una varilla de vidrio. El contenido de humedad se determinó mediante el uso de 1 g de muestra y

la balanza Ohaus, Scale Corp. Modelo 6010. El pH se midió en una suspensión de 5 g de material sólido en 50 ml de agua destilada [4]. Se lavaron 20 g de la muestra con buffer citrato de sodio, 0,05 M y pH 4,8, recuperando los sólidos por filtración y se determinó la actividad enzimática de celulasa. La actividad enzimática se midió por el método del papel de filtro [18] utilizando el reactivo del ácido dinitrosalicílico modificado [19, 20] para cuantificar los azúcares reductores por la reacción entre la celulasa y el papel de filtro, usando glucosa como patrón a 585 nm. Una unidad de papel de filtro (UPF) de actividad enzimática es equivalente a 0,25 mg de glucosa producidos a las condiciones del método, 50°C y una hora de incubación. Toda la muestra sólida se reunió y se lavó con agua destilada para eliminar el nitrógeno inorgánico remanente, se secó a 60°C durante 12 horas y posteriormente se le determinó el contenido de nitrógeno utilizando el método Kjendahl. El porcentaje de proteína se estimó como el porcentaje de nitrógeno multiplicado por 6,25.

Resultados y Discusión

El mezclador de doble hélice diseñado permite el mezclado uniforme del sustrato, minimizando la formación de zonas muertas a los lados de las paredes del biorreactor. Se pudo observar una vez desmontado el equipo, que en las paredes y fondo se adhiere una delgada capa de bagacillo a consecuencia de la presión ejercida sobre el sólido que se encuentra entre la pared y el fondo del biorreactor y el mezclador. Se conoce que la agitación mecánica afecta la biomasa micelial y por consiguiente el rendimiento del producto final. Sin embargo, al controlar el tiempo de mezclado en forma

intermitente, doce minutos cada dos horas, el movimiento generado proporciona homogeneidad al sustrato, evitando daños al micelio del hongo.

El distribuidor de aire diseñado proporciona un burbujeo uniforme en el depósito de agua garantizando la saturación del aire en todo momento. El aire saturado permite mantener la humedad del sustrato y la temperatura durante el proceso de fermentación.

La Tabla 2 presenta los resultados de las pruebas de homogeneidad realizadas durante la fermentación. Para estas pruebas se tomaron tres muestras diferentes para un mismo tiempo de fermentación. Las pruebas se realizaron a las 72 y 84 horas. Se observa que la humedad es la misma (76%) para las tres muestras en cada tiempo. Los valores de pH no muestran una variación significativa. Durante el proceso de fermentación, la temperatura se mantuvo constante dentro del rango óptimo necesario para el crecimiento del microorganismo (27-30°C), esto se logra manteniendo constante el flujo de aire saturado en 12 L/min.

En la Figura 3 se observa el comportamiento del pH durante la fermentación, el cual disminuye progresivamente desde un valor inicial de 5,96 hasta 3,73. El rango óptimo de pH para el crecimiento del hongo es de 4-5 [15], este se alcanzó entre las 24-36 horas. Este comportamiento del pH se observa también en las fermentaciones realizadas a escala de laboratorio [7].

La humedad de saturación del sustrato no varía considerablemente y los valores oscilan alrededor de la humedad de saturación del sustrato (76%) tal como se muestra en la Figura 3. El valor de la humedad de saturación para el bagacillo tratado con agua está en el orden del obtenido para

Tabla 2
Pruebas de Homogeneidad

Tiempo (h)	Muestras	% de Humedad	pH
72	1	76	3.81
	2	76	3.74
	3	76	3.74
84	1	75.5	3.80
	2	75.5	3.76
	3	75.5	3.75

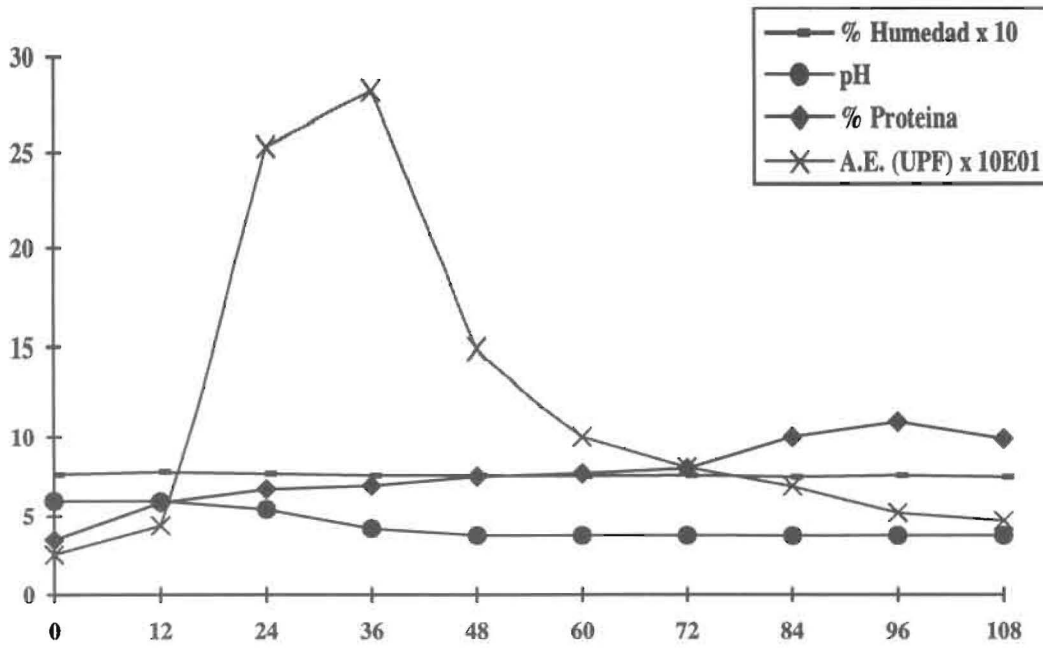


Figura 3. Cinética de la fermentación de bagazo de caña de azúcar.

Tabla 3
Comparación de la Producción de Proteína a Escala de Laboratorio y Piloto
(* Datos tomados de Aiello, C., 1992)

Tiempo (h)	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
% Proteína * Escala Laboratorio	3.63	-	5.31	-	6.88	-	6.50	-	6.25	-	5.31
% Proteína Escala Piloto	3.48	5.85	6.72	6.94	7.52	7.72	8.03	9.99	10.94	9.87	-

el bagacillo sin tratar (76%) lo cual indica que el humedecimiento con agua no produce cambios sustanciales en el bagacillo que originen disminución en la capacidad de retención de agua.

La actividad enzimática alcanza un valor máximo de 2.82 UPF a las 36 horas. Si se compara este valor con el obtenido por Aiello [7] de 1.65 UPF al quinto día de fermentación en columnas de vidrio con el mismo sustrato y microorganismo se observa un incremento del 70%, demostrando así que la fermentación en este biorreactor es más productiva y en menor tiempo. La producción de proteína incrementa a medida que progresa la fermentación. El máximo valor se obtiene a las 96 h y es de 10.94%, sin embargo a partir de las 48h el producto alcanza contenidos de proteína mayores al 7%, valor este necesario para mantener el consumo voluntario de alimento por el animal [21,22]. La Tabla 3 presenta una comparación entre los valores de producción de proteína a escala de laboratorio

[7] y los obtenidos en este trabajo. Se observa que a partir de las 12 h de fermentación los valores obtenidos en el biorreactor superan a los obtenidos a escala de laboratorio, lo cual indica que la fermentación dinámica, con mezclado intermitente favorece la producción de proteína.

Conclusiones

El mezclador de doble hélice permite la mezcla uniforme del sustrato, minimizando las zonas muertas en los lados de las paredes del biorreactor.

El tipo de mezclado intermitente no afecta el crecimiento del hongo durante la fermentación.

La actividad enzimática es mayor en comparación a los valores obtenidos a escala de laboratorio y el incremento corresponde al 70%. El máximo de actividad enzimática se alcanza a las 36 horas de fermentación.

El producto obtenido de las fermentaciones en el biorreactor alcanza contenidos protéicos mayores al 7%, valor este necesario para mantener el consumo voluntario de alimento por los animales.

Las adaptaciones, diseño y modificaciones realizadas al biorreactor permiten alcanzar niveles de producción de proteína superior a los alcanzados a escala de laboratorio.

Agradecimiento

Este trabajo fue financiado parcialmente por la Empresa Jiménez Segura y Asociados y por el CONICIT a través de la Comisión Nacional de Ingeniería Genética y Biotecnología, bajo el Proyecto CNIGB-4.

Referencias Bibliográficas

1. Alvarez, M., Ramírez, M. y Carrizales, V. "Primer Informe Técnico Sobre la Disponibilidad de Residuos Lignocelulósicos en Venezuela". Programa Regional de Biotecnología para América Latina y el Caribe. Comisión Nacional de Ingeniería Genética y Biotecnología. Proyecto "Degradación Enzimática de Residuos Agroindustriales" (1988).
2. Ferrer A., Aiello C., Ledesma A., Zabala I. y Palmar J. "Primer Informe Técnico Proyecto CONICIT CNIGB-4. Degradación Enzimática de Residuos Lignocelulósicos: Su Utilización en la Producción de Enzimas y Bioproteínas". (1990).
3. Durand A. and Chereau D. "A New Pilot Reactor for Solid State Fermentation Application to the Protein Enrichment of Sugar Beet Pulp". *Biotechnology and Bioengineering*, N° 31 (1988), 476-486.
4. Rimbault M. y Alazard D. "Culture Method to Study Fungal Growth in Solid Fermentation". *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. (1980) 199-209.
5. Madamwar D., Patel S. and Parikh, H. "Solid State Fermentation for Cellulases and β -glucosidase" Production by *Aspergillus niger*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. N° 67 (1989), 424-426.
6. Bravo O., Ferrer A., Aiello C., Ledesma A. and Dávila M. "Growth of *Chaetomium cellulolyticum* in Solid State Fermentation of Sugar Cane Bagasse Treated with Water and Alkali at Several Liquid/Solid Ratios". *Biotechnology Letters*, Vol. 16, N° 8 (1994), 865-870.
7. Aiello, C. "Producción de Proteína Microbiana por Fermentación en Estado Sólido de Bagacillo de Caña de Azúcar". Universidad del Zulia. Facultad de Ingeniería. División de Postgrado. Magister en Ingeniería Química. (1992) (Trabajo Especial de Grado).
8. Ferrer A., Aiello C., Bravo O., Ledesma A., Zabala I. y Dávila M. "Utilización de residuos de cosecha y subproductos agrícolas en la producción de alimentos para animales ruminantes" *Revista de Agronomía (LUZ)*, Vol. 11, N° 2 (1994), 207-223.
9. Tengerdy, R. "Solid Substrate Fermentation". *Trends in Biotechnology*. Vol. 3, (1985) 96-99.
10. Chisty, Y y Moo-Young, M "Slurry Bioreactor Design for Shear-Sensitive Mycoprotein Production". E. Galindo and O.T. Ramirez (eds). *Advances in Bioprocess Engineering* (1994) 25-28.
11. Laukevics, J. J., Apiste, A. F., Viestrus, U. S. y Tengerdy, R. P. "Steric Hindrance of Growth of Filamentous Fungi in Solid Substrate Fermentation of Wheat Straw". *Biotechnology and Bioengineering*, 27 (1985) 1687-1691.
12. Carrizales V., Jaffe W., "Solid State Fermentation an Appropriate Biotechnology for Developing Countries". *Interciencia* N° 2 (1986), 9-15.
13. Viestrus, U. E y Leite, M. P. "Physiological and Technico-Engineering Aspects of Lignocellulose Solid-State Fermentation with Filamentous Fungi". E. Galindo and O.T. Ramirez (eds). *Advances in Bioprocess Engineering* (1994) 81-86
14. Bracho, N. y Rondón, M. "Rediseño, construcción y puesta en marcha de un biorreactor para fermentación en estado sólido de bagacillo de caña de azúcar". Universidad del Zulia. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química. (1995) (Trabajo Especial de Grado).
15. Ferrer, A. "Producción de Celulasa y Biomasa del Bagazo de Caña de Azúcar" *Ciencias*, Vol. 1, N° 1 (1984), 129-135.

16. Mandels M. y Weber J. "The Production of Cellulases" *Advances Chemical Series*. N° 95 (1969), 391-414.
17. Gutiérrez R. *Curso de Fermentaciones en Medio Sólido. Biotecnología para el Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales. X Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica. Universidad Católica de Valparaíso, Chile 3-6 de Octubre, 1989.*
18. Mandels M., Andreotti R. y Roche Ch. "Measurement of Saccharifying Cellulase" *Biotechnology and Bioengineering*. N° 6 (1976), 21-33.
19. Griffin H. L. "Filter Paper Assay- Effect of Time and Substrate Concentration on Cellulase Activity" *Analytical Biochemistry*. N° 56 (1973), 621-625.
20. Miller G., "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar" *Analytical Chemistry*. N° 31 (1959), 59-64.
21. Milstein, O., Vered, Y., Sharma, A., Gressel, J. and Flowers, H. "Fungal Biodegradation and Biotransformation of Soluble Lignocarbhydrate Complexes from Straw" *Applied Microbiology*. N° 46 (1983), 55-61.
22. Osuna D. R., Ventura, M. y Urdaneta, M. *Evaluación Bromatológica de Henos Elaborados en la Zona de "El Laberinto". Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Maracaibo, (1989).*

Recibido el 5 de Marzo de 1996

En forma revisada el 17 de Enero de 1997