



Departamento de Ingeniería bioquímica

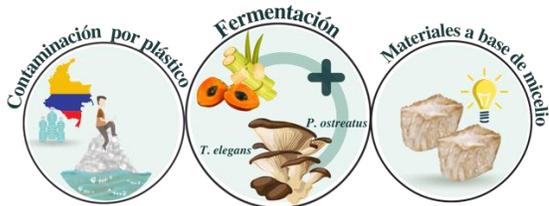
Universidad Icesi

De residuos a material de embalaje biodegradable: acoplado la biomasa residual agroindustrial del Valle del Cauca con el crecimiento micelial

María Camila Rodríguez, Isabel Fernanda Enríquez, Andrés Ceballos, Carlos Andrés Álvarez^a

Departamento de Ingeniería Bioquímica, Universidad ICESI, Santiago de Cali, Colombia.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Palabras clave:
Micelio fúngico
Biomaterial
Embalaje
Pleurotus ostreatus
Trametes elegans

ABSTRACT

Los materiales de empaque y embalaje de un solo uso presentan un gran impacto ambiental dada la cantidad de residuos generados y el considerable gasto energético durante su producción industrial. Como alternativa se encuentran los materiales biobasados obtenidos al cultivar el micelio de hongos sobre residuos lignocelulósicos. El presente proyecto está dirigido a crear un prototipo de material biodegradable, mediante el crecimiento de micelio de *Pleurotus ostreatus* y *Trametes elegans* en biomasa residual de cáscaras chontaduro y bagazo de caña de azúcar del Valle del Cauca, con potencial para reemplazar empaques plásticos. Para ello, se realizaron fermentaciones en estado sólido evaluando la cantidad de sustrato: 40 g y 20 g en proporción 1:1 y la cepa utilizada, esto con el fin de determinar cuáles son los más influyentes para el aumento de biomasa micelial. Los prototipos de materiales mostraron distintas propiedades asociadas a la densidad de crecimiento micelial y el grado de unión interfacial micelio-sustrato, asimismo la cantidad de sustrato de la matriz sólida influyó en el grado de colonización de la mismo. Los materiales obtenidos a partir de *P. ostreatus* demostraron ser poco resistentes al aplicar presión manual y presentaron una superficie firme y rugosa; sumado a esto, su baja densidad los convierte en potenciales aislantes térmicos. Contrariamente, los materiales a base de *T. elegans* resisten en mayor medida a la deformación manual y presentan cierto grado de flexibilidad, lo que sugiere que tendrían potencial aplicación como materiales de embalaje para productos electrónicos o como envases para alimentos.

1. Introducción

En Colombia los plásticos de uso único como empaques y embalajes corresponden aproximadamente al 56% del consumo total de plásticos [1]. Los materiales de

embalaje industrial estándar actuales son el poliestireno extruido y las espumas de polietileno expandido que tienen varias desventajas en cuanto al uso de productos químicos derivados del petróleo para su fabricación, el alto consumo de energía durante su producción y la

contaminación del medio ambiente debido a su difícil degradación en el sistema ecológico [2]. En adición, la acumulación de estos residuos generan condiciones irreversibles de destrucción del paisaje y de sus componentes bióticos, abióticos y humanos [3]. Por esta razón, los intentos enfocados en disminuir el uso de plásticos y mitigar su impacto han dado lugar al desarrollo de materiales biobasados y biodegradables.

De esta manera, como alternativa reciente surgen los materiales basados en micelio, los cuales se producen al cultivar la parte vegetativa de los hongos sobre sustratos orgánicos sólidos. El crecimiento ocurre mediante la secreción de enzimas con actividad redox como las lacasas y peroxidasas que degradan la biomasa lignocelulósica. Después de la colonización del sustrato el material se calienta para inactivar al organismo y eliminar la humedad [4]. El resultado es un compuesto ligero que consiste en una red entrelazada tridimensional de fibras de refuerzo naturales presentes en la materia prima y células miceliales [5] que actúan como aglutinante natural. Debido a su composición estos materiales pueden degradarse naturalmente después de su uso, lo que permite un modelo de producción completamente circular brindando así soluciones resilientes, eficientes y rentables a los desafíos ambientales actuales.

Investigaciones previas han demostrado el potencial del micelio de hongos filamentosos para producir materiales de empaque y embalaje a partir de residuos agrícolas que pueden llegar a tener características como baja densidad, resistencia al impacto y baja conductividad térmica [6]. Estas propiedades se pueden ver afectadas por una serie de factores como: la especie del hongo, la densidad micelial, el período de cultivo, la humedad presente en el compuesto, suplementación y tipo de sustrato [7]. Residuos lignocelulósicos como el aserrín de haya, la paja de colza, el aserrín de roble rojo, la paja de trigo, fibras de algodón, y virutas de pino, entre otros [5,8,9,10] han sido empleados como sustratos para la producción de estos materiales. Pese a que se han realizado estudios limitados sobre cómo las características del material se alteran con la cepa fúngica utilizada, estos apuntan a una importante correlación entre la naturaleza (filogenética) y las propiedades mecánicas [11]. Por ejemplo, *Pleurotus ostreatus* ha sido explorado en mayor medida para la producción de dichos materiales en diferentes aplicaciones, pues estos han demostrado ser más rígidos y resistentes en comparación a los obtenidos con otras especies [11].

Ahora bien, el crecimiento de biomasa fúngica sobre residuos agroindustriales para la obtención de este tipo de materiales se ha estudiado en diferentes países del mundo, principalmente Estados Unidos. Sin embargo, la aplicabilidad y practicidad de estos están en gran parte inexploradas, puesto que los estudios individuales utilizan

una amplia gama de diferentes procedimientos experimentales no estandarizados, y hasta el momento no se ha llevado a cabo desde un enfoque experimental la producción de dichos materiales a partir de residuos de cáscaras de chontaduro (*Bactris gasipaes*) y bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) como sustratos. Así mismo, los hongos endófitos extraídos de numerosas fuentes vegetales y con actividad celulolítica representan un recurso biológico poco investigado en la obtención de estos materiales. En este sentido, es importante adelantar estudios dirigidos a aprovechar el potencial biotecnológico de los hongos filamentosos y endófitos de Colombia, dado que el uso de cepas nativas no ha sido explorado en esta línea de investigación.

Este trabajo tiene como objetivo crear un prototipo de material biodegradable mediante el crecimiento de micelio de *Pleurotus ostreatus* y *Trametes elegans* en biomasa residual de chontaduro y bagazo de caña de azúcar del Valle del Cauca, con potencial para reemplazar los empaques plásticos. Para ello, se estudió la variación de factores influyentes en el crecimiento de biomasa micelial, la cepa y la cantidad de sustrato que forma la matriz sólida. De esta forma, se busca estandarizar una metodología que sea útil para procesos de fabricación de materiales a base de micelio y que a su vez, permita el aprovechamiento de materias primas de desecho.

2. Materiales y métodos

2.1. Cepa y condiciones de cultivo

Las cepas de *Pleurotus ostreatus* y *Trametes elegans* (ET-06) utilizadas pertenecen a la colección del laboratorio de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Icesi. Los cultivos madre de ambas cepas se mantuvieron en un agar dextrosa de papa (PDA).

El medio para las semillas se preparó utilizando granos de trigo (*Triticum*) con la cantidad necesaria de acuerdo al diseño experimental (véase Tabla 2), buffer fosfato 0,5 M pH 5 y fue suplementado con glucosa 5 g/L (véase Tabla 1), se añadió a cajas de petri de vidrio cuyo tamaño dependía de la cantidad de trigo a añadir, se sellaron y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min. Posteriormente, se dejaron enfriar las cajas estériles y se inocularon asépticamente. Para esto, se añadió 1 mL de solución Tween 80 en cada caja petri colonizada con la respectiva cepa para facilitar la remoción del micelio con un asa estéril y se extrajo la solución con micelio de la superficie en tubos plásticos eppendorf.

Cada semilla se inoculó con 200 uL de la suspensión con micelio. Las cajas se incubaron a 28 ± 3 ° C a 90 rpm durante 12 días. Tiempo que tardó la semilla en grano en ser colonizada completamente por el hongo.

Tabla 1

Composición de las semillas

Tratamiento	Especie de hongo	Trigo [g]	Buffer pH 5 [mL]	Glucosa [g]
1 y 5	<i>Pleurotus ostreatus</i>	6	15	0,075
2 y 6	<i>Pleurotus ostreatus</i>	3	7,5	0,0375
3 y 7	<i>Trametes elegans</i>	6	15	0,075
4 y 8	<i>Trametes elegans</i>	3	7,5	0,0375

2.2. Residuos lignocelulósicos

Los sustratos utilizados fueron residuos agroindustriales del Valle del Cauca, particularmente polvillo húmedo de bagazo y cáscaras de chontaduro. Estas últimas se obtuvieron de la empresa Frudelpa, especializada en la producción y distribución de frutos del pacífico colombiano. Por su parte, el polvillo húmedo de bagazo de caña de azúcar se obtuvo de PROPAL S.A., empresa productora de papel ubicada en Yumbo, Valle del Cauca. Se trató especialmente con las fibras resultantes de la etapa de depuración.

2.3. Preparación del sustrato

Las cáscaras de chontaduro se secaron en un horno de convección BINDER FD 115 utilizando una escala de temperatura. Durante la primera y segunda hora se secaron a 60°C y 70°C, respectivamente. Después de la tercera hora las cáscaras se dejaron a 80°C hasta que alcanzaran una humedad cercana al 5%. Las cáscaras secas se molieron en un molino CM-20,000 y se pasaron por una criba de 2 mm para obtener un polvo fino de cáscaras. El polvillo húmedo de bagazo de caña no tuvo ningún pretratamiento. Ambos sustratos se transfirieron a moldes de aluminio con dimensiones de 13, 11 y 4 cm de largo, ancho y profundidad, respectivamente (véase Figura 2). Se realizó la medición de la humedad inicial en una termobalanza y posteriormente se añadió buffer fosfato 0,5 M pH 5 hasta la humedad deseada.

Los moldes con los residuos lignocelulósicos se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min.

2.4. Fermentación en estado sólido

Los tratamientos se inocularon introduciendo y dispersando uniformemente la semilla en grano de 15 % del peso del sustrato [12]. Los moldes se cubrieron con papel film y se incubaron en neveras de poliestireno expandido a oscuridad durante 10 días a 28 °C y con una

humedad relativa de un 70-80%. Se instaló un humidificador con solución salina estéril con el fin de mantener húmedo el ambiente.

Se realizó una segunda etapa de crecimiento. Para esto todas las muestras se extrajeron del molde y se invirtieron de posición, se dejaron crecer por 10 días más en las condiciones iniciales ya descritas con el fin de favorecer la transferencia de oxígeno y así, el crecimiento del hongo sobre la superficie no colonizada.

2.5. Diseño experimental

Con el fin de establecer el protocolo y condiciones de operación favorables para el crecimiento de biomasa micelial en los residuos de interés para obtener un material pre moldeado, se evaluó la variación de la especie de hongo y la altura de sustrato en el molde (véase Tabla 2). Como factores controlables se definieron el porcentaje de cada sustrato en la mezcla, la humedad de esta y la cantidad de inóculo, y como variable de respuesta las características finales cualitativas del material.

Tabla 2

Matriz de diseño experimental

Tratamiento	Especie de hongo	Altura [cm]	Sustrato	Humedad [%]	Inóculo [%]
1 y 5	<i>P. ostreatus</i>	1,5	40 g Mezcla 1:1	79% 135 mL buffer	15
2 y 6	<i>P. ostreatus</i>	0,75	20 g Mezcla 1:1	79% 67,5 mL buffer	15
3 y 7	<i>T. elegans</i>	1,5	40 g Mezcla 1:1	79% 135 mL buffer	15
4 y 8	<i>T. elegans</i>	0,75	20 g Mezcla 1:1	79% 67,5 mL buffer	15

2.6. Secado y medición de la humedad del material

Finalizado el período de crecimiento, los materiales con nivel alto de altura de sustrato se secaron durante 2,5 horas y los de nivel bajo durante 2 horas, a 135 °C en un horno de convección BINDER FD.

Posteriormente, cuando el material se encontraba a temperatura ambiente se realizó la medición de la humedad en una termobalanza.

2.7. Caracterización cualitativa

Por último, se realizó una revisión cualitativa (consistencia, textura, color, olor, uniformidad) de los prototipos de material obtenidos.

3. Resultados y discusión

Después de 12 días de incubación, el micelio coloniza todo el sustrato disponible en la semilla como se muestra en la figura 1.

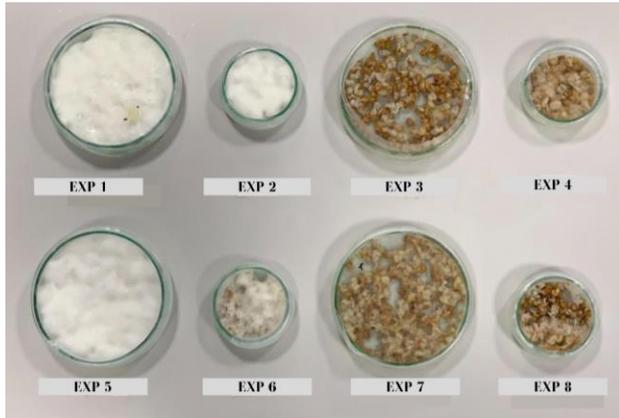


Fig. 1. Semillas en grano de trigo.

El sustrato en la semilla tiene gran influencia sobre el crecimiento del micelio de hongos filamentosos. Inicialmente, se hicieron ensayos previos directamente sobre cáscaras de chontaduro, sin embargo, no se obtuvieron resultados favorables en cuanto a la tasa de colonización (datos no mostrados). Por su parte, el trigo permitió una buena distribución de micelio en las semillas, lo que favoreció el crecimiento y colonización del sustrato. Además, realizarlas en cajas petri permitió que el sustrato contara con mayor área superficial favoreciendo la colonización completa de este. A su vez, las semillas inoculadas con *Pleurotus ostreatus* (Exp 1,2,5,6) mostraron formación de micelio aéreo y las de *Trametes elegans* presentaban un crecimiento en forma de red morfológicamente similar a una tela delgada.

El trigo utilizado para la semilla en grano demostró ser un sustrato con buena disponibilidad de nutrientes que

permite y favorece el crecimiento del hongo durante la fermentación en estado sólido. Resultado similar lo encuentra Nita Bahl (1998) quien asegura que las semillas preparadas a base de granos grandes contienen una mayor reserva de material alimenticio por grano para el micelio de los hongos. Adicionalmente, demostró que la semilla preparada con granos más grandes puede resistir condiciones adversas como un compostaje deficiente [13].

En la tabla 3 se presentan los prototipos de materiales a base de micelio obtenidos a partir de *P. ostreatus* y *T. Elegans* después del periodo de crecimiento de 20 días y el respectivo secado.

Cabe resaltar que la descripción de los prototipos obtenidos presentada a continuación se realizó en términos cualitativos, es decir, no se utilizó ningún instrumento o equipo para su caracterización.

Los materiales del tratamiento 1 y su réplica presentaron una colonización superficial y pese a la cohesión por el micelio en algunas zonas de la matriz del sustrato, son poco resistentes y tienden a fracturarse al aplicar presión manual, lo cual sugiere que el micelio de *P. ostreatus* puede no aportar rigidez en el material al cohesionar las partículas.

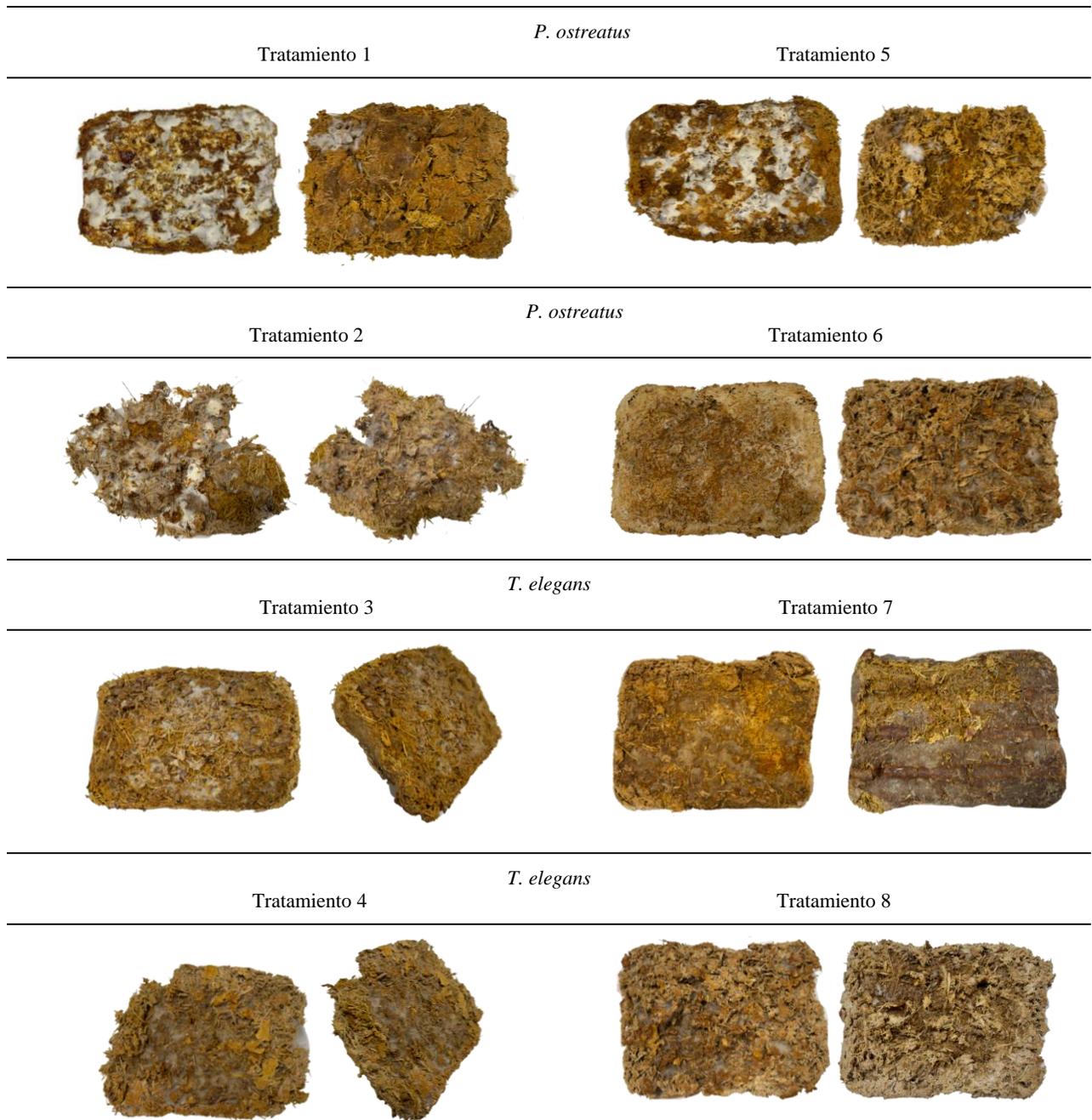
Por otro lado, para el tratamiento dos y su réplica, el tratamiento 6, no se obtuvieron resultados consistentes. Mientras que el primero presentó poca colonización de la matriz y por su fragilidad durante el proceso de secado se desintegró gran parte de este, su réplica presentó una buena colonización con una estructura más compacta y exhibió mayor resistencia a la deformación manual.

Por su parte, en los materiales del tratamiento 3 y su réplica, el micelio de *T. elegans* logró colonizar casi la totalidad del sustrato. En este caso, el micelio logra aglutinar todas las partículas permitiendo al material resistir a la presión y deformación manual, y presentar cierto grado de flexibilidad.

Los materiales de *T. elegans* con baja altura de sustrato (tratamiento 4 y 8) presentaron una colonización uniforme en la parte central que favorecía la resistencia a la tensión manual, y zonas externas poco colonizadas las cuales tendían a ser quebradizas después del secado.

Tabla 3

Prototipos de materiales obtenidos en el diseño experimental

**Tabla 4.** Mediciones de humedad de los prototipos finales

Tratamiento	Humedad [%]
1	64,34
2	48,054
3	72,714
4	60,20
5	49,171
6	37,50
7	49,14
8	45,86

Como se evidencia en la tabla 4 tanto los prototipos de materiales finales de *P. ostreatus* como los de *T. elegans* con baja altura de sustrato presentaron baja humedad por el poco grosor, puesto que se logró retirar en mayor medida la humedad de la matriz con el proceso de secado.

Los residuos agroindustriales utilizados como sustrato para la formación de la matriz demostraron ser una fuente rica en nutrientes necesarios para el desarrollo adecuado de la biomasa fúngica, pues proveen las fuentes de carbono, nitrógeno, azufre y fósforo [14]. Específicamente, los residuos de cáscaras de chontaduro, aportan según su composición: lignina (1,28%), hemicelulosa (11,86 %), celulosa (2,43 %), Fibra detergente neutra (15,57%), fibra detergente ácida (3,71%), y almidón [3]; este último como principal fuente de carbono. De manera similar, el polvillo húmedo de bagazo de caña de azúcar provee fibra de celulosa, hemicelulosa y lignina, al ser una fibra natural confiere soporte y resistencia a la deformación y evita fallas de cizallamiento [15] lo que se traduce en materiales más rígidos.

Por otro lado, la humedad del sustrato es un parámetro crítico durante el desarrollo de la fermentación. La matriz sólida (mezcla chontaduro-bagazo) demostró ser un sustrato poroso capaz de absorber la masa de agua añadida, sin embargo, se mostró muy compacto después de esterilizarlo limitando el paso de la red hifal a través de este. Resultado que puede justificar la colonización exclusivamente superficial de los prototipos de materiales inoculados con la cepa de *Pleurotus ostreatus* dado que la porosidad efectiva del lecho del sustrato sólido estaba limitada, lo que disminuye directamente la difusividad de los gases dentro del mismo. Tal como lo expresa Oostra (2001) basado en los resultados de su trabajo sobre los pellets de hongos filamentosos, si los poros entre las hifas están llenos de agua cabe esperar una limitación de la difusión de oxígeno [16]. Adicionalmente se mostró que los poros llenos de aire facilitan la transferencia de oxígeno a través del manto fúngico [16].

A su vez, las características evidenciadas de los prototipos pueden ser atribuidos a la naturaleza de los hongos. Tanto *P. ostreatus* como *T. elegans* pertenecen a la división Basidiomycota. Los basidiomicetos pueden comprender hasta tres tipos distintos de hifas, generativas, de unión y esqueléticas, con diferencias clave en el grosor de la pared celular, la estructura interna y las

características de ramificación [17]. Sin embargo, las hifas de *Pleurotus ostreatus* son de carácter monomítico que comprenden hifas generativas únicamente [18] y cuyas paredes son delgadas, huecas y ramificadas [6]. Es así, como la baja flexibilidad y poca rigidez exhibida en los materiales a base de *P. ostreatus* puede atribuirse al tipo de red hifal presente en esta especie.

Los medios de cultivo de hongos filamentosos con alto contenido de humedad no favorecen la producción de cantidades eficientes de quitosano [19], polisacárido que proporciona estabilidad estructural importante en las paredes celulares [20]. Lo cual sugiere que la falta de rigidez exhibida por los materiales de *P. ostreatus* sea debido a un exceso de humedad en la matriz del sustrato.

Por otra parte, la especie de hongo utilizada para aglutinar el relleno disperso de biomasa residual agroindustrial mediante la expansión de masa de micelio incide directamente sobre la densidad de crecimiento y el grado de unión interfacial en la matriz de sustrato [21]. Los materiales a base de *Trametes elegans* lograron penetrar en mayor medida la matriz sólida y mostraron una buena colonización de la misma. Adicionalmente, se evidenció que las partículas del sustrato estaban completamente recubiertas por el micelio, resultado que puede explicar la resistencia a la deformación manual y la flexibilidad en estos materiales.

Del diseño experimental desarrollado, se evidenció que los tratamientos con un nivel bajo tanto de humedad como de altura de sustrato mostraron una mejor consistencia y penetración por parte del hongo en el material. Dado que el espesor de la capa de sustrato fue menor, se favoreció la libre circulación de aire en el sustrato promoviendo la transferencia de oxígeno. Del mismo modo, las condiciones ambientales de iluminación y temperatura (oscuridad y +/-28 °C) previnieron la formación de cuerpos fructíferos y permitieron el crecimiento efectivo del micelio, respectivamente.

La metodología propuesta se presenta gráficamente en la Figura 2., donde se resaltan las etapas principales del proceso.

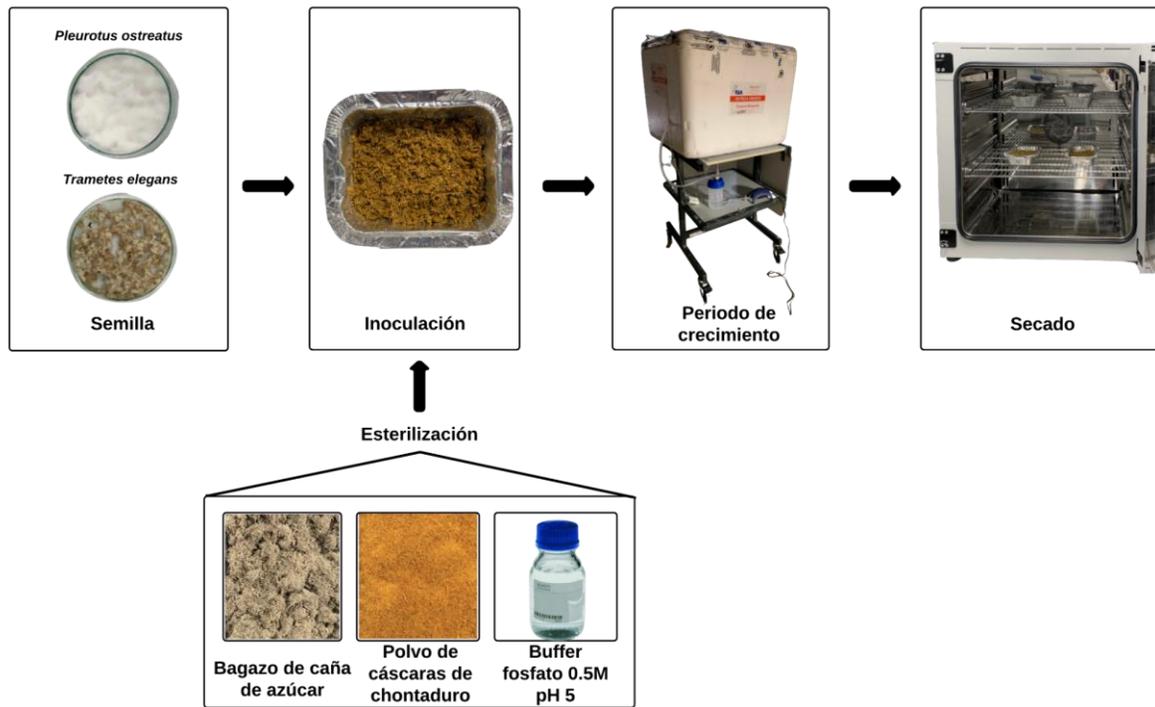


Fig. 2. Metodología para el desarrollo de los materiales

4. Conclusiones

La metodología propuesta permitió desarrollar los prototipos de materiales biodegradables a partir de dos especies de hongos filamentosos, una que ha sido ampliamente estudiada en la línea de investigación desde distintos enfoques y otra que por el contrario no ha sido explorada.

Las características del material prototipo están condicionadas a la estructura de red de ligantes presente. A su vez, el grado de colonización de la matriz está determinado por la transferencia de oxígeno y los gradientes de concentración intrapartícula ocasionados por el consumo de nutrientes, afectando así la velocidad y eficiencia del proceso.

Debido a la posible limitación de difusión del aire dentro de la matriz sólida y los requerimientos de humedad en el sustrato necesarios para el crecimiento del microorganismo, se recomienda añadir un material poroso a la como vermiculita. De esta forma, la fracción vacía del lecho aumentará y el mayor nivel de espacios inter-partículas proporcionará una mejor difusión del oxígeno. Asimismo, podría favorecerse la colonización dadas las nuevas áreas disponibles para el crecimiento de las hifas dentro de la matriz sólida.

De acuerdo con las propiedades físicas de los prototipos estos pueden ser proyectados a distintos mercados. Los materiales a base de *T. elegans* mostraron

mayor resistencia a la flexión y presión por lo que tendrían potencial aplicación como materiales de embalaje para productos electrónicos o como envases para alimentos con su respectivo proceso de moldeado previo. Asimismo, los prototipos a base de *P. ostreatus* mostraron una superficie firme y rugosa, y ser poco resistentes. Sin embargo, al igual que los de *T. elegans* se caracterizan por su baja densidad (peso ligero), así que una gran cantidad de aire estaría presente en los espacios libres, lo que disminuye a su vez la conductividad térmica y convertiría a estos materiales en buenos aislantes térmicos.

Agradecimientos

Agradecemos a Nelson H. Caicedo por su valiosa asistencia técnica. Esta investigación fue también financiada por el PROYECTO DE INVESTIGACIÓN FINANCIACIÓN INTERNA COL0039769-1102. “Conversión de residuos a material de empaque biodegradable” del departamento de Ingeniería Bioquímica, Universidad Icesi.

Referencias

[1] MASP & Greenpeace Colombia. Situación actual de los plásticos en Colombia y su impacto en el medio ambiente. (2019).

[2] K. Cerimi, K.C. Akkaya, C. Pohl, B. Schmidt, P. Neubauer, Fungi as source for new bio-based materials: A patent review, *Fungal Biol. Biotechnol.* 6 (2019) 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40694-019-0080-y>.

[3] J. Martínez-Girón, X. Rodríguez-Rodríguez, L.X. Pinzón-Zárate, L.E. Ordóñez-Santos, Caracterización fisicoquímica de harina de residuos del fruto de chontaduro (*Bactris gasipaes* Kunth, Arecaceae) obtenida por secado convectivo, *Corpoica Cienc. y Tecnol. Agropecu.* 18 (2017) 599–613. https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num3_art:747.

[4] E. Bayer, G. McIntyre. Method for producing grown materials and products made thereby. (2016). US9485917B2 Available <https://patents.google.com/patent/US9485917B2/en?q=US9485917>

[5] E. Elsacker, S. Vandeloek, J. Brancart, E. Peeters, L. De Laet, Mechanical, physical and chemical characterisation of mycelium-based composites with different types of lignocellulosic substrates, (2021) 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213954>.

[6] M. Jones, A. Mautner, S. Luenco, A. Bismarck, S. John, Engineered mycelium composite construction materials from fungal biorefineries: A critical review, *Mater. Des.* 187 (2020) 108397. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.108397>.

[7] J.L. Teixeira, M.P. Matos, B.L. Nascimento, S. Griza, F.S.R. Holanda, R.H. Marino, Production and mechanical evaluation of biodegradable composites by white rot fungi, *Cienc. e Agrotecnologia.* 42 (2018) 676–684. <https://doi.org/10.1590/1413-70542018426022318>.

[8] F. Appels, S. Camere, M. Montalti, E. Karana, K.M. Jansen, J. Dijksterhuis, P. Krijgsheld, H.A. Wösten, Fabrication factors influencing mechanical, moisture- and water-related properties of mycelium-based composites, *Mater. Des.* 161 (1)(2019) 64–71.

[9] S. Travaglini, J. Noble, P.G. Ross, C.K.H. Dharan, *Mycology Matrix Composites*, 28th Annual Technical Conference of the American Society for Composites, State College, PA, 2013.

[10] A. Ghazvinian, P. Farrokhsiar, F. Vieira, J. Pecchia, B. Gursoy, Mycelium-based bio-composites for architecture: assessing the effects of cultivation factors on compressive strength, The eCAADe and SIGraDi Conference, University of Porto, Portugal, 2019.

[11] M. Haneef, L. Ceseracciu, C. Canale, I.S. Bayer, J.A. Heredia-Guerrero, A. Athanassiou, *Advanced Materials from Fungal Mycelium: Fabrication and Tuning of Physical Properties*, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–31. <https://doi.org/10.1038/srep41292>.

[12] R.J.J. Lelivelt, G. Lindner, P. Teuffel, H. Lamers, The production process and compressive strength of Mycelium-based materials, *First Int. Conf. Bio-Based Build. Mater.* (2015).

[13] N. Bahl, *Hand book of mushroom*, Oxford and IBH publishing Co., New Delhi, Bombay. 3rd edition. (1984) 345-352.

[14] Madigan, M. T., Martinko, J.M., & Parker, J. (1997). *Brock biology of microorganisms*. 8th edition. Editorial Prentice Hall. New Jersey, U.S.A. 986 págs

[15] S. Manan, M.W. Ullah, M. Ul-Islam, O.M. Atta, G. Yang, *Synthesis and applications of fungal mycelium-based advanced*

functional materials, *J. Bioresour. Bioprod.* 6 (2021) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2021.01.001>.

[16] J. Oostra, E. P. le Comte, J. C. van den Heuvel, J. Tramper, and A. Rinzema, “Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 75, no. 1, pp. 13–24, 2001, doi: 10.1002/bit.1159.

[17] J. Mitchell P, H. Tien, D. Chaitali, J. Sabu, *Mycelium Composites: A Review of Engineering Characteristics and Growth Kinetics*. *Journal of Bionanoscience*. 2017 11. 241-257. 10.1166/jbns.2017.1440.

[18] M. Jones, T. Huynh, S. John, Inherent species characteristic influence and growth performance assessment for mycelium composite applications, *Adv. Mater. Lett.* 9 (2018) 71–80. <https://doi.org/10.5185/amlett.2018.1977>.

[19] W.B. Turner, D.C. Aldridge. *Fungal metabolites II*. (1983). London: Academic Press Inc.

[20] H. E. Brown, S. K. Esher, and J. A. Alspaugh, “Chitin: A ‘Hidden Figure’ in the Fungal Cell Wall,” *Current Topics in Microbiology and Immunology*, pp. 83–111, 2019, doi: 10.1007/82_2019_184.

[21] C. Girometta et al., “Physico-Mechanical and Thermodynamic Properties of Mycelium-Based Biocomposites: A Review,” *Sustainability*, vol. 11, no. 1, p. 281, Jan. 2019, doi: 10.3390/su11010281.

[22] U. Onken, E. Liefke, Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes., in: *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 1989: pp. 137–169.

