



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL



Tesis Presentada en Opción al
Título Académico de Máster en Biotecnología
Mención Ambiental

Biodegradación de residuos lignocelulósicos por Fermentación en Estado
Sólido con *Pleurotus* spp.

Autora
Lic. Isabel Arelis Aguilera Rodríguez

Tutores
DraC. Rosa C. Bermúdez Savón
DraC. Nora García Oduardo
PhD. Isabel Gaime-Perraud

Santiago de Cuba, 2015
“Año 57 de la Revolución”

A la memoria de mi padre, ejemplo e inspiración de toda mi vida.

A todos los que me enseñaron que nunca es tarde.

Agradecimientos

Agradecimientos

Es difícil en unas pocas líneas dejar escrito el agradecimiento a tantas personas que han contribuido a la realización de este trabajo, ofreciéndome ideas, orientaciones, sus laboratorios e incentivos en los momentos en que mi voluntad flaqueaba, por ello pido disculpas por cualquier omisión involuntaria.

Ante todo, quiero dejar constancia de mi agradecimiento a mis tutoras Dra. C Nora García Oduardo y Dra. C Rosa Catalina Bermúdez Savón, por el inmenso caudal de conocimientos que me ofrecieron, su constante dedicación y ayuda sin límites, con sus oportunos consejos e incentivos que me proporcionaban energía para poder llegar a la culminación de este trabajo.

Al claustro de la maestría en Biotecnología, siempre dispuesto a colaborar, y que tanto contribuyó a mi crecimiento tanto profesional como personal.

A mis compañeros del colectivo del CEBI por su apoyo en todo momento y en especial a: Teresa, Janet, Daisa, Migdalia, Miladis, Manuel, Irasema, Karelina.

Al MSc. Roberto Machado por su ayuda en la realización de análisis espectrofotométricos en el laboratorio de Química Analítica del Departamento de Química y a su colectivo en sentido general.

A Javier, muchas gracias, por su incondicional apoyo, brindándome numerosas horas de su descanso en la elaboración del informe final.

A mis compañeros de la colegiatura, por tantos momentos de tensión y alegrías compartidos y en especial a: Lidieska, Orlindes, Marisley, Dargis y Fernando, que desde el comienzo me acogieron con mucho cariño y respeto.

Mis amigas: Rosa, Suyén, Arelis, Odalys que siempre han estado presentes en los momentos difíciles que me ha tocado vivir y me han ayudado a tener confianza, como lo harían las niñas que quise tener y no pude.

A mi maravillosa familia: mis hermanos Argel, Abel, Alba y Alcis, que siempre me han ayudado y protegido, en especial a mi mamá y mi hermana Alina sin las cuales no se que seria de mi vida.

A Juan por su cariño y comprensión.

A todos

Muchas Gracias

Resumen

RESUMEN

Uno de los procesos más viables económicamente para la bioconversión de residuos lignocelulósicos es la producción de setas comestibles con el empleo de la fermentación en estado sólido (FES), alcanzándose como resultado del proceso, productos de alto valor agregado. Es importante evaluar el grado de bioconversión o biodegradación que presentan los diferentes sustratos por *Pleurotus*, pues es un proceso de dependencia multifactorial. El objetivo de este trabajo fue realizar la valoración de la biodegradación, para lo cual se escogieron la pulpa de café y la cáscara de cacao como sustrato. Como medida se evaluaron, además de la bioconversión, la eficiencia biológica, la relación C/N y cambios en la composición inicial y final de los sustratos. Los resultados muestran cambios en los siguientes parámetros: relación C/N, fibra bruta, lignina, polifenoles, cafeína, materia orgánica, y en los niveles de bioconversión en ambos residuos. Los más notorios fueron las disminuciones en el contenido de cafeína, fibra bruta, relación C/N, lignina y polifenoles. En la valoración realizada de diferentes sustratos puros y mezclados, se evidencia la importancia que tiene la composición química y las características físicas de los sustratos para el desarrollo y crecimiento del *Pleurotus* spp. y por tanto, para la biodegradación de los mismos. Por otra parte, algunos factores muestran una relación directa o indirecta con la biodegradación, pero no se pueden considerar condicionantes absolutas pues están sujetas a la influencia de muchos factores.

Palabras claves: *Pleurotus* spp., fermentación en estado sólido, sustratos lignocelulósicos, biodegradación.

Abstract

ABSTRACT

One of the more economically viable for lignocellulosic wastes bioconversion processes is the production of edible mushrooms by solid state fermentation (SSF), obtaining high value-added products as a result of the process,. The evaluation of the degree of biodegradation or bioconversion of different substrates by *Pleurotus*, is important, because it is a multifactorial process. The objective of this work was the assessment of biodegradation, for that, coffee pulp and cocoa husks, were chosen. Besides the bioconversion, were evaluated biological efficiency, C/N ratio and changes on initial and final composition of the substrates. The results show changes in the following parameters: C/N ratio, crude fiber, lignin, polyphenols, caffeine, organic matter, and bioconversion levels in both residues. Decreases in caffeine content, crude fiber, C/N ratio, lignin and polyphenols were the most notable. In the assessment of different pure and mixed substrates, the importance of chemical composition and physical characteristics of the substrates for the development and growth of *Pleurotus* spp was evident, and therefore, for biodegradation of them. Moreover, some factors have a direct or indirect relationship with the biodegradation, but can not be considered as absolute conditions since are subject to the influence of many factors.

Key words: *Pleurotus* spp., solid state fermentation, lignocellulosic substrate, biodegradation.

Índice

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Sustratos lignocelulósicos. Evaluación de la biodegradación.	4
2.1.1. Estructura y composición	5
2.2. Fermentación en Estado Sólido (FES)	10
2.3. Pleurotus spp. Capacidad degradadora.	12
2.4. Biorrefinerías	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Producción de setas comestibles	16
3.1.1. Parámetros de control en la producción de setas comestibles	17
3.1.1.1. Precocidad (P)	18
3.1.1.2. Eficiencia biológica (E.B.)	18
3.1.1.3. Rendimiento (R.)	18
3.1.1.4. Tasa de producción (T.P.)	18
3.1.1.5. Bioconversión	19
3.1.2. Producción del sustrato remanente	19
3.1.2.1. Composición del sustrato remanente	19
3.2. Análisis químicos y bromatológicos	19
3.2.1. Determinación de nitrógeno	19
3.2.2. Determinación de potasio	20
3.2.3. Determinación de fósforo	20
3.2.4. Determinación de materia orgánica	21
3.2.5. Determinación de pH	21
3.2.6. Determinación de porcentaje de humedad	21
3.2.7. Determinación de Cenizas Totales	21
3.2.8. Determinación de Cafeína	21
3.2.9. Determinación de minerales	22
3.2.10. Determinación de lignina	22
3.2.11. Determinación de fibra bruta	23
3.2.12. Determinación de carbohidratos totales	23

<i>3.2.13. Determinación de fenoles</i>	23
<i>3.2.1.4. Determinación de la relación C/N</i>	23
<i>3.3. Análisis estadístico de resultados</i>	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
<i>4.1. Biodegradación por Pleurotus</i>	25
<i>4.1.1. Biodegradación de la pulpa de café</i>	30
<i>4.1.2. Biodegradación de la cáscara de cacao</i>	37
5. CONCLUSIONES	41
6. RECOMENDACIONES	42
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS	52

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes retos de la comunidad internacional en el siglo XXI, es convertir los procesos productivos en sostenibles, desempeñando la biotecnología un papel importante en esta transformación tecnológica, al dirigir sus investigaciones en este campo, hacia la utilización de nuevas herramientas que prevengan, controlen y remedien la contaminación ambiental.

Grandes cantidades de materiales lignocelulósicos son generados en industrias de diversos tipos tales como las del papel, la forestal, cafetalera, azucarera, entre otras; se estima que está en el orden de $2 \cdot 10^{10}$ t/año. Los residuos lignocelulósicos de dichas industrias podrían transformarse en productos utilizables tales como proteína fúngica y forraje para el ganado, combustibles líquidos, ácidos orgánicos, glucosa y alcoholes (Phillippoussis, 2011), sin embargo, la mayoría se convierten en fuente de problemas ambientales, pues son vertidos indiscriminadamente al medio sin tratamiento alguno, ocupando mucho espacio; su degradación natural es lenta y casi imposible en los volúmenes que se genera (Valášková y Baldrian, 2005).

Los procesos biotecnológicos son considerados como una alternativa para contrarrestar los efectos nocivos que su acumulación produce, transformando los residuos generados en productos útiles y de ésta manera utilizar sus potencialidades por medio de bioprocesos. Uno de los procesos más viables económicamente para la bioconversión de residuos lignocelulósicos (Chang, 2007) es la producción de setas comestibles con el empleo de la fermentación en estado sólido (FES).

Los hongos se encuentran entre los microorganismos responsables del reciclaje del carbono proveniente de la lignina, tanto por su capacidad hidrolítica como por su distribución, o potencialidad como degradadores de lignina, valorándose como organismos lignocelulolíticos por excelencia. Entre ellos existen algunos con mayor capacidad degradativa de lignina, como los que producen la llamada “pudrición blanca” que presentan un sistema enzimático poco específico con un uso potencial en la transformación de compuestos contaminantes y xenobióticos (Dahara *et al.*, 2013), desempeñando un importante papel en el proceso de bioconversión, ya que son capaces de reducir grandes cantidades de residuos, minimizar la contaminación, y formar

productos de interés para la industria de los alimentos, papel, fármacos y la agricultura entre otras.

Esta categoría definida por el tipo de pudrición que causan en la madera, contiene cientos de especies de Basidiomicetos, capaces todas de degradar la lignina, celulosa y hemicelulosa de la madera, pero la velocidad y extensión de la degradación de cada componente de la pared celular varía considerablemente en función de la especie, condiciones de fermentación y tipo de material lignocelulósico. (Sales, 2009; Sarmientos 2011; Joselau y Ruel, 1994; Carlile *et al.*, 2001; Bermúdez *et al.*, 2002).

El basidiomiceto *Pleurotus* spp. es un hongo de pudrición blanca capaz de degradar celulosa, hemicelulosa y lignina. Se desarrolla bien en presencia de sustratos que contienen materiales lignocelulósicos, en su forma silvestre se encuentra en Norteamérica, Asia, Europa y en el trópico; su producción a partir de sustratos sintéticos bajo condiciones controladas tiene aproximadamente medio siglo en China y Japón (Montoya *et al.*, 2009; Chang, 2007; Garzón, 2012; Sánchez y Royse, 2002).

En la actualidad distintos grupos de trabajo en el mundo (Romero, 2010; Albertó, 2003; Ravera, 2008; Fan, 2003), se dedican al estudio del aprovechamiento de residuos agroindustriales o forestales asociados a alimentos y relacionados con la transformación de los productos lignocelulósicos, los que proveen soporte y algunos nutrientes para el desarrollo de estos hongos que convierten la celulosa y lignina en abonos para la agricultura, alimento humano y alimento para rumiantes (Morrillo, 2013; Luna *et al.* 2013; Bermúdez, 2014).

Con estos fines se ha cultivado e investigado el hongo *Pleurotus* spp., el cual es uno de los hongos de pudrición blanca más estudiado y se cultiva como seta comestible, a nivel mundial está entre los cuatro más expandidos; por sus facilidades para crecer sobre una gran diversidad de residuos agroindustriales, por lo simple de su tecnología de cultivo y por la calidad nutritiva y organoléptica de su cuerpo fructífero (Sánchez y Royse, 2002).

El Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente, ha estudiado y profundizado en varios aspectos sobre la valorización de diferentes residuos agroindustriales en el cultivo de hongos comestibles-medicinales *Pleurotus* spp. para la obtención de productos de valor añadido, tales como biomasa micelial (García, 2008), setas comestibles (Bermúdez,

2014), enzimas (García, 2008; Rodríguez, 2006) y compuestos medicinales (Morris, 2012).

El presente trabajo está dirigido a la evaluación de la degradación que produce el hongo *Pleurotus* spp. sobre sustratos lignocelulósicos con el empleo de la FES, ya que, mientras más conocimiento se tenga acerca del proceso de biodegradación, mayores aplicaciones se pueden alcanzar en la obtención de productos de mayor valor agregado para el desarrollo de procesos sostenibles (Phillippoussis, 2011).

Problema

La acumulación de los grandes volúmenes de residuos lignocelulósicos que genera la agroindustria y que en la mayoría de las ocasiones se vierte al medio sin tratamiento, provoca contaminación, deteriorando el medio ambiente, sin embargo por su composición química, presentan potencialidades que son atractivas y no se aprovechan para ser utilizados como materia prima en diferentes tecnologías, empleando procesos biotecnológicos, que conlleven a su biodegradación.

Hipótesis

Es posible la biodegradación de residuos lignocelulósicos por *Pleurotus* spp. con el empleo de la fermentación en estado sólido.

Objetivo general

Evaluar la capacidad de *Pleurotus* spp. en la biodegradación de residuos lignocelulósicos con el empleo de la fermentación en estado sólido.

Objetivos Específicos

1. Realizar la caracterización química, física y bromatológica de los sustratos lignocelulósicos al inicio y final de la etapa de fermentación.
2. Determinar el nivel de biodegradación de los sustratos empleados, sobre la base de los parámetros: bioconversión, eficiencia biológica, relación C/N y cambios en la composición inicial y final de los sustratos.

Revisión bibliográfica

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sustratos lignocelulósicos. Evaluación de la biodegradación.

Durante el desarrollo de las actividades productivas de la mayoría de los cultivos agrícolas y de los procesos industriales relacionados con su transformación, se generan grandes cantidades de residuos que por lo general son considerados subproductos de muy baja importancia económica, dentro los que predominan los de naturaleza lignocelulósica, subproductos fibrosos de interés para la producción de energía (Álvarez, 2012), como posible fuente directa de alimentos para animales, en la producción de alimentos para consumo humano y de fertilizantes (Rodríguez y Jaramillo, 2005).

Actualmente el contenido y la estructura de lignina y su entrecruzamiento con polisacáridos son factores limitantes en el aprovechamiento lignocelulósico. En procesos con biomasa se requieren pretratamientos optimizados para aumentar la accesibilidad de enzimas hidrolíticas a los polisacáridos, por ejemplo para aumentar el rendimiento de sacarificación con el fin de producir biocombustibles o para la conversión en otros productos (Ferraz, 2004).

Se han desarrollado diversos métodos que mejoran la hidrólisis de la lignocelulosa, como los pretratamientos fisicoquímicos y biológicos (Cuervo *et al.*, 2009), la finalidad del pretratamiento es remover la lignina, hidrolizar la hemicelulosa a azúcares fermentables, y reducir la cristalinidad de la celulosa para liberar la glucosa. Estos conocimientos podrían cambiar drásticamente las estrategias para aumentar el aprovechamiento lignocelulósico mediante técnicas de biorrefinería (Cárdenas, 2012).

La fermentación en el medio natural es considerada como un procedimiento de preparación de sustrato para cultivo de *Pleurotu* ssp. específicamente desarrollado en algunos países del continente americano como México, Cuba y Colombia, con el fin de aprovechar algunos subproductos agroindustriales de gran disponibilidad y que no se procesan con facilidad con otras técnicas conocidas. (Sánchez y Royse, 2002)

Las características más comunes que tienen los sustratos en estado fresco, es que contienen cantidades apreciables de materiales fácilmente fermentables, susceptibles de contaminaciones bacterianas, fúngicas y de invasiones de insectos, etc., así como que necesitan ser homogeneizados y estabilizados para un mejor manejo y aprovechamiento

posterior. Para ser utilizados como sustratos del género *Pleurotus*, la solución general a estas cuestiones ha sido someterlos a un proceso previo de fermentación natural. (Sánchez y Royse, 2002)

En la actualidad distintos grupos de trabajo latinoamericanos (como Venezuela, México, Ecuador, Cuba, Chile), Egipto y países del este del continente asiático (Fan 2003, Albertó 2003, Ravera 2008, Romero 2010, García 1999), se dedican al estudio del aprovechamiento de residuos agroindustriales o forestales asociados a alimentos y relacionados con la transformación de los productos lignocelulósicos. Estos proveen soporte y algunos nutrientes para el desarrollo de ciertos tipos de hongos que convierten la celulosa y lignina en abonos para la agricultura (Mustelier, 2010; Morillo 2013), alimento para rumiantes (Luna y col. 2013), alimento humano y abono (Serrano, 2012)

Dentro de los parámetros más comúnmente empleados para evaluar el grado de biodegradación del sustrato está la eficiencia biológica, encontrándose que, de forma general, existe una relación directa entre ésta y los niveles de degradación del sustrato (López 2005).

En trabajo realizado por Varnero *et al* (2010) sobre la potencialidad de residuos forestales como sustrato para cultivo de *Pleurotus ostreatus*, analizan la composición química del sustrato inicial y remanente (Tabla 1), distintas variables fenomenológicas y morfológicas, así como, rendimiento y calidad de los cuerpos fructíferos sobre la base de cuatro tratamientos: astillas de álamo, astillas de eucalipto, mezclas de paja de trigo y eucalipto y paja de trigo como testigo. Reportan que el nivel proteico de este hongo fue elevado en todos los sustratos y la relación C/N de los mismos disminuyó después de cosecha, evidenciando la capacidad degradadora del *Pleurotus* por la disminución de la concentración de carbono empleado por éste en su metabolismo y el incremento del contenido relativo de nitrógeno.

2.1.1. Estructura y composición

Los tejidos lignocelulósicos de las plantas terrestres superiores constituyen el mayor depósito de energía fotosintética y materia orgánica renovable, están presentes en todos los vegetales, constituyendo una barrera de acceso para la protección de estos organismos. Esta barrera biológica está constituida por tres tipos de polímeros: lignina 15-25 %, hemicelulosa 23-32 %, celulosa 38-50 % y algunos componentes inorgánicos,

Tabla 1. Composición química de los sustratos pre y post cosecha en cultivo de *Pleurotus* sobre residuos agroindustriales.

<i>Sustratos</i>	<i>N_T</i> (g/kg)	<i>P_T</i> (g/kg)	<i>K_T</i> (g/kg)	<i>MO</i> (g/kg)	<i>C/N</i>	<i>pH</i>
<i>Inicial/remanente</i>						
<i>Paja de trigo</i>	3,64	0,11	1,82	920	147	4,4
	6,86	0,13	0,96	893	77	5,3
<i>Eucalipto</i>	0,60	0,02	0,15	994	1009	3,7
	0,84	0,01	0,03	991	692	3,5
<i>Paja de eucalipto</i>	1,06	0,03	0,40	983	545	3,8
	1,68	0,03	0,06	922	325	4,0
<i>Álamo</i>	0,46	0,01	0,29	986	1277	5,5
	0,84	0,02	0,07	985	751	5,1

Fuente: Varnero *et al.*, 2010.

que se transforman en cenizas después de la combustión del material; siendo la celulosa y la lignina los biopolímeros más abundantes en la naturaleza. Su descomposición a CO₂, H₂O y sustancias húmicas, constituye probablemente el evento biodegradativo más importante en el ciclo biosférico del carbono (Omarini, 2012).

En orden de ampliar la base disponible de recursos para obtener azúcares fermentables, e identificar fuentes de materias primas de un costo más bajo, se ha centrado la atención en el uso de la biomasa sin almidón, y no relacionada con la alimentación, tal como la proveniente de los vegetales y sus residuos, las agroindustrias y sus subproductos que constituyen un excelente sustrato para el crecimiento fúngico. Los hongos cumplen un rol importante, ya que este tipo de materiales está compuesto principalmente de polímeros que no pueden ser degradados por la mayoría de los organismos presentes en los diferentes ecosistemas (Papinutti, 2003; Ramírez, 2000). Tablas 2 y 3.

La biomasa lignocelulósica presenta una estructura compleja compuesta de tres fracciones que deben ser procesadas por separado para asegurar una conversión eficiente de este tipo de materiales. Siendo la fracción mayoritaria de esta biomasa la celulosa cristalina (Grabber, 2005).

Celulosa

La celulosa constituye el polisacárido predominante en los residuos vegetales, representando entre el 30 y 60 % de su peso seco total, está compuesta de cadenas largas de moléculas de D-glucosa unidas por enlaces beta (1-4) glucosídicos, disposición bastante rígida y muy estable, que a su vez, se agrupan en estructuras superiores de gran cristalinidad, lo que dificulta su hidrólisis y conversión a azúcares fermentables (Martínez, 2002), debido al alto grado de energía de las uniones del hidrógeno entre las cadenas de la celulosa, cuando la molécula de celulosa está completamente extendida y toma forma de cinta aplanada con los grupos -OH sobresaliendo lateralmente se pueden formar puentes de hidrógeno inter, e intramoleculares (Baldrian, 2008 ; Valasková, 2005).

Las características de la estructura molecular (superficie en forma de cinta e hidrofobicidad) son las responsables de su estructura supra molecular, y determina muchas de las propiedades físicas y químicas de la celulosa. La unión de hidrógeno entre las cadenas de la celulosa hace los polímeros más rígidos, impidiendo la flexión de

Tabla 2. Composición química (%) de algunos subproductos empleados en la producción de setas comestibles y/o enzimas ligninolíticas, por FES.

<i>Subproducto</i>	<i>Lignina</i>	<i>Celulosa</i>	<i>Hemicelulosa</i>
<i>Bagazo de caña</i>	11-14	33-38	22-34
<i>Pulpa de café</i>	12,2-17,5	17,7-18,0	0,98-2,00
<i>Cáscara de cacao</i>	10,8	12,4	ND
<i>Cáscara de coco</i>	34	ND	ND
<i>Aserrín</i>	22-27	44-56	11-30
<i>Paja de trigo</i>	14-15	30-43	36-50

Fuentes: García, 2008

Tabla 3. Eficiencias biológicas de diferentes sustratos empleados en FES.

<i>Sustrato</i>	<i>Eficiencia biológica (%)</i>	<i>Referencia</i>
Pulpa de café	168,5	Bermúdez <i>et al.</i> , 1994
Pulpa de café	175,8	Martínez <i>et al.</i> , 2000
Paja de arroz	84,6	Pani y Mo hanti, 1998
Cascarilla de arroz	56,1	Hashimoto y Takahashi, 1974
Bagazo de caña	20,8	Garzón J.P. <i>et al.</i> , 2008
Cáscara de coco	90,0	García, 2008
Cáscara de cacao	84,0	García, 2008
Hoja de plátano	123,0	Romero <i>et al.</i> , 2010
Paja de trigo	129,0	Romero <i>et al.</i> , 2010
Paja de frijol	82,9	Romero <i>et al.</i> , 2010
Paja de cebada	97,3	Martínez <i>et al.</i> , 2000
Paja de maíz	67,7	López Coba <i>et al.</i> , 2005
Pulpa de café: Paja de cebada	99,7	Martínez Carrera <i>et al.</i> , 2000
Pulpa de café: bagazo de caña	96,9	Martínez Carrera <i>et al.</i> , 2000
Pulpa de café: cáscara de coco	89,4	Martínez Carrera <i>et al.</i> , 2000
Aserrín de pino: salvado de arroz	44,8	Hashimoto y Takahashi, 1974

las moléculas, la que debe ocurrir para facilitar la ruptura por hidrólisis de las uniones glucosídicas (Laureano *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 1997). Anexo A

La degradación de la celulosa puede ocurrir por la acción de tres grupos de enzimas: las endo-1,4- β -glucanasas, que rompen la molécula al azar y liberan fragmentos menores; las exo-1,4- β -glucanasas, que hidrolizan por las puntas los fragmentos menores y las 1,4- β -glucosidasas que hidrolizan la celobiosa a glucosa (Ferraz, 2004).

Hemicelulosa

La segunda fracción es la hemicelulosa, formada por polímeros de azúcares de cinco átomos de carbono (principalmente xilosa). Tienen un grado de polimerización entre 100 y 200 en fibras madereras. Plantas herbáceas suelen contener más hemicelulosas y menos ramificados. Las pajas de cereales (trigo, arroz, centeno, cebada, etc.) suelen contener entre 30 y 40 % de hemicelulosas (Albertó *et al.*, 2003).

Es una fracción fácilmente hidrolizable ya que en contraste con la celulosa, la cual es cristalina, fuerte y resistente a la hidrólisis, las hemicelulosas son estructuras aleatorias, amorfas con pequeña solidez, fácilmente hidrolizables en ácidos o bases diluidos; sin embargo, la xilosa es un azúcar difícil de fermentar a etanol (Ebringerova *et al.*, 2005).

Así como las celulasas, las endo-hemicelulasas hidrolizan el polímero al azar; las exo-hemicelulasas hidrolizan los fragmentos generados por las endo-hemicelulasas y las xilosidasas hidrolizan dímeros a azúcares monoméricos (Ferraz, 2004). La mayoría, poseen una especie de columna vertebral formada por una cadena plana de azúcares unidos casi siempre por enlaces β -1,4 (de menor longitud que la celulosa), de la que pueden salir ramificaciones muy cortas, generalmente de un solo azúcar de longitud (Prinsen, 2010). Anexo B

Las hemicelulosas cubren y unen a las microfibrillas de celulosa en una matriz común. La corta extensión de las cadenas incrementa la solubilidad de las hemicelulosas y la posición expuesta de las mismas en la superficie de las microfibrillas, explica el por qué éste se encuentra entre los polímeros componentes de la pared celular atacados por los hongos causantes de pudrición blanca (Ebringerova *et al.*, 2005).

Lignina

La lignina es de vital importancia para el organismo vegetal. Desempeña funciones en el transporte de agua, nutrientes y metabolitos en el sistema vascular facilitado por sus propiedades como estructura macromolecular. Su hidrofobicidad junto con el nivel de entrecruzamiento con los polisacáridos es importante para la permeabilidad de los poros entre las células vegetales. Juega un papel importante en el sistema de defensa de la planta frente a patógenos y protegen los polisacáridos de la pared celular frente a la despolimerización (Prinsen, 2010).

Es un polímero tridimensional aromático no polisacárido, está formado por polimerización al azar de unidades de fenilpropano unidas por enlaces éster y C-C que se alternan de manera desordenada. Es el polímero más abundante en la naturaleza, insoluble en agua y amorfo, de alto peso molecular y ópticamente inactivo, que confiere a las paredes celulares impermeabilidad, soporte estructural y resistencia contra el ataque microbiano y el estrés oxidativo (Grabber 2005).

La polimerización de la lignina se lleva a cabo luego de la deposición de los polisacáridos y se inicia por oxidación enzimática de los precursores a radicales fenoxi (por abstracción de un electrón). Estos radicales libres pueden reaccionar unos con otros en una gran variedad de formas que hace que la lignina no tenga una estructura única (Valásková, 2005). Anexo C

La íntima asociación espacial existente entre los polisacáridos y la lignina dentro de las paredes celulares provee una barrera protectora que impide la degradación de la celulosa.

Una vez que la lignina rodea a las fibrillas de celulosa es removida o modificada, hace a la celulosa más accesible a las enzimas microbianas y puede ser eficientemente degradada (Grabber, 2005). Hasta el momento los únicos organismos capaces de mineralizarla eficientemente llevándola a CO₂ y H₂O como productos finales, son los hongos causantes de pudrición blanca (Rodríguez., 2006).

Varias enzimas están asociadas directa o indirectamente a la biodegradación de la lignina, incluyéndose la manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP) y lacasa. Estas enzimas pueden ser ordenadas según sus potenciales de oxidación en: LiP>MnP>Lacasa. Las LiP presentan un potencial de oxidación suficientemente

elevado para sustraer electrones de las estructuras fenólicas. Las MnPs, así como las lacasas, presentan potencial de oxidación suficiente únicamente para oxidar estructuras fenólicas (Hatakka *et al.*, 2000).

Con relación a la producción de estas enzimas, algunos hongos de pudrición blanca son capaces de producir las tres enzimas, mientras que otros producen solo una o dos de las mismas (Peralta *et al.*, 2004, Hatakka *et al.*, 2005). La estructura de la lignina depende de en que tipo de tejido se encuentra. Su contenido y composición entre varias especies se deben comparar en el mismo estado vegetativo y en el mismo tejido (Leonowicz, 2001).

Pulpa de café

El café es uno de los principales productos de origen agrícola comercializados en los mercados internacionales. Es la segunda materia prima más comercializada en el mundo, sólo detrás del petróleo (Bressani, 1989).

Existen dos variedades principales de café, la *Coffea arabica*, originaria de las altiplanicies de Abisinia y cultivada en tierras altas, sobre todo en la América Central y del Sur, con granos muy aromáticos y poca cafeína, y la *Coffea canephora* variedad robusta, cultivada sobre todo en tierras bajas africanas, con granos menos aromáticos y con mucha cafeína, presentan composición semejante, pero no manifiestan el mismo rendimiento cuando se cultiva sobre ellas el hongo *Pleurotus sp.*, manifestando diferencias en el proceso de bioconversión (Bressani, 1989).

En la mayoría de los países cafetaleros predomina el beneficiado del café por el método húmedo, debido a la mejor calidad del grano. Con la aplicación de este proceso se generan grandes volúmenes de subproductos como son: la pulpa, el mucílago y el pergamino, además de las aguas residuales; lo que ocasiona una contaminación ambiental elevada en los cuerpos receptores por el alto contenido de materia biodegradable y el pH de sus residuales líquidos (Martínez, 1987).

La pulpa de café representa el 40 % del café que se despulpa, por su composición química rica en azúcares, presenta potencialidades que son atractivas para ser empleadas como materia prima en diferentes procesos o tecnologías de FES, por lo que ha sido ampliamente estudiada con vista a valorar sus posibles aplicaciones, resultando las mejores alternativas para su explotación: usarla como sustrato para el cultivo de hongos

comestibles (Espinosa 2000; Bressani, 1979); promover su descomposición natural para convertirlo en abono y devolverlo nuevamente a los suelos de los cafetales; como combustible directo o biogás, forrajes, alcohol etílico y sus derivados (ácido acético, polímeros y otros).

En relación con su posibilidad de ser utilizado en la alimentación animal, reviste particular importancia la biodegradación de los compuestos tóxicos presentes (cafeína y polifenoles) (Rodríguez, 2005). Tabla 4

Cáscara de Cacao

La obtención de las semillas del cacao constituye una industria muy importante. En este proceso la cáscara, el tegumento y el soporte que representan un 80 % del fruto vienen a constituirse en residuales que generalmente se acumulan en los lugares de cosecha, causando severa contaminación ambiental dado los grandes volúmenes que se generan anualmente.

Experimentos realizados (López, 2005) demuestran que las cáscaras secas y procesadas en forma de harina son casi tan nutritivas como el maíz en la alimentación del ganado, sin embargo estos residuales son de baja calidad y poco digeribles debido a la presencia de altos contenidos de lignina, pectina, cafeína, celulosa, taninos y fenoles, los cuales limitan fuertemente su uso como alimento animal, ya que son difíciles de degradar. Pero contienen otras biomoléculas importantes entre las que se destacan: carbohidratos, proteínas, fibra y minerales. Tabla 4

2.2. Fermentación en Estado Sólido (FES)

La FES es un proceso en el cual se utilizan y crecen uno o más microorganismos. Gutiérrez y Favela (1993), definen la fermentación en medio sólido como aquella donde el sustrato es un material húmedo, no suspendido en agua y sin escurrimiento acuoso.

El porcentaje de humedad del sustrato en FES debe variar entre 12 % y 80 % y por debajo del límite mínimo los microorganismos no se desarrollan. El límite superior es fijado en función de la capacidad de absorción de agua por el material utilizado. Un exceso de agua disminuye la posibilidad y la difusión de oxígeno en el material, además de aumentar el riesgo de contaminación bacteriana. La matriz porosa puede estar constituida por un sustrato húmedo que participa aportando nutrientes o por un soporte

Tabla 4. Caracterización química de algunos materiales lignocelulósicos.

<i>Parámetro (peso seco)</i>	<i>Pulpa de café</i>	<i>Afrecho</i>	<i>Cáscara de cacao</i>	<i>Cáscara de coco</i>	<i>Viruta de cedro</i>	<i>Granos de trigo</i>
<i>pH</i>	7-8	ND	ND	ND	7,6	ND
<i>Humedad (%)</i>	7-13	14	11	9	8	3
<i>Materia seca (%)</i>	87-93	86	89	91	92	97
<i>Cenizas (%)</i>	7-13	8	8-9	3	1	2
<i>Nitrógeno (%)</i>	1,6-2,9	2	1	0,5	0,1-0,3	2
<i>Proteína bruta (%)</i>	10-18	14	7-18	3	0,7-1,9	14
<i>Fibra (%)</i>	13-23	18	16-30	ND	56	ND
<i>Grasa (%)</i>	2-8	4	2-10	1	1	4
<i>Carbono (%)</i>	50-54	53	53	56	57	57
<i>C/N</i>	18-31	26	18-53	112	570	28
<i>Fenoles totales (%)</i>	1,34	ND	0,055	0,022	0,017	ND
<i>Taninos (%)</i>	0,38	ND	0,005	ND	ND	ND

Fuentes: García, 2008; Ramos, 1999 y datos de la autora.

Determinación de proteína bruta, a partir de la determinación de nitrógeno total por el método de Kjeldahl, (nitrógeno x 6,25).

C/N: relación carbono/nitrógeno, se calcula por $C (\%) = 0,58 \times \text{materia orgánica}$.

La materia orgánica se calcula por la diferencia entre la materia seca y las cenizas (Sánchez y Royse, 2002). ND: no determinado.

inerte capaz de absorber los nutrientes que se encuentran en la solución (Pérez *et. al.*, 2003).

Desde el punto de vista biotecnológico la fermentación es la transformación de un sustrato orgánico por la acción metabólica de los microorganismos. El compuesto que se obtiene (intracelular o extracelular) se llama producto de fermentación. En toda fermentación ocurre una biotransformación del sustrato y siempre hay crecimiento microbiano (biomasa) y la conversión de un sustrato en un producto de interés, por la acción de los catalizadores biológicos (enzimas). La fermentación en estado sólido es un sistema denominado de las tres E: energético, económico y ecológico (Raghavarao, 2003).

Un modelo que explica algunos de los procesos que ocurren a micro escala en la fermentación sólida (Holker y Lenz, 2005, Rahardjo *et al.* 2006) se presenta en la Figura 1.

Después de la inoculación del microorganismo sus hifas desarrollan una capa de micelio que se extiende sobre la superficie del sustrato. Del micelio sobresalen dos tipos de hifas: unas aéreas, que penetran en el espacio gaseoso y otras que penetran al sustrato mediante el crecimiento a través de los poros llenos de líquido. La actividad metabólica ocurre principalmente, lo más próxima a la superficie del sustrato y dentro de los poros, sin embargo, las hifas aéreas también muestran actividad metabólica, ellas sirven de transporte de sustancias desde la parte interior del sustrato hacia el exterior.

Las enzimas hidrofóbicas son producidas por el micelio, se difunden dentro de la matriz sólida y catalizan la degradación de las moléculas en unidades más pequeñas, las cuales son utilizadas por el hongo como nutrientes. Durante la fermentación el oxígeno es consumido y se producen dióxido de carbono, agua, calor y productos bioquímicos de interés, lo que trae como consecuencia la aparición de gradientes dentro de la biopelícula, por ejemplo: la difusión del oxígeno desde la zona gaseosa hasta las regiones más profundas de la biopelícula y la difusión del dióxido de carbono desde la biopelícula hasta las regiones profundas de la zona gaseosa.

El calor desarrollado (Q) provoca un incremento de la temperatura (T) causando serios problemas durante la fermentación en estado sólido, este calor debe ser removido del sustrato. Otro factor es el pH, el cual cambia, debido a la liberación de los ácidos

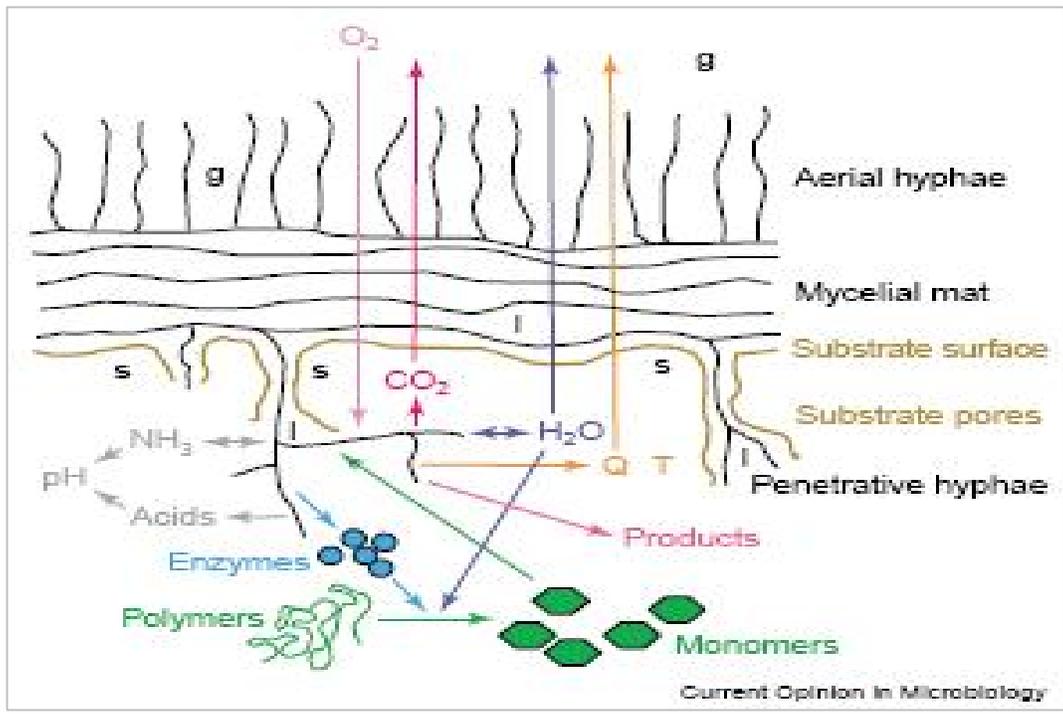


Figura 1. Procesos que ocurren a microescala en la FES.
(Fuente: Holker y Lenz, 2005; Rahardjo *et al.* 2006).

orgánicos y el intercambio de iones amonio. Los productos de interés son liberados dentro de la matriz sólida y deberán ser extraídos al final del proceso para su uso.

La fermentación en fase sólida de los residuos lignocelulósicos se valora como uno de los métodos más prometedores para la producción de proteína no convencional (Julián, 2007), lo cual está determinado en primera instancia, por los grandes volúmenes de estos residuos que se producen anualmente en el mundo, y en segundo lugar, por las ventajas que tiene el sistema de Fermentación en Fase Sólida sobre las Fermentaciones Sumergidas convencionales (Holker *et al.* 2005).

Los sistemas de fermentación en medio sólido pueden ser económicamente ventajosos en relación con la fermentación sumergida en algunos casos, si se tienen en cuenta factores como la concentración del producto en el medio de fermentación, el costo del proceso de separación purificación, el costo de procesamiento de los efluentes y las características del producto final (Pandey, 2000). La FES es además la única biotecnología que reduce al mínimo los subproductos y residuos contaminantes y se considera como una de las vías de mayor sostenibilidad para el aprovechamiento de residuos sólidos (Rodríguez, 2005; Ferraz, 2004).

2.3. *Pleurotus* spp. Capacidad degradadora.

Los Basidiomicetes son hongos que generalmente producen cuerpos de fructificación fácilmente visibles al ojo humano (Chang y Miles, 1992). Están constituidos por una masa de filamentos, cada uno denominado hifa y el conjunto de hifas se denomina micelio. La reproducción se realiza por medio de la producción de esporas, aunque cualquier fragmento de hifa tiene la capacidad de propagarse. Figura 2

En el desarrollo de los hongos, se distinguen dos fases conocidas como: estadio vegetativo y estadio reproductivo o de fructificación. El estadio vegetativo se refiere al desarrollo del micelio y el reproductivo a la formación del basidiocarpo. Durante la colonización del sustrato, se excretan enzimas extra celulares que degradan la materia orgánica transformándola en compuestos orgánicos solubles que son absorbidos por las hifas. (Carlile, 2001)

El crecimiento del micelio resulta de una fusión de hifas, generando una asociación entre la hifa y el sustrato, que proporciona un fuerte soporte físico necesario para la formación del cuerpo de fructificación (estadio reproductivo). El estadio reproductivo

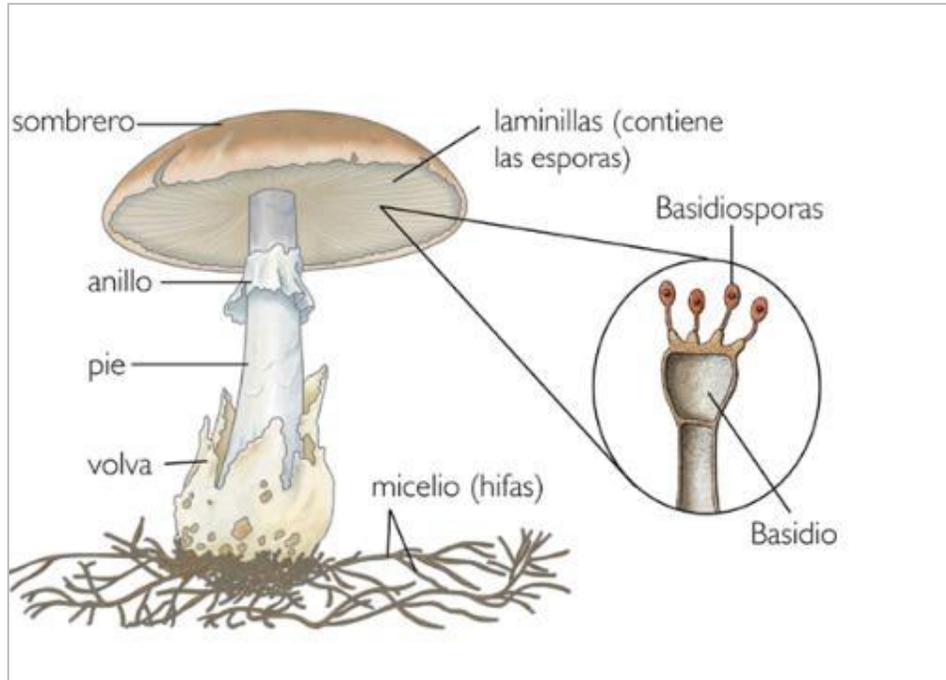


Figura 2. Partes de un basidiomiceto. Cardona, 2001.

está condicionado a variaciones de factores físicos como el descenso de la temperatura y el aumento de humedad (Sánchez y Royse, 2002). El micelio debe tener a su disposición la fuente de carbono que constituye la base nutricional. (Carlile, 2001; Kant, 2008)

El género *Pleurotus*, se caracteriza por crecer sobre una gran diversidad de sustratos, lo cual lo convierte en un candidato ideal para el aprovechamiento de desechos agroindustriales tales como cañeros, cafetaleros, paja de arroz etc. Este hongo posee además una alta calidad nutritiva y organoléptica de su cuerpo fructífero (García, 1999); desde el punto de vista nutricional contiene proteínas (27-48 %), lípidos (2-8 %), niveles tolerables de ácidos nucleicos y la presencia de vitaminas, minerales, fibra dietética, β -glucanos y compuestos con actividad antioxidante (Bermúdez *et al.*, 2001).

Pleurotus spp., es un hongo saprófito, descomponedor de la madera y residuos vegetales; se puede encontrar ampliamente distribuido en la naturaleza en los bosques tropicales y subtropicales, e igualmente puede ser cultivado artificialmente. Su nombre deriva del griego “pleuro”, que significa formado lateralmente en referencia a la posición del estípite respecto al píleo; y “ostreatus” en latín quiere decir en forma de ostra y en este caso se refiere a la apariencia y al color del cuerpo fructífero (Chang, 1992).

Además de las propiedades medicinales y el valor nutritivo de *Pleurotus* spp., al igual que otras especies relacionadas, es un potente biodegradador y detoxificador (Rodríguez, 2006); convierte los residuos orgánicos poco digeribles y no comestibles en alimentos para animales y humanos de buena calidad y palatabilidad (Phillippousis, 2011), y se considera que su eficiencia en la producción de proteína por unidad de área y por unidad de tiempo es mayor que las fuentes de proteína animal (Cardona, 2001).

Estos organismos poseen un cuerpo "vegetativo" distintivo llamado micelio, conformado por un conjunto de finos filamentos denominadas hifas, que constituyen el cuerpo del hongo. En un cultivo de fermentación en estado sólido, el micelio se diferencia fácilmente ya que posee un color blanco. Para los procesos de crecimiento y fructificación requiere de la combinación de factores físicos: temperatura, luz, oxígeno y dióxido de carbono, cuyos valores y concentraciones óptimas varían en función de la etapa en que se encuentran (Cardona *et al.*, 2001).

Sobre sustratos lignocelulósicos, los hongos crecen a tasas lineales ya que enfrentan limitaciones estéricas y de accesibilidad. Para ello deben ponerse en íntimo contacto con el sustrato. Por una parte, lo hacen prolongando sus hifas hasta los lugares donde se encuentran los nutrientes, lo penetran y colonizan, valiéndose de estructuras especializadas (Ferraz 2004).

Respecto a esto último, es de destacar que los hongos de podredumbre blanca, *Pleurotus* entre ellos, poseen enzimas capaces de degradar lignina no para su consumo sino que lo hacen para poder acceder a la celulosa. Como todo organismo en primera instancia toma los compuestos más simples mientras que ataca a los compuestos complejos para disponer de ellos cuando los simples se agoten (Ravera, 2008).

El cultivo del hongo es simple, económico y ambientalmente amigable debido a la utilización de residuos rurales y agroindustriales. Su cultivo en subproductos agroindustriales como bagazo de caña de azúcar, pulpa de café y paja de cereales, puede ser considerado como un método valioso para la producción de proteína (Fan *et al.*, 2003).

Este hongo posee además, una alta calidad nutritiva y organoléptica de su cuerpo fructífero (García, 1999), debido a la presencia de proteínas, de todos los aminoácidos esenciales, con una calidad muy cercana a la proteína animal, también contiene carbohidratos poliméricos tales como el glucógeno y la quitina, y otros compuestos carbonados de bajo peso molecular.

Incluye especies comestibles y medicinales que al pertenecer al grupo de hongos de pudrición blanca, poseen la habilidad de producir enzimas ligninolíticas extracelulares: lacasas (Lac), dos peroxidasas: manganeso peroxidasa (MnP), versátil peroxidasa (VP) y aril alcohol oxidasa (AAO), (Stajic *et al.*, 2006). Posee una maquinaria enzimática muy compleja que le permite degradar los grandes polímeros (lignina y celulosa) que componen la madera (Kant, 2008).

Entre las enzimas ampliamente estudiadas se encuentra la lacasa que ha evolucionado para adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Rodríguez, 2005). Esta habilidad adaptativa es importante en términos de aplicaciones industriales, como por ejemplo, en la biorremediación de suelos para disminuir el contenido de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Eggen, 2000), en pretratamientos para mejorar la digestibilidad de residuos

lignocelulósicos empleados en la alimentación animal (Luna *et al.*, 2013), en el tratamiento y decoloración de colorantes industriales (Rodríguez *et al.*, 2006) y residuales urbanos (Delfin *et al.*, 2003).

Esta especie, ha sido una de las más relevantes y prometedoras, su cultivo como seta comestible a nivel mundial se encuentra entre los cuatro más expandidos; por sus facilidades para crecer sobre una gran diversidad de residuos agroindustriales y por lo simple de su tecnología de cultivo. (Martínez-Carrera *et al.*, 2010).

2.4. Biorrefinerías

El término ‘Biorrefinería’ supone la valorización, el fraccionamiento, o la extracción de varias fuentes de biomasa a través procesos físicos, biológicos y químicos para la producción de diversos productos y productos químicos derivados (Cárdenas *et al.*, 2012). Los principios básicos de una refinería de petróleo tradicional y una biorrefinería son representados esquemáticamente en la (Anexo E) (Kamm y Gruber, 2006; Fernández, 2006).

Las biorrefinerías lignocelulósicas (Anexo F) emplean madera, residuos agrícolas, cultivos energéticos y residuos municipales. Estos recursos son ideales en términos de costes reducidos y flexibilidad del recurso. Es el cambio de las instalaciones de bioetanol de segunda generación hacia un sistema de producción más avanzado con una mayor variedad de subproductos.

La conversión de biomasa a través de biorrefinería muestra un alto potencial de aplicación, principalmente motivado por la sostenibilidad del proceso y por el uso de material residual para la producción de energías alternativas y productos de alto valor añadido. Cabe destacar la gran variedad de productos obtenido en una biorrefinería debido a la diversidad de tipos de biomasa disponibles y a las diferentes tecnologías que pueden ser utilizadas para su desarrollo. (Anexos G y H).

Materiales y métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Producción de setas comestibles

Los experimentos fueron realizados en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente (CEBI), en la Planta de Investigación-Producción de Setas Comestibles con la tecnología establecida por García (1999) (Anexo I) y en condiciones controladas.

Los cuerpos fructíferos fueron obtenidos por fermentación en estado sólido, utilizando como sustrato la pulpa de café, y cáscara de cacao. La producción con la pulpa de café se evaluó durante 3 años. Todas las fases del cultivo se llevaron a cabo según los Procedimientos Normalizados de Trabajo de la Planta del CEBI (Anexo J). Las respuestas a obtener en todos los casos fueron: eficiencia biológica, rendimiento y producción de sustrato post cosecha, relación C/N, así como la bioconversión.

Cepas de *Pleurotus* spp.

Se utilizó la cepa de *Pleurotus* sp. (CCEBI-3024), depositada en la Colección de Cultivos del CEBI.

Inoculación

Se efectuó según los procedimientos normalizados, mezclándose de forma homogénea inóculo y sustrato pasteurizado, hasta lograr una buena distribución del micelio en todo el sustrato, siempre a razón de 10 % con relación al peso húmedo del sustrato y envasándose en bolsas de nylon transparentes de 30 cm de largo por 40 cm de ancho, con 2 kg de sustrato húmedo, evitando dejar espacios libres, se amarraron para lograr cierre, se les colocó una chapilla con un número de identificación para control de los parámetros productivos y se colocaron colgadas en estantes ubicados en el cuarto de incubación-colonización de la Planta Producción-Investigación del CEBI.

Las producciones se realizaron con 50 bolsas en cada ciclo de producción. La temperatura se reguló hasta mantenerla entre 26 – 28 °C, y se mantuvo el local en oscuridad, se realizaron observaciones periódicas a cada una de las bolsas.

Colonización

A los 15-20 días, el sustrato se observa parcial o totalmente blanco, en fase de colonización, el micelio fue cubriendo todo el sustrato, mostrándose un bloque compacto completamente blanco, entonces se procedió a cambiar las condiciones de la Planta y regular los parámetros para la fase de Fructificación.

Fructificación

En esta fase se realizaron cambios en las condiciones establecidas, se ajustan los parámetros propiciándose el crecimiento reproductivo del hongo, ocurriendo la estimulación y desarrollo de los primordios, estos cambios se presentan en el Anexo I.

Estas condiciones favorecen la inducción de esta fase para la aparición y el desarrollo de los primordios de los cuerpos fructíferos o carpóforos, observándose en cada uno de los lotes aproximadamente a los 5 días de la inducción un desarrollo exitoso de las setas.

Cosecha

Cuando los carpóforos se observaron bien desarrollados y totalmente extendidos, aproximadamente a los 5 días, se procedió a la cosecha siempre de forma selectiva, cosechándose los más grandes y dejando los pequeños o jóvenes, hasta que aumentaran de tamaño y peso. La cosecha se realizó entre 3 y 4 oleadas en cada lote y siempre de 2 formas: con un bisturí desinfectado con alcohol al 70 %, cortando el estípote justo a la base del tallo, en la unión con el sustrato o con las manos bien limpias o con guantes, se realizó una leve torsión para desprenderlo del sustrato, cuidando siempre no dañarlos, ni dejar hoyos en el sustrato

3.1.1. Parámetros de control en la producción de setas comestibles

En cada lote se tomó como muestra individualmente cada una de las bolsas inoculadas observándose y controlándose posibles contaminaciones, parámetros ambientales como temperatura, humedad relativa, intercambio de dióxido de carbono, y parámetros productivos como: tiempo de colonización, surgimiento de los primordios o precocidad, diámetro de los carpóforos, cantidad de setas producidas, producción promedio por bolsa, eficiencia biológica, rendimiento, tasa de producción y cantidad de sustrato remanente.

3.1.1.1. Precocidad (P)

Se define como el tiempo que transcurre entre el día de la inoculación y el día en que aparecen los primeros primordios.

Producción promedio por bolsas (PPb)

Definida como el total de setas frescas producidas entre el número de bolsas que produjeron.

$$PPb = \frac{\text{Total de setas frescas producidas}}{\text{Número de bolsas que produjeron}} \quad (1)$$

3.1.1.2. Eficiencia biológica (E.B.)

Determina el potencial biológico de los sustratos para la producción de hongos, y está definida como la relación en porcentaje del peso de las setas frescas cosechadas y el peso seco del sustrato de las bolsas productivas.

$$E.B. = \frac{\text{Peso de las setas frescas}}{\text{Peso del sustrato seco}} \cdot 100 \quad (2)$$

3.1.1.3. Rendimiento (R.)

Definido como la relación en porcentaje entre el peso fresco de las setas y el peso del sustrato húmedo.

$$R. = \frac{\text{Peso de las setas frescas}}{\text{Peso del sustrato húmedo}} \cdot 100 \quad (3)$$

3.1.1.4. Tasa de producción (T.P.)

Se define como la relación entre la Eficiencia biológica y el total de días del Ciclo productivo, se da en porcentaje.

$$T.P. = \frac{\text{Eficiencia biológica}}{\text{Días en ciclo productivo}} \cdot 100 \quad (4)$$

Estos parámetros son importantes porque permiten valorar la calidad del cultivo y su factibilidad económica, ya que, según establece esta tecnología los rendimientos deben ser superiores al 10 % y la eficiencia biológica debe alcanzar valores como mínimo del

40-50 %, lo cual determina que sea factible económicamente el proceso. (Tschierpe y Hartmann, 1977; Prata y Pani, 1995).

3.1.1.5. Bioconversión

La pérdida de la materia orgánica es el criterio más simple adoptado para evaluar la extensión de la biodegradación del sustrato, (Brock *et al.*, 2004) ya que concomitante con el crecimiento y fructificación de las setas sobre subproductos lignocelulósicos, se presenta un decremento en el contenido de materia orgánica. Esto es debido a las pérdidas de CO₂ y H₂O durante el metabolismo de los hongos y también a la remoción de materiales del sustrato por la formación de cuerpos fructíferos. La bioconversión se analizó según la expresión 5.

$$\text{Sustrato} + \text{Pleurotus} = \text{Setas obtenidas} + \text{Sustrato remanente} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \quad (5)$$

3.1.2. Producción del sustrato remanente

Posterior a las cosechas, después de tres o cuatro oleadas de producción, cuando se determina cerrar el ciclo productivo de las setas, al sustrato agotado se le denomina Pleurotina, sustrato remanente o sustrato post cosecha.

3.1.2.1. Composición del sustrato remanente

En el análisis de la composición del sustrato remanente se realizaron las determinaciones empleando las técnicas que convencionalmente se realizan: pH, materia orgánica, cafeína, polifenoles, cenizas, humedad, minerales, nitrógeno, fósforo, potasio, fibra bruta, carbohidratos, lignina. Los análisis se realizaron en el Laboratorio Regional de Suelos, ETICA y en el CEBI.

3.2. Análisis químicos y bromatológicos

3.2.1. Determinación de nitrógeno

Se determinó nitrógeno orgánico total, digiriendo las muestras según el método de Kjeldhal modificado (A.O.A.C, 1980), determinándose posteriormente el contenido de amonio mediante el método colorimétrico del indofenol, descrito en el Standard Methods (APHA, 1998).

3.2.2. Determinación de potasio

El potasio se determinó según el método de Smith modificado, reportado en la norma NC: 34:1999. La muestra seca y tamizada por malla de 0,25 mm es fusionada con una mezcla de cloruro de amonio y carbonato de calcio lo que permite liberar todas las formas de potasio presentes en la muestra.

Los resultados se expresan según ecuación 6.

$$K (\%) = \frac{(A-B) \cdot 250 \cdot 10^{-4}}{P} \quad (6)$$

Donde:

A: Contenido de potasio en mg/L de la muestra obtenido en el gráfico de calibración.

B: Contenido de potasio en mg/L del blanco obtenido en el gráfico de calibración.

10^{-4} : Factor de expresión en por ciento.

P: Masa de muestra pesada (g).

3.2.3. Determinación de fósforo

El fósforo se determinó según la norma NC: 34:1999, modificada para expresar el contenido como fósforo. La muestra seca y tamizada por malla de 0,25 mm se le realiza la digestión con una mezcla de ácido sulfúrico y ácido perclórico determinándose el contenido de fósforo por formación de un compuesto cromógeno del sistema vanado-molibdo-fosfórico.

El contenido de fósforo se calculó por la ecuación 7:

$$P(\%) = \frac{(A-B) \cdot V \cdot 100}{a \cdot M \cdot 10^3} \quad (7)$$

Donde:

A: Cantidad de fósforo obtenida por el gráfico de calibración (mg).

B: Cantidad de fósforo del blanco obtenido por el gráfico de calibración (mg).

V: Volumen de la solución de la muestra de trabajo (250 mL).

a: Alícuota medida (20 mL).

M: Masa de la muestra (g).

10³: factor para expresar como mg, 100: para expresar en porciento.

3.2.4. Determinación de materia orgánica

La determinación de la materia orgánica se realiza por el método de Walkley-Black (en Luna, 2013). La muestra es oxidada con K₂Cr₂O₇ y H₂SO₄ concentrado, realizándose determinación espectrofotométrica a 590 nm, empleando glucosa como patrón.

El cálculo de la materia orgánica se realiza según la ecuación 8.

$$MO(\%)=(A \cdot 100 \cdot 1,72)/(m \cdot P) \quad (8)$$

Donde: m = Pendiente (m = y / x)

y = Valor de la absorbancia

x = Valor de la concentración de carbono (%)

A = Absorbancia

P = Peso de la muestra en G

1,72 = Factor de conversión del C a MO (1/ 0.58)

3.2.5. Determinación de pH

Los valores de pH se determinaron utilizando el método potenciométrico (APHA, 1998)

3.2.6. Determinación de porcentaje de humedad

La pérdida de agua contenida en una muestra a temperatura 105 °C. (APHA, 1998)

3.2.7. Determinación de Cenizas Totales

La incineración de la porción de ensayo en una atmósfera oxidante y posteriormente se pesa el residuo obtenido (ISO 2171:2002).

3.2.8. Determinación de Cafeína

Para la determinación de cafeína se empleó el método espectrofotométrico UV (Shufen, 1990).

Se realizó previa extracción de la cafeína con cloroformo para su posterior lectura en espectrofotómetro a 225 y 275 nm contra blanco reactivo. La concentración se obtuvo a

través de la interpolación en la curva de calibración del resultado de la diferencia de lectura entre 225 nm y 275 nm, empleando como solución patrón ácido caféico.

3.2.9. Determinación de minerales

La composición de minerales se determinó en el Laboratorio Regional de Suelos, ETICA, siguiendo la metodología reportada en el Manual de técnicas analíticas y que se encuentran reportadas en (APHA, 1998).

3.2.10. Determinación de lignina

La determinación de lignina se realizó según Klasson (1974) con modificaciones de Templeton y Ehrman (1995).

Se basa en que la lignina es el componente de la biomasa lignocelulosa más insoluble en ácido sulfúrico, a diferencia de la celulosa y la hemicelulosa. Por lo que al hidrolizar esta biomasa con ácido, se puede determinar gravimétricamente el contenido de lignina de la muestra, una vez que se elimine el ácido.

Procedimiento

Se pesó 1,0 g de muestra seca en estufa a 105° C (P1). Luego se añadieron 15 mL de H₂SO₄ a un tubo de ensayo, enfriado a 4°C y se mezcló por 1 minuto con la muestra. Posteriormente, se hidrolizó por 2 horas a temperatura ambiente, removiendo cada 15 minutos para asegurar una mezcla completa. Se transfirió a un erlenmeyer y se diluyó el hidrolizado a una concentración ácida de un 3 % con 560 mL de agua destilada. Se refluxó durante 4 horas y se filtró al vacío la solución hidrolizada. Se secó el contenido del crisol a 105 °C en la estufa por 2 h o hasta un peso constante. Se enfrió en la desecadora y se registró el peso (P2) del crisol con la lignina insoluble en ácido y las cenizas insolubles en ácido. Se colocó el crisol con su contenido en la mufla y se calentó a 575 °C por un tiempo de 3 horas a una velocidad de 10 °C/min. Luego se enfrió en la desecadora y el peso del crisol y de la ceniza insoluble en ácido se registró como P3.

La lignina insoluble en ácido (LIA) se calcula según la ecuación 9.

$$LIA (\%) = \frac{P_2 - P_3}{P_1 \cdot (0,01 \cdot T_{final})} \cdot 100 \quad (9)$$

3.2.11. Determinación de fibra bruta

La determinación de la fibra bruta se realizó por el método gravimétrico (Luna, 2013).

Procedimiento

Se pesó un gramo de muestra libre de lípidos a la que se le adiciona 100 mL de una solución de H₂SO₄ al 5 % y se calentó por una hora. Luego de filtrar, se trasvasó el sólido a un vaso de precipitado al que se le adicionaron 100 mL de solución de NaOH al 5 %, calentándose por una hora nuevamente. Se filtró, realizando lavados con agua destilada hasta que no se observó reacción alcalina a la fenolftaleína. Se secó en estufa a 105 °C hasta peso constante. Para el cálculo se empleó la ecuación 10

$$FB (\%) = \frac{\text{Pesodelamuestraseca}}{\text{Peso de la muestra analizada}} \cdot 100 \quad (10)$$

3.2.12. Determinación de carbohidratos totales

Se empleó el método espectrofotométrico del fenol-sulfúrico empleando como patrón una solución de glucosa 50 mg/ L, según reporta Dubois *et al.*, (1956).

3.2.13. Determinación de fenoles

Se determinó el contenido de fenoles totales a través del método espectrofotométrico empleando el reactivo Folin-Ciocalteu (Barlocher y Graca, 2005).

La extracción de los compuestos fenólicos se realizó con agua destilada. Se tomó 0,5 mL de extracto y se le adicionó 5mL de Na₂ CO₃ al 2 % en Na OH 0,1 mol/L y se mezcló, luego de 5 minutos se añadió 0,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, mezclándose nuevamente. Se dejó en reposo durante 20 minutos en oscuridad y se leyó absorbancia a 760 nm. Se determinó concentración según curva de calibración de ácido tánico.

3.2.1.4. Determinación de la relación C/N

La relación C/N se determinó a partir de los resultados de materia orgánica (3.2.4) y de nitrógeno total (3.2.1). El porcentaje de carbono se calculó a partir de la expresión C(%)=0,58 x materia orgánica (Sánchez y Royse, 2002).

3.3. Análisis estadístico de resultados

Para la comparación de medias se realizó un contraste de hipótesis mediante la prueba t de Student. En el caso de la comparación de muestras múltiples se empleó un Análisis de Varianza y se determinaron las diferencias específicas empleando un Contraste Múltiple de Rangos, según la prueba LSD de Fisher. Todo el procesamiento estadístico se realizó empleando el software STATGRAPHICS PLUS 5.1.

Resultados y discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La selección de un sustrato para un proceso de fermentación sólida con el microorganismo de interés, puede incluir la evaluación de un gran número de materiales agrícolas, que permitan el crecimiento microbiano y la formación del producto (Pandey, 2000). En estos procesos pueden ser utilizados sustratos naturales o sintéticos, resultando los materiales orgánicos más aconsejables, los polímeros tipo polisacáridos, lignina, proteínas, etc. Constituyendo por lo general, la mayoría de los residuos agrícolas o agroindustriales de naturaleza celulósica o amilácea los más empleados en este tipo de proceso.

Sin embargo, los residuos agroindustriales lignocelulósicos para alcanzar un proceso exitoso, tanto desde el punto de vista ambiental, como económico deben de cumplir una serie de requerimientos, tales como (Saval, 2012):

- El residuo debe estar disponible localmente y en las cantidades necesarias para asegurar la fabricación del producto de interés.
- No tener otras aplicaciones o usos que compitan con el proceso que pretende promover.
- No requerir pretratamiento, y en caso de requerirlo que éste sea sencillo y económico.
- La disponibilidad del residuo debe permitir planificar el proceso para el cual se va a utilizar.
- No descomponerse fácilmente bajo las condiciones ambientales del sitio donde se genera.

La medida de la biodegradación deseada, puede valorarse con el empleo de diferentes parámetros, pero los más empleados son los que utilizan la determinación de la composición inicial y final de los sustratos, luego del proceso de fermentación, que permiten explicar y profundizar en las biotransformaciones ocurridas.

4.1. Biodegradación por *Pleurotus*

Las fermentaciones en estado sólido han sido utilizadas ampliamente en el reciclaje de materiales voluminosos a través de tecnologías sencillas, con la que se logran incrementar los valores proteicos, mejorando el balance de aminoácidos y la

digestibilidad de las materias primas empleadas (Morillo *et al.*, 2013; Luna *et al.* 2013 y Rodríguez *et al.* 2001a), brindando la posibilidad de producir, por vía biotecnológica y de forma combinada, setas comestibles *Pleurotus sp.* y forraje beneficiado (pleurotina); siendo la única tecnología que permite obtener mediante la bioconversión de subproductos agrícolas, alimento humano y alimento animal. (Chang, 2007).

Dentro de los sustratos lignocelulósicos de origen agroindustrial susceptibles de ser utilizados como sustratos en la FES, empleando *Pleurotus ostreatus*, se destacan: pulpa de café (Martínez, 2000), la paja de caña (Klibansky, 1993) la paja de arroz, hojas de plátano, (Romero, 2010), paja de maíz, (López *et al.*, 2005), diferentes tipos de hierbas; pulpa de café, la cáscara de cacao, cáscara de coco (Bermúdez, 2001) y cáscara de maní, (Ravera, 2008). Tabla 2

Ciertamente el *Pleurotus spp.* por las características que se han señalado puede utilizarse con éxito para la biodegradación de residuos primarios, en el momento de la cosecha (hojas y tallos de maíz, pajas de trigo, cebada, frijol, etc.) y para residuos secundarios, obtenidos en el proceso de post cosecha (bagazo caña, pulpa de café, cáscara de cacao, etc.). (Saval, 2012)

Estos materiales deben ser objeto de pretratamientos físicos y químicos, cuya finalidad es mejorar las características relacionadas con la porosidad del sustrato, su capacidad de retención del agua, nutrientes solubles y la posibilidad de las partículas de mantenerse libres sin formar grumos, ocurriendo una mayor transferencia de masa a través del sustrato y así propiciar la degradación deseada. Tablas 3 y 4

En la mayoría de los estudios al utilizar el *Pleurotus*, hongo comestible-medicinal, el interés es obtener una alta producción de setas comestibles y hacia ello es que se dirigen las condiciones de los experimentos, pero también hay investigadores que lo que desean es utilizar los sustratos biodegradados con diferentes fines: biodegradación de compuestos recalcitrantes y xenobióticos (Rodríguez, 2006) rompimiento de enlaces diversos, y por tanto, compuestos orgánicos, obtención de alimento animal, biorremediación de suelos, obtención de fertilizantes y otros, por ello es importante conocer el grado de biodegradación ocurrida.

Lo que destaca, de seleccionar esta tecnología para llevar a cabo la biodegradación, es que se cumple con los requerimientos de las tecnologías limpias, con un enfoque

actualizado, a partir de la necesidad de la producción de biocombustibles, aportar al establecimiento de las biorrefinerías, sobre todo con la oportunidad de obtener a partir de estos residuos, crudos enzimáticos de diverso efectos en la deslignificación de los diferentes sustratos y finalmente, sin lugar a dudas el aporte necesario al desarrollo sostenible.

Los agentes biológicos han sido usados para remover la lignina y aumentar la digestibilidad de los forrajes de baja calidad. Los hongos, basidiomicetos, en particular el *Pleurotus*, que tienen la capacidad de degradar la lignina en las paredes celulares y descomponer y mineralizar componentes celulares de las plantas, debido a que durante la colonización del sustrato por el hongo, éste tiene la potencialidad de llevar los carbohidratos a azúcares más simples, por el proceso de metabolismo fúngico o primario.

Los azúcares son consumidos totalmente por el hongo y entonces llegan al metabolismo secundario, el cual consiste en la ruptura de los carbohidratos estructurales y la lignina por las enzimas extracelulares como las lacasas, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa. Empleando el *Pleurotus* puede evaluarse el efecto sobre la composición química de los diferentes sustratos.

Los resultados obtenidos por Dante *et al* (2008), con el empleo del *Pleurotus pulmonarius* para cambiar la calidad nutritiva de la paja de trigo, constituyen un ejemplo de lo anteriormente planteado. En este estudio se determinaron materia seca, materia orgánica, proteína cruda, fibra detergente neutra, fibra detergente ácida, celulosa y hemicelulosa a la paja de trigo esterilizada, empleada como testigo y a la tratada con *Pleurotus pulmonarius*, no encontrándose diferencias significativas para la proteína bruta, materia seca y hemicelulosa, sin embargo, se encontró mayor porcentaje de materia orgánica, fibra detergente neutra y fibra detergente ácida. Tabla 5

Al modificar la estructura de la fibra, se incrementan los carbohidratos solubles, que cuando son ricos en ellos puede representar una importante fuente de energía para los rumiantes. Al romper la estructura del complejo carbohidrato-lignina, facilita el acceso de los microorganismos celulíticos a los carbohidratos estructurales y mejora la calidad y el valor nutritivo de la paja.

Tabla 5. Comparación de la composición de paja de trigo como sustrato inicial y el sustrato post cosecha en cultivo de *Pleurotus pulmonarius*.

Componentes (%)	<i>Paja de trigo sin inocular</i>	<i>Paja de trigo inoculado con Pleurotus pulmonarius</i>
<i>Materia seca</i>	96,43 ^a	96,54 ^a
<i>Materia orgánica</i>	83,87 ^b	88,07 ^a
<i>Proteína cruda</i>	4,42 ^a	4,78 ^a
<i>FDA</i>	40,38 ^b	45,81 ^a
<i>FDN</i>	61,44 ^b	67,25 ^a
<i>Hemicelulosa</i>	21,06 ^a	21,44 ^a
<i>Lignina</i>	11,45 ^b	8,50 ^a
<i>Cenizas</i>	16,13 ^a	11,93 ^b

Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas para un 95 % de confiabilidad..

Dante O, 2008

Las condiciones ambientales y la especie del hongo usado en el cultivo, tienen gran influencia en la composición química de los cuerpos fructíferos. Las variaciones ocurren principalmente en relación a los minerales y contenido de proteínas. Hay pocos estudios acerca de la composición de minerales en cultivos de hongos comestibles *Pleurotus*, de ahí la importancia del estudio realizado por Sales (2009), del cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre residuales forestales y bagazo de caña de azúcar, analizando los macros y microcomponentes de las materias primas y de los sustratos inicial y final (remanente).

Los sustratos posibilitaron la producción de un hongo rico en K, P, Mg e Fe, encontraron que el potasio fue el mineral de mayor contenido en el hongo en todos los sustratos ensayados (36,83-42,18 g·kg⁻¹). Hubo un aumento del contenido proteico y de minerales en el sustrato residual en relación al inicial, concluyendo que P, K, Fe y Mg son los minerales más importantes para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Los resultados muestran que la composición mineral de los hongos varía en dependencia del sustrato.

Resultados semejantes a los analizados anteriormente, se muestran en la biodegradación que se experimenta por el efecto de las enzimas del *Pleurotus*, en las investigaciones realizadas por Luna *et al.* (2013) que caracterizan las enzimas fibrolítica exógenas producidas por fermentación sólida en rastrojo de cebada inoculado con el hongo *Pleurotus ostreatus* (cepa IE8), así como su efecto en la composición química del rastrojo de cebada. Tabla 6

El análisis químico del rastrojo después de 30 días de fermentación reveló diferencias significativas con la composición original apreciándose, disminuciones del 2,42 %; 7,03 % y 3,79 % en los contenidos de fibra detergente neutro (FDN), hemicelulosa y lignina, respectivamente. Por su parte la proteína bruta aumentó un 0,86 % y la digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) pasó de 39,6 % a 42,3 % después de 30 días. Este estudio muestra la factibilidad de emplear procesos biotecnológicos simples directamente sobre el rastrojo de cebada para obtener enzimas con actividad fibrolítica que incrementen la digestibilidad de la materia seca in vitro, debido a la desestructuración de la fibra.

Otros autores evalúan la degradación de los sustratos a través de la variación en la concentración de algunos componentes (Ravera *et al.*, 2008) estudian la dinámica de desarrollo de *P. ostreatus* y su influencia sobre la degradación de lignina, con el empleo

Tabla 6. Composición química y digestibilidad in vitro de la materia seca del rastrojo de cebada a los 0, 8, 16 y 30 días de FES con *Pleurotus*.

<i>Parámetros (% base seca)</i>	<i>Día 0</i>	<i>Día 8</i>	<i>Día 16</i>	<i>Día 30</i>
<i>Materia seca</i>	96,1 ^a	96,1 ^a	95,9 ^a	96,1 ^a
<i>Materia orgánica</i>	88,5 ^a	88,1 ^{ab}	88,3 ^{ab}	87,8 ^b
<i>Proteína bruta</i>	3,1 ^b	3,4 ^b	3,3 ^b	4,0 ^a
<i>FDN</i>	75,1 ^{ab}	77,3 ^a	78,3 ^a	72,7 ^b
<i>FDA</i>	51,8 ⁸	53,8 ^b	57,9 ^a	56,7 ^a
<i>Lignina</i>	21,1 ^a	20,4 ^a	21,3 ^a	17,3 ^b
<i>DIVMS (24 h)</i>	39,6 ^b	42,8 ^a	40,1 ^b	42,3 ^a

Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas para un 95 % de confiabilidad..

Luna L, *et al.*, 2013

de cáscara de maní como sustrato durante toda la etapa de crecimiento del hongo, ya que su crecimiento produce la degradación de la misma, además de setas comestibles.

Se determinó la composición del sustrato: al final de la invasión fúngica (incubación), post cosecha (fructificación) y solo incubación (no se lo traslada a cámara de fructificación) hasta el final de la experiencia.

Se comprueba que el hongo durante el tiempo de incubación consume compuestos más simples o fáciles de degradar como hemicelulosa, oligosacáridos y proteínas incrementando el porcentaje relativo de lignina presente como también de cenizas totales. Durante la etapa de fructificación se produce una disminución de pectinas, oligosacáridos y claramente de lignina (Figura 3). Esto expresa que la fructificación es la etapa principal en la degradación de lignina, por lo que es importante conocer más sobre la preparación del soporte para incrementar la reducción de lignina y la eficiencia biológica en la producción de setas.

Muchos son los lugares en la región oriental y otras de Cuba donde se cultiva el coco (*Cocos nucifera. Lin*), su producción se dedica a la industria de confitura y a la obtención de aceites, se reporta utilidad de la cáscara para la obtención de carbón activado (MINAGRI, 1993). Actualmente no existe ningún tratamiento reportado con estos subproductos para producir alimento, y su disposición final en el terreno de cultivo o formar vertederos en muchos lugares, trae aparejado una descomposición, hasta que se fermenta espontáneamente o por el ataque de microorganismos del medio ambiente, generando y proliferando plagas entre los cultivos y el suelo.

Los reportes del empleo de la cáscara de coco, pura y mezclada, cultivada por *Pleurotus sp.* (Bermúdez, 2001 y García, 2008) como vía más atractiva y económicamente viable, con una eficiencia biológica del 90 %; en la Tabla 7 se observa que es el sustrato de menor bioconversión comparado con la cáscara de cacao y la pulpa de café, resultado que puede explicarse por la composición química (ver Tabla 2), ya que tiene el mayor porcentaje de lignina.

Pulpa de café y cáscara de cacao

Teniendo en cuenta la composición química y bromatológica de la pulpa de café y la cáscara de cacao, que las hacen atractivos para ser empleados en la FES, por sus altos contenidos de lignina, celulosa y hemicelulosa y sobre la base de su gran disponibilidad,

Tabla 7. Bioconversión de sustratos estudiados y su comparación con otros autores
(Martínez, 2000)* (Hechavarría, 2005)**

<i>Sustratos</i>	<i>Setas</i>	<i>Sustrato remanente</i>	<i>CO₂ y H₂O</i>
<i>Pulpa de café</i>	31,3	35,2	33,5
<i>Cáscara de cacao</i>	20,6	27,9	51,5
<i>Cáscara de coco**</i>	12,4	70,3	17,3
<i>Pulpa de café*</i>	17,0	27,0	56,0

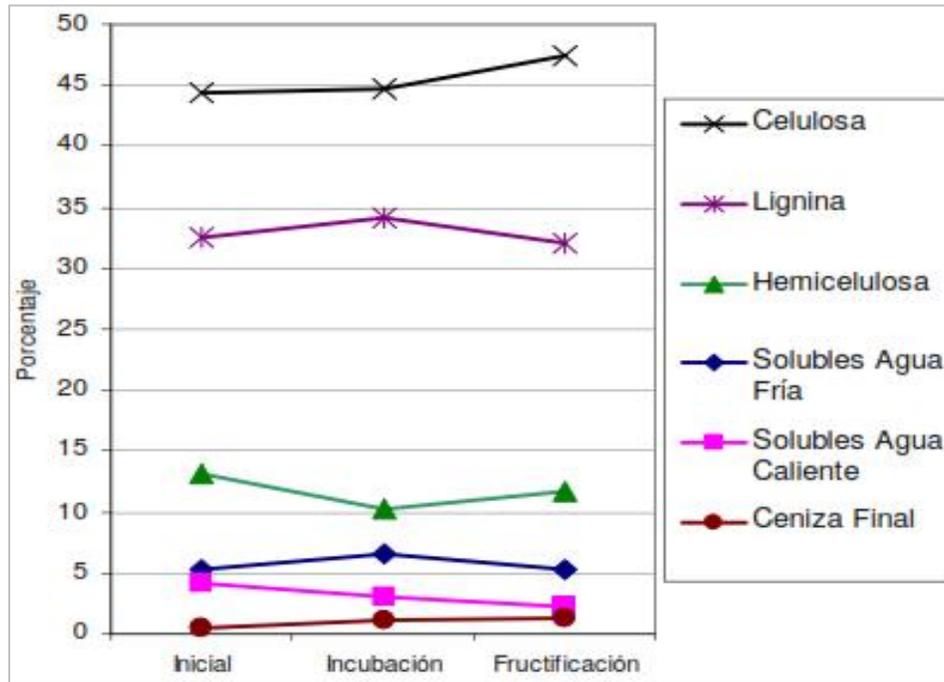


Figura 3. Variaciones de los componentes en las diferentes etapas del ciclo productivo en FES con el empleo de *Pleurotus* sobre cáscara de maní (Ravera, 2008).

cultura y tradición en la región del cultivo de ambas especies en grandes volúmenes, además de conocer que estos residuales son vertidos de forma indiscriminada al terreno de cultivo sin tratamiento alguno, ocasionando grandes problemas ambientales, se les selecciona para su estudio en este trabajo.

En la Tabla 2 se presentan niveles de concentración de lignina, celulosa y hemicelulosa de varios sustratos empleados en FES, reportándose que el contenido oscila en un intervalo de 12,2-17,5 % de lignina; 17,7-18,0 % de celulosa y 0,98-2,00 % de hemicelulosa para la pulpa de café. La cáscara de cacao presenta 10,8 % de lignina y 12,4 % de celulosa. El hongo emplea los sustratos lignocelulósicos y carbohidratos en su actividad metabólica produciendo una disminución del contenido de carbono, que en muchos casos se convierten en dióxido de carbono al llegar la degradación a mineralización total.

Otro de los parámetros a tener en cuenta a la hora de evaluar un sustrato, es la eficiencia biológica, es decir, la eficiencia del microorganismo en el proceso de bioconversión del sustrato en biomasa, como se puede apreciar en la Tabla 3 ambos sustratos reportan elevados niveles de eficiencia biológica en las condiciones de trabajo de la planta de producción investigación del CEBI.

4.1.1. Biodegradación de la pulpa de café

Para realizar la evaluación de la biodegradación de la pulpa de café, se seleccionaron los datos históricos recogidos en el control de calidad de la Planta de Producción investigación del CEBI, en los 3 últimos años. Los resultados de su eficiencia biológica se encontraron dentro del intervalo de 120-130 % y la producción de setas por encima de 30 kg, luego de cosechar tres oleadas y en un tiempo establecido de 50-55 días. (Tabla 8). Se considera que la eficiencia biológica es directamente proporcional a la biodegradación del sustrato.

Los niveles de bioconversión obtenidos en este trabajo, de 30,0 – 34,3 % de setas, superiores a los valores reportados por García (2008) y por Martínez (2000) (Tabla 7), reflejan la eficiencia del proceso fermentativo, aunque se debe señalar que el resultado reportado por Martínez (2000), se obtuvo en condiciones rurales y se realizó el cálculo teniendo en cuenta la cosecha hasta la segunda oleada.

Tabla 8. Producción de setas comestibles y sustrato remanente empleando pulpa de café.

Lotes	2	3	4	9
<i>Días de cultivo</i>	47	60	51	55
<i>Precocidad (d)</i>	17	16	17	15
<i>Producción promedio de setas frescas (g/bolsas)</i>	681,2	620,4	689,2	622,9
<i>Total de setas frescas (kg)</i>	30,1	31,0	31,0	34,3
<i>Rendimiento (%)</i>	34,4	31,0	34,5	31,1
<i>Eficiencia biológica (%)</i>	131,1	119,3	132,5	129,1
<i>T (1/d)</i>	2,9	1,9	2,6	2,3
<i>Pleurotina húmeda (%)</i>	33,8	41,0	31,1	41,9
<i>Pleurotina seca (%)</i>	11,0	8,5	7,0	9,4

Al realizar una comparación de la composición porcentual de la pulpa de café y el sustrato remanente (Tabla 9) se aprecia que existen variaciones en los parámetros evaluados luego de ser biodegradado por el hongo, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros evaluados con excepción, de la materia seca y los niveles de humedad, a pesar de que luego del proceso de fermentación se le debe haber incorporado parte de la masa micelial al sustrato, pero si se tiene en cuenta que en la composición de la masa micelial existe un elevado porcentaje de agua (Brock, 2004) su aporte no debe ser significativo.

En cuanto a los valores obtenidos de fibra bruta, de un $17,66 \pm 0,12$ % de contenido en la pulpa de café, hubo una disminución en el sustrato remanente en valores que oscilan entre $12,25 \pm 0,1$ – $14,87 \pm 0,12$ %, existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos sustratos (Tabla 9), lo que evidencia la actividad biodegradadora del hongo en este tipo de sustrato. Se considera además que la fibra bruta es la materia recalcitrante más difícil de ser degradada y constituye una barrera de acceso del hongo al sustrato (Osmarini, 2012).

Las enzimas hidrofóbicas que son producidas por el micelio del hongo, catalizan la degradación de las moléculas en unidades más pequeñas, las cuales son utilizadas por el hongo como nutrientes. (Holker y Lenz, 2005, Rahardjo *et al.* 2006), por lo que se reportan muchos trabajos donde se evalúa la degradación en función de la disminución de la fibra bruta.

Resultados similares son reportados por (Garzón *et al.* 2012), utilizando como sustrato bagazo de caña y hojas de roble, reportando una disminución de 6,25 % para hojas de roble y 7,31 % para el bagazo de caña, recomendando su uso para la alimentación de animales poligástricos. Bermúdez (2001) reporta para pulpa de café una disminución de un 9 %, superior al resultado obtenido en este trabajo.

Al evaluar la variación de la concentración de lignina que ocurre entre el sustrato inicial y el sustrato remanente, se observan diferencias estadísticamente significativas, al encontrarse los niveles de concentración en la pulpa en $12,79 \pm 0,04$ % y luego del proceso de fermentación alcanzan un intervalo de $8,13 \pm 0,02$ % a $11,01 \pm 0,04$ %, corroborando los resultados anteriormente evaluados de los criterios sobre la capacidad del *Pleurotus* de degradar estos polímeros tan complejos.

Tabla 9. Comparación entre la composición bromatológica de la pulpa de café y su pleurotina (% base seca).

<i>Análisis</i>	<i>Pulpa café</i>	<i>Sustrato remanente lote 2</i>	<i>Sustrato remanente lote 3</i>	<i>Sustrato remanente lote 4</i>	<i>Sustrato remanente lote 9</i>
<i>Humedad</i>	10,31 ^a ±0,09	12,81 ^a ±0,09	11,83 ^a ±2,5	12,33 ^a ±1,02	13,75 ^a ±2,5
<i>Materia seca</i>	89,69 ^a ±0,2	87,19 ^a ±0,3	88,17 ^a ±0,17	87,67 ^a ±0,3	86,25 ^a ±1,3
<i>Materia orgánica</i>	82,52 ^a ±0,1	78,45 ^c ±0,05	78,72 ^c ±0,21	77,71 ^d ±0,25	77,75 ^d ±0,25
<i>Grasa cruda</i>	5,98 ^a ±0,07	4,53 ^b ±0,03	5,20 ^c ±0,09	5,53 ^d ±0,03	6,12 ^e ±0,12
<i>Fibra bruta</i>	17,66 ^a ±0,12	12,25 ^b ±0,1	14,42 ^c ±0,2	13,74 ^d ±0,23	14,87 ^e ±0,12
<i>Carbohidratos</i>	58,24 ^a ±0,3	45,26 ^c ±1,2	52,24 ^b ±1,5	50,89 ^b ±0,34	49,78 ^b ±0,87
<i>C/N</i>	17,00 ^a ±0,43	14,25 ^b ±0,15	13,23 ^c ±0,03	13,55 ^c ±0,05	13,65 ^c ±0,05
<i>Cenizas</i>	7,17 ^a ±0,07	8,74 ^b ±0,04	9,53 ^c ±0,13	10,02 ^d ±0,06	8,50 ^e ±0,06
<i>Lignina</i>	12,79 ^a ±0,04	10,29 ^b ±0,03	8,13 ^c ±0,02	11,01 ^d ±0,04	9,75 ^e ±0,07
<i>Cafeína</i>	1,75 ^a ±0,05	0,03 ^b ±0,02	0,04 ^b ±0,005	0,01 ^b ±0,001	0,06 ^b ±0,01
<i>Fenoles</i>	0,3 ^a ±0,02	0,09 ^b ±0,01	0,06 ^b ±0,02	0,08 ^b ±0,03	0,13 ^b ±0,09

Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas.

Muchos autores dan seguimiento a la biodegradación de los sustratos lignocelulósicos por la variación en la concentración de los carbohidratos. Durante el proceso de fermentación, el hongo consume primeramente los compuestos más simples (Ravera, 2008) como las pectinas, hemicelulosa y los sacáridos simples en la fase de crecimiento micelial, mientras que la lignina es degradada en la fase de fructificación; al comparar los resultados presentados en la (Tabla 9), dónde se refleja la concentración de carbohidratos solubles en la pulpa y el sustrato remanente, se observó una disminución en el contenido de los mismos 58,24±0,3 % reportados para la pulpa hasta un intervalo de a 52,24±1,5 - 45,26±1,2 % , cuestión ésta que tiene su causa en el hecho de que los mismos son consumidos por el hongo y que tiene correspondencia con lo planteado por Ravera *et al.* (2008).

Por otra parte, dada la importancia que tiene el carbono para la célula, elemento que más se utiliza durante el crecimiento y desarrollo de *Pleurotus* spp., además puede ser

asimilado a partir de diferentes fuentes como polímeros, carbohidratos y lípidos, es que uno de los parámetros más empleados es la determinación de la relación C/N.

Como se puede observar en la Tabla 9, el sustrato inicial presenta un valor de $17,00 \pm 0,43$ % mientras que el sustrato remanente oscila entre en un intervalo de $13,23 \pm 0,03$ a $14,25 \pm 0,15$ %, cuestión que está sustentada por una disminución del contenido de carbono en forma de dióxido de carbono dado por el metabolismo del hongo.

Sánchez *et al.* (2002) encuentran relación entre la disminución de la relación C/N con el aumento en la eficiencia biológica en cepas de *P. ostreatus* (CCMC H-041 e IE-8) y *P. pulmonarius* (IE-115) en mezclas con altos contenidos de madera de vid. Estos autores reportan una disminución en la relación C/N en los residuales de post cosecha después de incubar por 25 días *P. sajor-caju* en paja de cebada (25,6 %), bagazo de caña de azúcar (61,9 %) y hojas de plátano (57,1 %), en estas variaciones pueden influir las condiciones de cultivo como: la cepa empleada y el tipo de sustrato.

La materia orgánica disminuye (Tabla 9) de $82,52 \pm 0,1$ % en sustrato inicial hasta un intervalo que oscila entre $77,75 \pm 0,25$ - $78,72 \pm 0,21$ %, inferior a lo reportado por otros autores para desechos urbanos (Delfin, 2003), con una disminución superior al 80 %; correspondiendo la mayor reducción a la etapa de colonización del sustrato (primeras cuatro semanas). Los resultados indican que la mayor parte de la materia orgánica original fue mineralizada y liberada al ambiente en forma de CO₂ y vapor de agua.

En cuanto a la composición de macro y micro elementos (Tabla 10), se observa que ocurre un aumento en la concentración de sodio, fósforo, hierro, y potasio, disminuyendo la concentración de calcio, reportándose diferencias estadísticamente significativas para un 95 % de confiabilidad para todos los elementos evaluados en sustrato remanente con respecto al sustrato inicial. En investigaciones realizadas por Sales (2009), se ha demostrado que existe dependencia de la composición de las setas comestibles y los sustratos en que se cultiva, que proviene principalmente del tipo de planta, aunque también son importantes otros factores como la variedad, el grado de madurez, el manejo, la fertilidad del suelo, la época de siembra, la ocurrencia de heladas, etc., que influyen en el desarrollo en general de las plantas y en consecuencia en la constitución nutrimental de ellas en un momento dado, por lo que sigue siendo

Tabla 10. Composición de minerales de la pulpa de café y el sustrato remanente

(% base seca).

<i>Minerales</i>	<i>Pulpa de café</i>	<i>Pleurotina de café</i>
<i>Calcio</i>	0,48 ^a	0,38 ^b
<i>Sodio</i>	0,70 ^a	1,14 ^b
<i>Fósforo</i>	0,15 ^a	0,23 ^b
<i>Hierro</i>	0,70 ^a	1,38 ^b
<i>Magnesio</i>	0,05 ^a	0,08 ^b
<i>Potasio</i>	1,43 ^a	1,93 ^b
<i>Cobre</i>	Trazas	0,04
<i>Manganeso</i>	0,34 ^a	0,73 ^b
<i>Zinc</i>	0,04 ^a	0,96 ^b
<i>Níquel</i>	Trazas	Trazas
<i>Cobalto</i>	Trazas	Trazas

Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas. Para 95% de confiabilidad

motivo de estudio por los investigadores, la composición del sustrato a emplear, analizando los macro y micronutrientes de sustrato inicial y post cosecha.

En la investigación realizada por Rodríguez *et al.* (2005), se presenta un análisis comparativo de los sustratos iniciales y post cosecha del cultivo de *Pleurotus* de tres especies diferentes (*Pleurotus sajor caju*, *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*) sobre pulpa de café y mezclas con aserrín del tallo del café, encontrando que cada especie tiene una capacidad diferente de degradación de los sustratos, y que está ligada a su naturaleza enzimática. Tabla 11

Para el caso de la pulpa de café, la especie que mostró la mayor capacidad de degradación del sustrato fue *P pulmonarius*. Con esta especie la relación C/N cambió de 49 a 23, seguida de *P. ostreatus* donde el sustrato pasó de una relación C/N inicial de 37 a 21 en el sustrato agotado, y la cepa de *P. saju caju* mostró la menor capacidad de degradación pasando el sustrato de una relación C/N de 34 a una de 28. Varios estudios han mostrado que durante el cultivo de las especies *Pleurotus*, los complejos lignocelulósicos, son descompuestos por el micelio del hongo. En este proceso el CO₂ libre es expulsado y la relación C/ N disminuye.

También para pulpa de café, el mayor incremento en el contenido de proteína en el sustrato post cosecha, con respecto al sustrato fresco, fue para *P. Pulmonarius*, que a su vez presentó el mayor contenido de proteína en su cuerpo reproductor (29,30 %), seguido de *P. ostreatus* y *P. sajor-caju*, presentando una relación directa entre el contenido de pleurotina de los cuerpos reproductores y del sustrato post cosecha.

El incremento en el contenido de proteínas del sustrato post cosecha, aunado a la degradación de la lignina que hacen las especies de *Pleurotus*, aumentando la digestibilidad del residuo, abren la posibilidad de poderlo utilizar en la alimentación animal. Herrera y Saldíña (1999), afirman que el residuo el cultivo de hongos puede ser utilizado en la alimentación de rumiantes debido a sus propiedades probióticas, que ayudan a la asimilación de los alimentos.

Por otra parte, cuando los residuos tienen una relación C/N superiores a 20, estos no pueden ser utilizados como fertilizantes orgánicos, ya que la relación indica que el material aún no está descompuesto, estabilizado y apto para ser usado en el campo como fertilizante orgánico. Cuando la relación C/N está en el rango entre 10 y 12, su pH

Tabla 11. Análisis bromatológicos y de minerales de sustratos antes y después del cultivo de *Pleurotus* spp.

Determinación (%)	<i>Pleurotus sajorcajú</i>						<i>Pleurotus pulmonarius</i>		<i>Pleurotus ostreatus</i>	
	Pulpa de café		Aserrín de tallo de café		Pulpa + aserrín de café		Pulpa de café		Pulpa de café	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
<i>Cenizas</i>	2,85	3,60	1,45	2,02	2,79	2,65	11,22	6,76	6,89	8,34
<i>Proteína</i>	11,43	13,62	3,44	4,82	7,17	6,42	7,13	16,13	10,08	16,94
<i>N_T</i>	1,83	2,18	0,55	0,77	1,15	2,06	1,14	2,58	1,61	1,71
<i>Fibra</i>	31,18	33,00	67,30	70,30	56,05	59,47	11,75	20,07	13,17	22,64
<i>Grasa</i>	4,83	3,15	4,98	4,42	1,69	1,03	1,71	3,68	2,39	1,58
<i>C:N</i>	34	28	113	81	81	54	49	23	37	21
<i>P</i>	0,04	0,04	0,01	0,01	0,03	0,01	0,08	0,06	0,12	0,08
<i>Ca</i>	0,09	0,46	0,36	0,46	0,46	0,95	0,40	0,86	0,36	1,01
<i>K</i>	0,42	0,22	0,04	0,04	0,04	0,20	3,46	1,66	2,69	2,24

A: antes D: después

Rodríguez y Jaramillo (2005)

cercano a la neutralidad (6-8) y tiene apariencia de suelo es que se puede utilizar como fertilizante orgánico.

Otro aspecto interesante que se observa en el análisis del parámetro eficiencia biológica para la valoración de la biodegradación de la pulpa de café, es el realizado por García, 2008. Los resultados se presentan en las Tablas 12 y 13, se observa como en las cepas que presentan mayor eficiencia biológica son las menores productoras de enzima, lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa, las cuales al medirse al término de los 60 días, podría explicarse que son consumidas durante el proceso de fructificación. Sin embargo, los resultados obtenidos con la utilización de residuales de café (Rodríguez, 2006) y residuales de algarrobo, aserrín y otros (Montoya y Restrepo, 2009), muestran que se presentan diferentes isoenzimas que son las que condicionan la biodegradación

La aplicación de la pulpa de café para la alimentación animal o como abono, no se ha desarrollado, debido principalmente a la presencia de componentes tóxicos y recalcitrantes como los polifenoles. La cafeína produce efectos antifisiológicos en el animal, mientras que los taninos tienen la capacidad de interactuar con las proteínas provocando una disminución de su valor nutritivo. En la Tabla 9 se reportan valores de concentración de cafeína de $1,75 \pm 0,05$ % y de fenoles de $0,3 \pm 0,02$ % para el sustrato inicial evidenciándose una disminución estadísticamente significativa en el sustrato remanente con valores que oscilan en el intervalo de 0,01- 0,06 para la cafeína y 0,13 – 0,06 para los fenoles.

La disminución de la concentración de los fenoles totales y de la cafeína de la pulpa de café está asociada con la producción de la enzima lacasa, la cual puede ser responsable de esta transformación (Rodríguez, 2006), junto a otras enzimas, que se expresan en menor actividad; se conoce que la pulpa de café está compuesta, entre otros, por lignina y compuestos aromáticos con estructura química semejante a esta, los cuales son inductores de enzimas lacasas.

Investigaciones realizadas por García (2008), empleando las columnas de Rimbault para el desarrollo de la fermentación en estado sólido con *Pleurotus*, muestran que existe una disminución del contenido de fenoles totales del sustrato por las dos cepas estudiadas, siendo evidente desde las primeras 24 horas la disminución de la concentración de

Tabla 12. Eficiencia biológica, tasa de producción.

<i>Cepas CCEBI</i>	<i>Eficiencia biológica (%)</i>	<i>Días de producción</i>	<i>Tasa de producción (%)</i>
3021	204,36±33,9 ^d	60	3,41±0,0 ^{cd}
3022	33,17±16,0 ^a	54	0,62±0,31 ^a
3023	148,22±25,0 ^c	55	2,70±0,49 ^{bc}
3024	195,38±11,7 ^{cd}	45	4,35±0,32 ^{de}
3025	95,33±29,9 ^b	51	1,87±0,61 ^b
3027	225,23± 42,9 ^d	50	4,50±0,81 ^e

*Se reflejan los valores promedios de tres réplicas y la desviación estándar. Letras iguales para un mismo parámetro, refiere no existencia de diferencias estadísticas significativas entre las medias de las cepas (Prueba de Duncan, $p < 0,05$).

Tabla 13. Actividades enzimáticas de lacasa, manganeso peroxidasa y versátil peroxidasa de las cepas de *Pleurotus* spp. luego de 60 días de cultivo sobre pulpa de café.

<i>Cepas</i>	<i>Actividad enzimática (10²) Ug⁻¹ sustrato seco</i>		
	<i>Lacasa</i>	<i>Manganeso peroxidasa</i>	<i>Versátil peroxidasa</i>
<i>CCEBI 3021</i>	7,27±0,11 ^a	2,86±0,31 ^b	4,77±0,08 ^a
<i>CCEBI 3022</i>	9,60±0,25 ^c	3,58±0,31 ^b	8,65±0,08 ^e
<i>CCEBI 3023</i>	13,97±0,41 ^d	5,89±0,31 ^c	8,68±0,08 ^e
<i>CCEBI 3024</i>	7,47±0,04 ^a	2,5±0,31 ^a	5,60±0,08 ^c
<i>CCEBI 3025</i>	7,57±0,04 ^a	3,64±0,31 ^b	5,10±0,08 ^b
<i>CCEBI 3027</i>	8,43±0,01 ^b	6,75±0,31 ^c	6,58±0,08 ^d

Se reflejan los valores promedios de tres réplicas y la desviación estándar. Letras iguales para una misma actividad enzimática, refiere no existencia de diferencias estadísticas significativas entre las medias de las cepas (Prueba de Duncan, $p < 0,05$).

estos compuestos tóxicos y luego durante el resto de los días de la fermentación a un nivel casi constante de la concentración.

La cepa CCEBI 3023 presentó mayores niveles de biotransformación (53,07 % de fenoles totales transformados a las 24 horas) que la cepa CCEBI 3024 (45,51 %, a las 48 horas). La disminución máxima de concentración de cafeína se observó al séptimo (último) día estudiado, los valores de remoción de cafeína, independientemente de la escala de fermentación, oscilaron entre 15-24 %.

La disminución del contenido de fenoles del sustrato durante el ciclo de cultivo de *Pleurotus* spp., es un aspecto importante en la adaptación de la cepa a éste, lo cual pudiera acelerar la colonización y como consecuencia decrece el riesgo de contaminación con mohos. Por otra parte mejora las características para el empleo del sustrato remanente (pleurotina) como alimento animal y fertilizante orgánico.

En los estudios realizado por Job D. (2004) se evalúa la capacidad de la cepa industrial HK35 de *Pleurotus ostreatus* de fructificar en diferentes sustratos que contienen de 17,8 a 55% de borra de café industrial mostrando que la incorporación al sustrato de hasta un 55% de esta borra de café, no disminuye la capacidad de fructificar ni el rendimiento del *Pleurotus*. Además, el análisis de la cafeína efectuado en el sustrato indica que la misma es degradada hasta un 59 % por el micelio y que ésta no es incorporada en las fructificaciones recogidas, indicando su degradación.

Este resultado de Job y col (2004) coincide con los obtenidos por Garcia (2008), sin embargo Nieto (2007) reporta la no degradación de la cafeína sobre pulpa de café por el *Pleurotus sajor- caju*, poniendo de nuevo en evidencia los diferentes comportamientos en los procesos de biodegradación de las especies de *Pleurotus*)

Interesante resulta para la implementación de biorrefinería con el empleo de las enzimas de *Pleurotus* sobre pulpa de café el trabajo realizado por Arone (2015), el cual se muestra a continuación.

La obtención y concentración de crudos enzimáticos por fermentación en estado sólido y sumergida para su aplicación en el pre-tratamiento del bagazo de caña, fue evaluando el crecimiento fúngico, por gravimetría y espectrofotometría, empleando hongos del género *Pleurotus* y *Trametes*, durante 15-20 días.

Del crecimiento fúngico en FS se obtuvo $1,38\pm 0,01$ y $0,40\pm 0,02$ (mg/mL) de biomasa seca para *Trametes sp.* y *Pleurotus sp.*, a los 12 días de inoculado el medio; mientras que se detecta al 6^{to} día $1,42\pm 0,02$ y $1,53\pm 0,18$ (U/mL) de actividad lacasa, respectivamente. En la FES *Pleurotus sp.*, mostró mayor crecimiento en pulpa de café con valores de 300,5 y 1,10 mg/g de biomasa seca y quitina, respectivamente. Por otro lado, *Trametes sp.*, mostró una mayor actividad lacasa con un valor de $27,70\pm 0,44$ U/g en el crudo *Trametes* en pulpa de café.

Los crudos enzimáticos de este hongo (*Trametes* en bagazo de caña, *Trametes* en pulpa de café) mostraron mejor eficiencia en la deslignificación del bagazo con un 53,9 y 67,1 % para el crudo no concentrado; 73,7 y 80,2 %, con el concentrado. Además, una mayor liberación de azúcares reductores con valores de 4,36 y 5,35 g/L, respectivamente.

A los productos de hidrólisis obtenidos del pre-tratamiento se le inoculó la levadura *Kluveromyces marxianus* CCEBI 2011, lográndose una fermentación alcohólica cuya eficiencia fue de 82,1-87,3 %, y el etanol formado alcanzó valores de 4,23 - 4,83 g/L; demostrando la viabilidad del pretratamiento enzimático para la obtención de bioetanol.

4.1.2. Biodegradación de la cáscara de cacao

Para el cultivo del cacao con *Pleurotus* se siguió la metodología implementada en la Planta de Producción Investigación del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (Bermúdez *et al.*, 2001), a diferencia de la pulpa de café, la humedad de las cáscaras de cacao debe estar entre un 60-70 %, para que la colonización del micelio sea completa y eficiente, esto se logra realizando un proceso de secado solar del sustrato previo a la inoculación. Todos los parámetros del cultivo se corresponden con los establecidos para la pulpa de café.

Una de las principales características de los subproductos de cacao es la poca probabilidad de asentamientos por parte de otros microorganismos, es decir, prácticamente no existe una contaminación de éste, a pesar de exponerlo al medio ambiente durante el proceso de secado. Esto resulta una ventaja para este sustrato por encima de otros subproductos que pueden sufrir fácilmente una contaminación.

Se produjeron cuatro cosechas de forma estable, como se puede apreciar en la Tabla 3 en el cultivo de este hongo sobre cáscara de cacao se obtienen valores de eficiencias

biológicas (84 %) inferiores a los resultados obtenidos en el cultivo de *Pleurotus* empleando pulpa de café.

Como se planteó anteriormente, uno de los métodos más empleados para evaluar la biodegradación de un sustrato es la comparación de las concentraciones de sus constituyentes en el sustrato inicial y el sustrato remanente, evidenciándose en todos los parámetros evaluados diferencias estadísticamente significativas para un 95% de confiabilidad. Tabla 14

Tabla 14. Comparación entre la composición bromatológica de la cáscara de cacao y el sustrato remanente.

<i>Parámetros (%)</i>	<i>Cáscara de cacao</i>	<i>Sustrato remanente</i>
<i>Humedad</i>	10,20±0,05 ^a	18,81±0,04 ^b
<i>Materia seca</i>	89,80±0,3 ^a	81,19±0,11 ^b
<i>Materia orgánica</i>	80,50±0,03 ^a	75,03±0,08 ^b
<i>Grasas</i>	9,78±0,28 ^a	7,99±0,04 ^b
<i>Proteína</i>	5,50±0,25 ^a	13,87±0,12 ^b
<i>Fibra bruta</i>	23,00±0,1 ^a	19,22±0,23 ^b
<i>Carbohidratos</i>	56,28±0,28 ^a	52,75±0,25 ^b
<i>N_T</i>	0,88±0,04 ^a	2,27±0,12 ^b
<i>C/N</i>	53,10±0,1 ^a	19,57±0,55 ^b
<i>Cenizas</i>	9,30±0,02 ^a	6,18±0,19 ^b
<i>Cafeína</i>	1,09±0,02 ^a	0,01±0,002 ^b
<i>Polifenoles</i>	0,06±0,002 ^a	0,0070±0,002 ^b

La pérdida de la materia orgánica es el criterio más simple adoptado para evaluar la extensión de la degradación del sustrato, al comparar los datos presentados, se pone de manifiesto una disminución de la materia orgánica de un 5,47 % al variar los niveles de materia orgánica de un 80,5±0,3 % a 75,03±0,08 %, similar a lo ocurrido con la pulpa de café y en correspondencia con lo reportado por Rodríguez (2005), pues, concomitante con el crecimiento y fructificación de las setas sobre subproductos lignocelulósicos, se presenta un decremento en el contenido de materia orgánica, lo cual se debe a las pérdidas de CO₂ y H₂O durante el metabolismo de los hongos y también a la remoción de materiales del sustrato por la formación de cuerpos fructíferos.

Al evaluar los resultados obtenidos de fibra, se puede observar que ésta representa un 23±0,1 % de la materia seca en la cáscara de cacao y que disminuyó en 3,78 %, confirmando la capacidad degradadora del *Pleurotus* y que se encuentra en

correspondencia con lo reportado por Bermúdez (2003) y lo obtenido cuando se emplea pulpa de café como sustrato.

Los valores de proteína se incrementa en el sustrato remanente en la FES de las cáscaras de cacao, coincidiendo con los resultado para los sustratos post cosechas reportados para otros sustratos (Varnero, 2010), cuestión que confirma la calidad para ser utilizado en la alimentación animal, pudiendo compararse favorablemente con otros residuos utilizados con este objetivo. Es importante señalar, que el aumento en el contenido de proteína se debe a las pérdidas de materia seca en forma de CO₂ del sustrato y restos de micelio que quedan aún presentes en éste, datos similares se reporta por Hechavarría (2005) y Bermúdez (2003).

La relación C/N disminuyó de 53,10±0,1 % reportado para el sustrato inicial a un 19,57±0,57 % en el sustrato remanente; resultado que se explica por el incremento relativo de la concentración de nitrógeno total, como consecuencia de la disminución del contenido de carbono en forma de desprendimiento de dióxido de carbono. Esto último está asociado a la actividad microbiológica desarrollada en el interior del sustrato, y principalmente por el uso de fuentes de carbono presentes en el mismo para el desarrollo y producción del hongo.

En la composición de la cáscara de cacao se encuentran compuestos anti fisiológicos y tóxicos como los polifenoles y la cafeína, cuestión ésta que limita su utilización como alimento animal, sin embargo se puede apreciar que luego de ocurrida la fermentación en el sustrato remanente existe una disminución del contenido en aproximadamente un 1,08 % para la cafeína y 0,051 % para los polifenoles, resultados que están en correspondencia con los reportado por Hechavarría (2005) y García (1999) para éste mismo sustrato.

Existen reportes que evidencia una dependencia entre la composición del sustrato empleado en los procesos de fermentación y el hongo crecido en el mismo. En la Tabla 15 se puede observar una disminución estadísticamente significativa solamente en los niveles de concentración de calcio, sodio, en el sustrato remanente, Sin embargo todos los restantes minerales aumentan, como ocurre en la pulpa de café.

Para evaluar la bioconversión en el sustrato de cáscara de cacao se siguió el mismo procedimiento que el utilizado cuando se empleó pulpa de café (Tabla 7). Se realizó el

Tabla 15. Comparación entre la composición de minerales de la cáscara de cacao y le residual remanente obtenido (% base seca).

<i>Minerales</i>	<i>Cáscara de cacao</i>	<i>Sustrato remanente</i>
<i>Calcio</i>	0,91 ^a	0,50 ^b
<i>Sodio</i>	0,16 ^a	0,11 ^b
<i>Fósforo</i>	0,67 ^a	0,28 ^b
<i>Hierro</i>	0,70 ^a	1,38 ^b
<i>Magnesio</i>	0,05 ^a	0,08 ^b
<i>Potasio</i>	1,43 ^a	1,93 ^b
<i>Cobre</i>	Trazas	0,04 ^b
<i>Manganeso</i>	0,34 ^a	0,73 ^b
<i>Zinc</i>	0,04 ^a	0,96 ^b
<i>Níquel</i>	Trazas	Trazas
<i>Cobalto</i>	Trazas	Trazas

Letras iguales refiere no existencia de diferencias estadísticas significativas para un 95 % de confiabilidad.

balance de materiales, el cual evidencia la fermentación en estado sólido de las cáscaras de cacao y su comparación con otros sustratos empleados en la FES. Los valores de bioconversión cuando se emplea cáscara de cacao son inferiores a los reportados para la pulpa de café.

Por la importancia que tiene el basidiomiceto *Pleurotus* spp. en las investigaciones que se desarrollan en nuestra institución, debido a la facilidad de su cultivo por los pocos requerimientos que exige, los resultados mostrados deben conllevar a la generalización de la tecnología de las setas comestibles-medicinales para los residuales semejantes a la pulpa del café y la cáscara de cacao, en particular en nuestro país (Chang, 2007; Phillipoussis, 2011).

Del estudio realizado, podemos afirmar que el éxito del proceso de biodegradación deseado va a depender, en gran medida, de la degradación que ocurra en los sustratos, en este caso, sustratos lignocelulósicos, los cuales como se ha visto anteriormente (Anexo A, B, C, D), poseen una composición y estructura compleja. Se ha demostrado que existe dependencia de la composición de las setas comestibles y los sustratos en que se cultiva, que influyen en el desarrollo, en general de las plantas y en consecuencia en la constitución nutrimental de ellas en un momento dado, por lo que sigue siendo motivo de estudio por los investigadores, la composición del sustrato a emplear, analizando los macro y micronutrientes de sustrato inicial y sustrato remanente.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

1. La valoración realizada de diferentes sustratos puros y mezclados, evidenció la importancia que tiene la composición química y las características físicas de los sustratos, para el desarrollo y crecimiento del *Pleurotus* spp. y por tanto para la biodegradación de los mismos.
2. Existen algunos factores que muestran relación directa o indirecta con la biodegradación de los sustratos, hallazgos que son indicadores y pueden servir de guía, pero no se deben considerar como condicionantes absolutos, ya que estas investigaciones reafirman que la degradación de los sustratos por los hongos del género *Pleurotus* está sujeta a la influencia de múltiples factores , entre ellos, actividad enzimática, interacción de micelio y sustrato, genotipo de la cepa, condiciones ambientales y estudio morfo genético del cultivo.

Recomendaciones

6. RECOMENDACIONES

Continuar los estudios sobre la biodegradación de los residuos lignocelulósicos, prestando atención a la determinación de las isoformas de lacasa.

Referencias bibliográficas

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertó E; Pire D; Lechner B y Alvaraz C. (2003). Producción de *Pleurotus ostreatus* empleando 13 desechos lignocelulósicos Disponibles en la Argentina. Bol. Soc. Argent. Bot. 38, (supl.). Micología y Liqueología. XXIX. Jornadas Argentinas de Botánica y XV Reunión Anual de la Sociedad Botánica de Chile.
- Alexopoulos C.J., Mims C.W. y Blackwell M. (1996). Introductory Mycology, 4th Edition. John Willy and Sons Inc., New York, p. 860.
- Álvarez C. (2012) Aprovechamiento integral de materiales lignocelulósicos. Revista Iberoamericana de Polímeros. Vol. 13(4), pp. 140-150.
- APHA (American Public Health Association) American Water Works, A. W. E. F. (1998). Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20th Edition, Washington D.C, USA. p. 1124.
- Arone M.A. (2015). Pre-tratamiento biológico del bagazo con hongos ligninolíticos para la obtención de bioetanol. Trabajo de Diploma, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente.
- Baldrian P. y Valášková V. (2008). Degradation of cellulose by *Basidiomycetes fungi*. FEMS Microbiol. Rev. No. 32. pp. 501-521.
- Bermúdez R.C., Ramos I., Donoso C., García N., Martínez C.E.(2002). Fermentación sólida de la cáscara de cacao por *Pleurotus* spp. Tecnología Química. Vol. XXII, No.3, pp. 17-21.
- Bermúdez R.C. y García N. (2010). Cultivo de setas comestibles (*Pleurotus*) en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Cuba. En: Hacia un desarrollo sostenible del Sistema de producción-Consumo de los hongos Comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Martínez-Carrera D, Curvetto N, Sobal M, Morales P y Mora V.M, eds. Puebla: Colegio de Postgraduados; pp. 488-512.
- Bermúdez R.C., García N., Gross P. y Serrano M. (2001). Cultivation of *Pleurotus* on agricultural substrates in Cuba. Micología Aplicada International. 13 (1), pp. 25-29.

- Bermúdez R.C., Morris H.J., Donoso C., Martínez C.E., Ramos E.I (2003). Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus var. florida*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. Vol. 22 No. 4. pp. 226-231.
- Bermúdez R.C., García N., Serrano M., Rodríguez M., Mustelier I. (2014). Conversión de residuales agroindustriales en productos de valor agregado por fermentación en estado sólido, Tecn. Quím, Vol. XXXIV, No 3, pp. 217-225.
- Bressani R., (1979). Pulpa de café: composición, tecnología y utilización. Edición Española, Bogotá, Colombia, p.152.
- Bressani R., (1989) Utilización de los subproductos del café para otros fines industriales. Resúmenes de café 6, 12.
- Brock T., Madigan M., Martinko J., Parker J. (2004) Biology of microorganisms. Eight edition. Prentice- Hall Internatinal. Inc., Englewood cliffs. New Jersey.
- Cárdenas R. (2012) Biorrefinerías para la producción de biocombustibles de segunda generación. Tesis doctoral. Universidad politécnica de Valencia.
- Cardona L. (2001). Anotaciones acerca de la bromatología y el cultivo de hongo comestible *Pleurotus Ostreatus*. Crónica Forestal del Ambiente, No 16, pp. 99-118.
- Carlile M., Watkinson S., Gooday G. (2001). The fungi. Second Edition. London: Academic Press, pp. 588.
- Chang S. T. (2007). Mushroom cultivation using the “Zeri” principle: potential for application in Brazil. Micología Aplicada Internacional, Vol. 19, No. 2, pp. 33–34.
- Chang S.T. y Miles P.G. (1992). Mushroom biology: a new discipline. The Mycologist, No. 6, pp. 64-65.
- Cuervo L., Falch J.L., Quiroz R.E. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. BioTecnología, Vol. 13, No. 3.
- Dahara I., Nor-Hawani S., Lim S. H., Rosma A., and Haritharan W. (2013). Pomelo peels as alternative substrat for extracellular pectinase production by *Aspergillus niger* HFM-8, Malaysian J. microbiol. Vol. 9, No. 4, pp. 308-316.
- Dante O. (2008) Uso de *Pleurotus pulmonarius* para cambiar la calidad nutritiva de la paja de trigo. I. Efecto en la composición química. Interciencia. Vol. 33, No. 6, pp. 435-438.

- Delfín I., Durán C. (2003) Biodegradación de residuos urbanos lignocelulósicos por *Pleurotus*. Rev Int Contam Ambient.; No. 19, pp. 37-45.
- Dubois M., Guilles K., Hamilton J. K., Robert P.A y Smith F. (1956). Colorimetric Methods for determination al sugar and related substances. Anal. Chem. No. 20, pp. 350-356.
- Ebringerova A., Hromadkova Z, Heinze T. (2005). Hemicellulose. Adv. Polym. Sci. No. 186, pp. 1-67.
- Eggen, T. (2000) Bioremediation of recalcitrant aromatic organic pollutants with white rot fungi agricultural University of Norway, Jordforsk, Norway, pp. 53-68.
- Espinosa V; Delfín R.; Hernández T.; Andrade O. y González E. (2000). Posibilidad de cultivo de *Pleurotus* sobre un desecho doméstico. En: memorias del I Simposio Latinoamericano del Cultivo de Hongos Comestibles. Xalapa.
- Fan L. A. Soccol T., Pandey A. Soeeol C. R. (2003). Cultivation of *Pleurotus* mushrooms on Brazilian coffee husk and effects of caffeine and tannic acid. Micologia Aplicada International. Vol. 15, No 1, pp. 15-21
- Fernández S., Adhikari S., Chandrapal C., Murali N., (2006). Biorefineries: Current Status, Challenges and a Future Direction. *Energy & Fuels*. No. 20, pp. 1727-1737
- Ferraz A. L. (2004). Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: Espósito, E.; Azevedo, J. L. (Org). Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caixas do sul: EDUCS. pp. 215-242.
- García N., (2008). Producción de setas comestibles y enzimas lacasas por fermentación en estado sólido de la pulpa de café con *Pleurotus spp*. Tesis de Doctor en Ciencias Técnicas. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, p. 150.
- García N. “Producción de setas comestibles *Pleurotus ostreatus* sobre subproductos del café y del cacao”. 1999. Tesis de Máster en Biotecnología, Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.
- Garzón J.P., Cuervo J.L. (2012). Producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia. Ciencias Biomédicas ISSN 1794-2470 Vol. 6, No.10.

- Grabber J.H. (2005). How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Sci.* No. 45, pp. 820–831.
- Gutiérrez M., y Favela, E., (1993). Curso de fermentación en medio sólido. Biotecnología para el aprovechamiento de residuos agroindustriales y municipales. UAM – Iztapalapa. Dpto. de Biotecnología. México.
- Morris Quevedo H.J, Llauradó Maury G., Lebeque Pérez Y., Fontaine Álvarez R., Bermúdez Savón R., Garcia N., Gutiérrez Muñoz A. (2012). Capítulo VI. Otros Usos de los Macromicetos en Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica: investigación y desarrollo en un entorno multicultural. Editores José E. Sánchez y Gerardo Mata INECOL-ECOSUR México. ISBN-978-607-7637-73-8
- Hatakka A.; Hatakka T.K, Lundell T,; Galkin S,; Maijala P,; Kalkkinen N. (2005). Manganese peroxidases, laccases, and oxalic acid from the selective White rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips, *Enzyme and Microbial Technology.* No. 36, pp. 461-468.
- Hatakka A.; Itavaara M., Vikman A.; Tuomela M. (2000). Biodegradation of lignin a compost environment: a review. *Bioresource technology.* No. 72, pp. 169-183.
- Hechavaria M. (2005) Estudio de sustratos y sus mezclas en la fructificación de *Pleurotus* sp. Tesis de Máster en Biotecnología, Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.
- Herrera Y., Sardiñas R. (1901) Ensilaje de pulpa de café. Seminario internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera. Manizales.
- Holker V. y Lenz J. (2005) Solid- State fermentation are there any biotechnological advantages. *Current opinion in Microbiology.* No. 8, pp. 301- 306
- ISO: 2171: 2002 (publicado por la ISO, 1993). Determination of total ash. Comité estatal de Normalización, nivel central, La Habana, Cuba.
- Job D. (2004) Use of coffee spent industry residues for production of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.Fr.) Kummer in solid state fermentation. *Rev Iberoam Micol* 2004. No. 24, pp. 195-197
- Joselau J.P., Ruel K. (1994). Wood polysaccharides and their degradation by fungi. En: *Host Wall Alterations by Parasitic Fungi.* (Eds) O.P.G.B.O. Editor. APS Press: Minnesota. p. 334-387.

- Julián M.C. y Ramos L.B. (2007). Fermentación en estado solido (i). Producción de alimento animal. Tecnología Química. Vol. XXVII, No. 3, pp. 17-22
- Kamm B.; Gruber P.R.; Kamm M. (2006). Biorefineries–Industrial Processes and Products. Wiley-VCH, ISBN: 3-527-31027-4, Weinheim, Germany.
- Kant K. y Chander R. (2008) Laccase: enzyme revisited and function redefined. Indian J. Microbiol. No. 48, pp. 309-316.
- Klibansky M. (1993). Production of *Pleurotus ostreatus* mushrooms on sugar cane agrowaster. Acta Biotechnol. No. 13, pp. 71-78.
- Laureano L., Teymouri F., Alizadeh, H., Dale, B.E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. Appl. Biochem. Biotechnol, No. 67, pp. 1081–1099.
- Leonowicz A., Matuszewewska A., Luterek J., Ziengenhagen D., Wojtas_wasilewska, M., Cho, N. (2001). Biodegradation of lignin by white_rot fungi. Fungal.
- López Caba E., Ancona Méndez L., Medina Peralta S. (2005). Cultivo de *Pleurotus djamor* en condiciones de laboratorio y en casa rural tropical. Rev. Mexicana de Micología. No. 21, pp. 93-97
- Luna F. (2013), “Efecto de residuos agroforestales parcialmente degradados por *Pleurotus ostreatus* sobre el desarrollo de plántulas de tomate”. Acta Biológica Colombiana. Vol. 18, No. 2, pp. 365-374.
- Luna L., Meneses M., Mendosa G. (2013). Efecto de la actividad enzimática de *Pleurotus* en pared celular de rastrojo de cebada. Livestock Reserarch for rural Development. Vol. 25, No. 12, pp. 56-61.
- Martínez D., Curvetto N., Sobal M., Morales P., Mora V.M. (2010). Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Eds. D. Martínez N. Curvetto M. Sobal, P. Morales y V. M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. ISBN 970-9752-01-4.
- Martínez D. (1987). Desing of a mushroom faro for growing *Pleurotus* on coffe pulp. Mush. J. Tropics. No. 7, pp. 13-23.

- Martínez D., Aguilar A., Martínez W., Bonilla M., Morales P., Sobal M. (2000). Commercial production and marketing of edible mushrooms cultivated on coffee pulp in Mexico. Chapter 45. In *Coffee Biotechnology and Quality*; Sera T., Soccol C. R. Pandey A.; Roussos S. (eds) Kluwer Dordrecht, pp. 471-488.
- Martínez A. (2002). Molecular biology and structure-function of lignin-degrading hemeperoxidases enzyme. *Microbiology Technology*. No. 30, pp. 425-444.
- MINAGRI, 1993. Subproductos del cacao y coco: Posibilidades y perspectivas de su uso. Ministerio de la Agricultura, La Habana.
- Montoya S., Restrepo G.M. (2009). Evaluación del desarrollo vegetativo y la producción de carpóforos de las cepas de los hongos *Pleurotus* spp y *Lentinus edodes* sobre varios residuos agroindustriales. Informe final de Proyecto. Universidad Católica de Manizales. Grupo de Investigaciones Biológicas.
- Morillo M., Roberty R., Vélez M. (2013) Utilización del hongo *Pleurotus sapidus*. en la degradación lignocelulósica del rastrojo de maíz para la elaboración de abono en la agricultura orgánica. Tesis de pregrado.
- Muñoz C., Guillén F., Martínez A., Martínez M. (1997). Laccas isoenzymes of *Pleuroyngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Appl Environ Microbiol*. No. 63, pp. 2166-2174.
- Mustelier I. (2010) Aprovechamiento de la pleurotina como abono orgánico. Tesis de Máster en Biotecnología, Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.
- NC:34: 1999. Calidad del Suelo. Determinación de fósforo y potasio.
- Nieto Ramírez I.J. (2007). Incorporación de cafeína en el hongo *Pleurotus sajor-caju* cultivado sobre pulpa de café. *Revista Iberoamericana de Micología*. Vol. 24, pp. 72-74
- Omarini A, (2012). Producción intensiva sobre desechos lignocelulósicos, análisis nutricional y cualidades organolépticas de *Polyporus tenuiculus* (*Polyporaceae*, Basidiomycetes). Biodeterioro y biotransformación del sustrato. Tesis Doctoral en Biología Molecular y Biotecnología. Instituto tecnológico de Chascomus. Universidad Nacional General San Martín. Argentina, pp. 182.

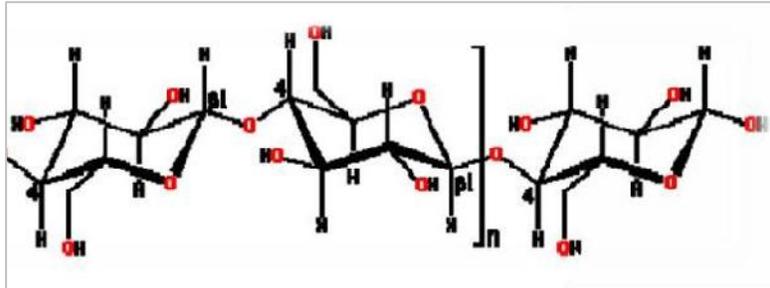
- Pandey A., Soccol C.R., Nigam P., Brand D., Mohan R., Roussos S. (2000) Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 6, No. 2, pp. 153-162.
- Papinutti L. (2003). *Enzimas lignolíticas en Fomes sclerodermeus*. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires Argentina.
- Peralta R., Sousa C.; Boer, C. As principais oxireductases de uso industrial. In: Said. S.; Pietro, R. (2004). *Enzimas como agentes biológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa. Capítulo 10. p. 412.
- Pérez N., Torrado A., López C., Postrana L. (2003). Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Environmental Agriculture and Food Chemistry*. Vol 2, No 3, pp. 343-350.
- Phillippoussis A. (2011), "Agro-food industry wastes and agricultural residues conversion high value products by mushroom cultivation". *Proceeding of 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products* (Arcachon, France, 4-7 October, 2011). Vol. 1, pp. 344-356.
- Prata A. K. y Pani B. K. (1995). Evaluation of banana leaf as a new alternate substrate to paddy straw for oyster mushroom cultivation. *Journal of Phytopathology Research*. No. 8, pp. 145-148.
- Prinsen P. (2010). *Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas*. Tesis de Maestría en opción al Título Académico de Máster en Estudios avanzados en Química. Universidad de Sevilla.
- Raghavarao S. M. S., Ranganathan, T. V., Karanth, N. G. (2003). Some engineering aspects of solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. No. 13, pp. 127-135.
- Rahardjo Y., Tranper M., Rinzema A. (2006). Modeling conversion and transport phenomena in solid- state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnology advances*. No. 24, pp. 161-179.
- Ramirez J., Clifford M. (2000). Coffee pulp polyphenols: an overview. In: *Coffee Biotechnology and Quality*. Sera T., Soccol C.R., Pandey A., Roussos S. (eds) Kluwer Dordrecht, pp. 471-488.

- Ravera C., Bettera C., Fernández M. (2008). .Aprovechamiento de los residuos agrícolas. Procesamiento de la caja del maní, su conversión biológica y productos. I Simposio Iberoamericano de Ingeniería de Residuos. REDISA. Castellón 23-24 de julio de Rivera R.L, Martínez C.A, Morales. (2013). Luna Azul ISSN 1909-2474. No. 37.
- Rodríguez Valencia, N; C Jaramillo.. (2005). Cultivo de hongos comestibles del genero *Pleurotus* sobre residuales agrícolas de la zona cafetera. Cenicafé. Boletín Técnico. No 27, pp. 39-41.
- Rodríguez S. (2006). Decoloración de los residuales de la Pasteurización de la pulpa de café y la vinaza por *Pleurotus sp.* Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas. CEBI. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente.
- Rodríguez Z; Elías A; Bocourt R y Nuñez O. (2001a). Efecto de niveles de nitrógeno ureico en la síntesis proteica durante la fermentación de mezcla de caña (*Saccharum officinarum*) y boniato (*Ipomea batata* Lam.). Rev cubana. Cienc. agric. No. 35, pp. 29.
- Romero O., Huerta M., Damián M. G. (2010). Evaluación de la capacidad productiva de *Pleurotus ostreatus* con el uso de hojas de plátano (*mersa paradisiaca I. , CV .Roaton*) deshidratada en relación con otros sustratos agrícolas. Agrom. Costarricense. Vol. 34, No. 1.
- Sales C. (2009) “Mineral composition of raw material, substrate and fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* in culture”. Interciencia. Vol 34, No. 6, p 432-436.
- Sánchez J., Royse D. (2002). La biología y el cultivo del *Pleurotus spp.*, ed. S.A. E.L. México. p. 288.
- Sarmiento M. (2011). Alternativas de compostaje de aserrín de pino Caribe. (*Pinus caribaea*) en la industria maderera Refocosta S.A., municipio de Villanueva, Casanare, Colombia. RIAA. Vol. 2, No. 2, pp. 21-32.
- Saval S. (2012) Aprovechamiento de residuos agroindustriales. Pasado, presente y futuro. BioTecnología. Vol. 16, No. 2, pp. 14-46.

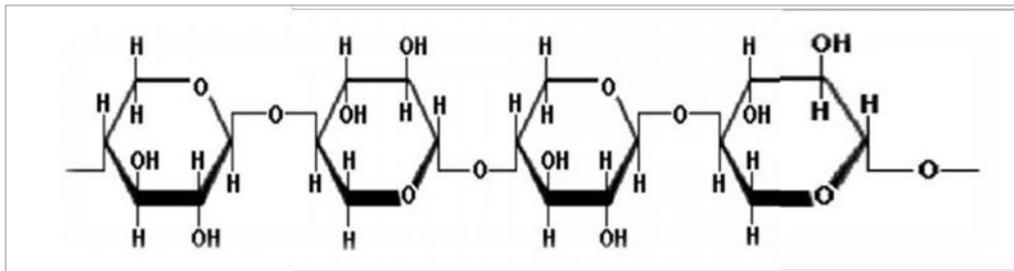
- Serrano M. (2012). Conversión de pulpa de café en productos de alto valor agregado por *Pleurotus* sp. Tesis de Máster en Biotecnología, Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.
- Shufen L.I., Berger J. and Hartlano S., 1990. Analitic Chimia Acta. No. 232, pp. 409-412.
- Stajic M., Persky L., Friesemb D., Hadar Y., Wasser S., Nevo E., Vukojevic J. (2006). Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. Enzyme and Microbial Technology. No. 38, pp. 65-73.
- Templeton D., Ehrman T. (1995). Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass Chemical Analysis and Testing Task Laboratory Analytical Procedure, pp. 2-13.
- Tschierpe, H. y Hartmann K. (1977). A comparison of different growing methods. Mushroom Journal. No. 60, pp. 404-416.
- Valášková V., Baldrian P. (2005). Estimation of bound and free fractions of lignocellulose degrading enzymes of wood-rotting fung *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. Research in Microbiology. No 25, pp. 1-6.
- Varnero M. T., Quiroz M. (2010). Utilización de Residuos Forestales Lignocelulósicos para Producción del Hongo Ostra (*Pleurotus ostreatus*) Información Tecnológica. Vol. 21 No. 2, pp.: 13-20.

Anexos

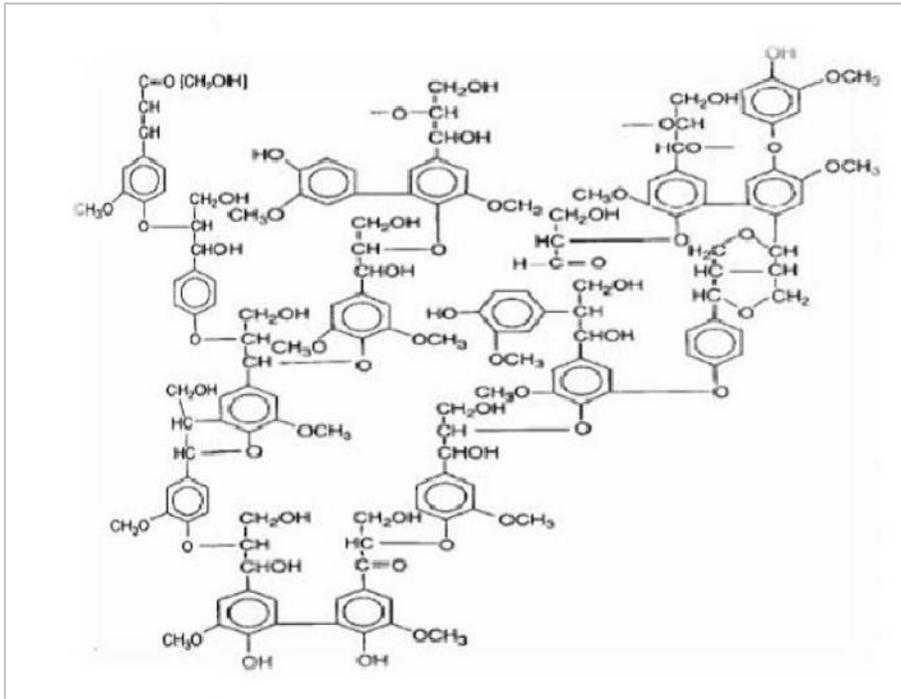
ANEXOS



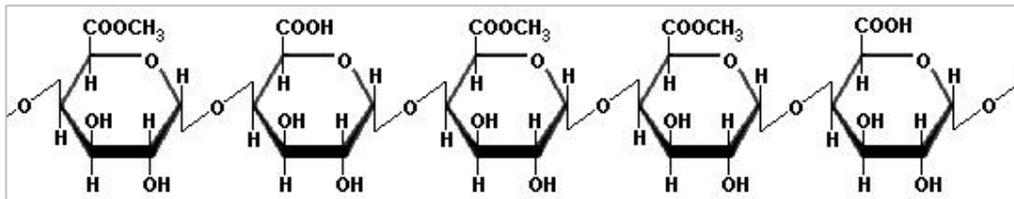
A. Estructura parcial de la Celulosa cristalina.
(Fuente: Ferraz, 2004)



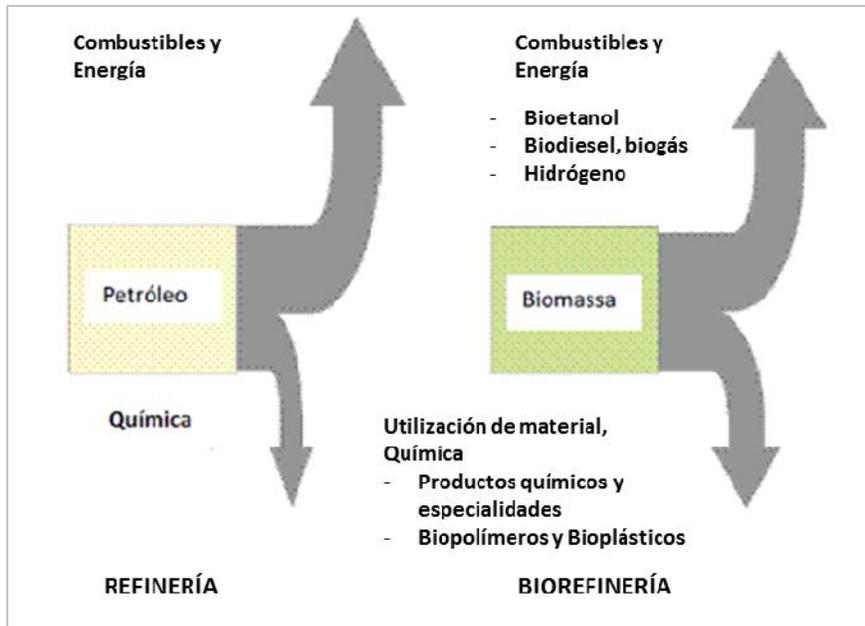
B. Segmento de estructura plana de la hemicelulosa.
(Fuente: Ramírez *et al.*, 2000)



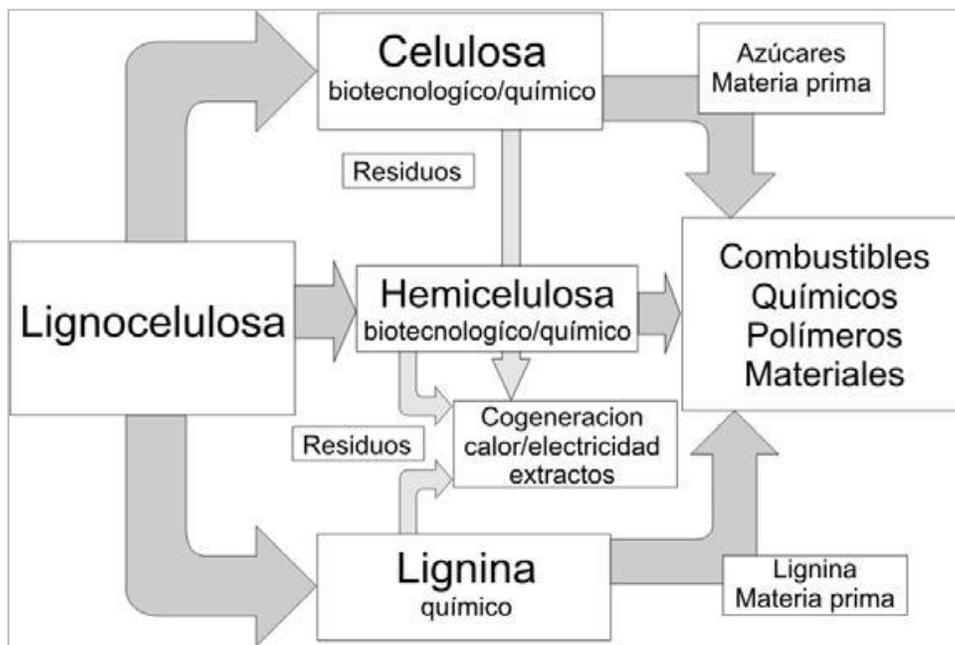
C. Estructura propuesta para la lignina.
(Fuente: Ramírez *et al.*, 2000)



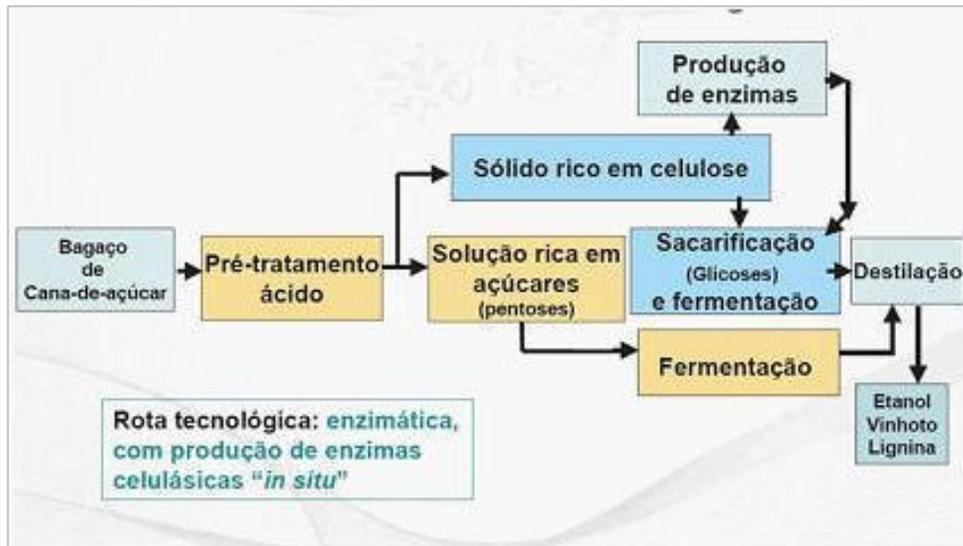
D. Segmento de estructura de la pectina.
(Fuente: Ramírez *et al.*, 2000)



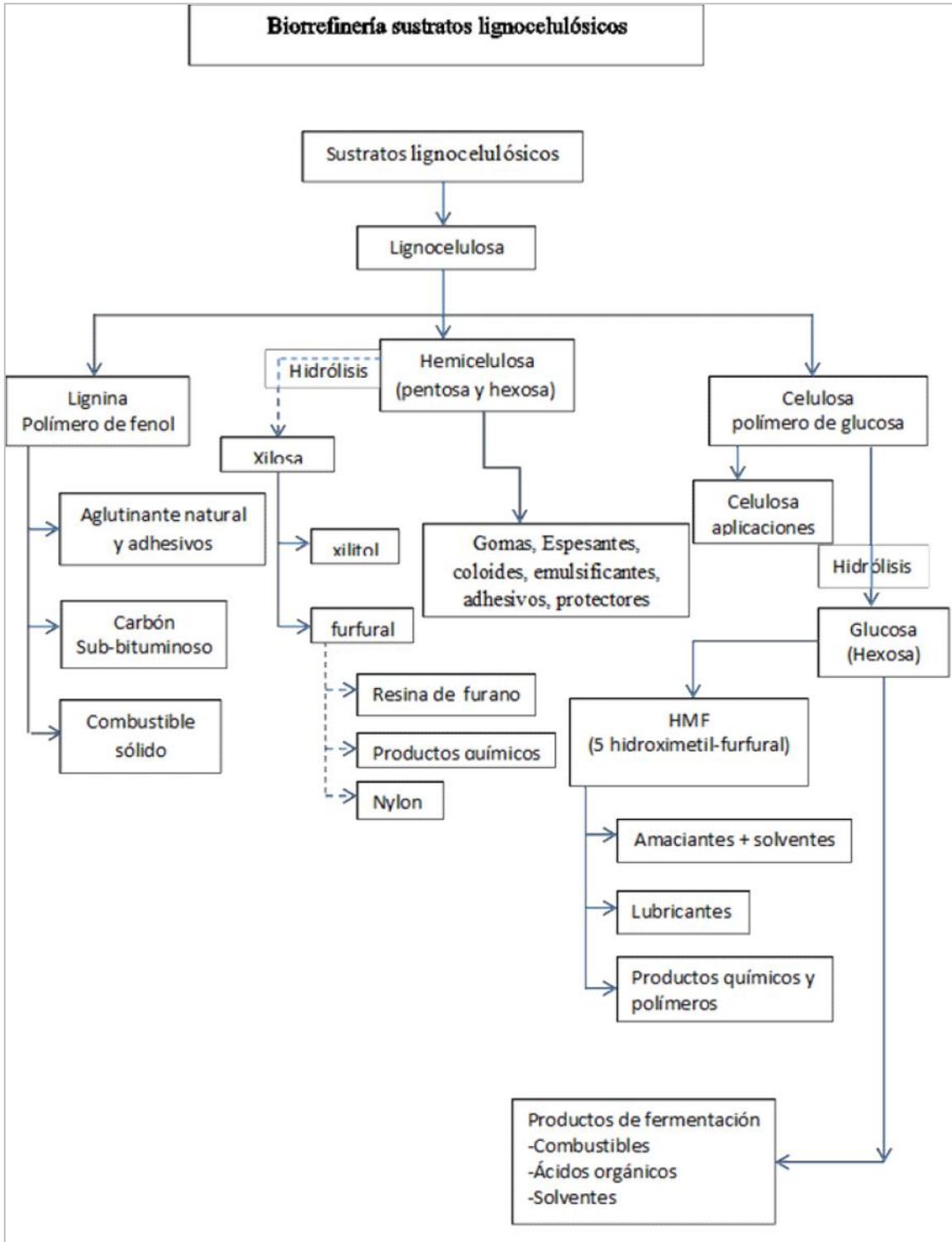
E. Esquema de comparación de una refinería de petróleo y una biorrefinería.



F. Esquema de una refinería de sustratos lignocelulósicos.



G. Ruta tecnológica de producción de bioetanol lignocelulósico, adoptada por Petrobras.



H. Productos de una biorrefinería de productos lignocelulósico.

I. Condiciones establecidas para la producción de setas comestibles *Pleurotus* spp.

Cepa	<i>Pleurotus</i> spp. CCEBI 3024
<i>Sustrato</i>	Pulpa de café
<i>Capacidad del biorreactor</i>	2 kg de sustrato húmedo
<i>Humedad del sustrato de siembra</i>	70-75 %
<i>Inoculación</i>	Micelio crecido en trigo o sorgo 10 % peso/peso
<i>Fase de colonización</i>	Temperatura: 26 - 28 °C. Humedad relativa del ambiente: 73-75 % Concentración de CO ₂ : aire normal Luminucidad: penumbra
<i>Fase de fructificación</i>	Temperatura: 23 - 26 °C. Humedad relativa del ambiente: 80 - 95% Riegos: 3-4 veces/día (en piso y paredes) Concentración CO ₂ : <0,6 %, ventilación forzada Luminosidad: 150-200 lux (suficiente para leer)

J. Procedimientos Normalizados para el aseguramiento del control de la calidad en la Planta de Producción Investigación del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial.

No.	Procedimiento Normalizado de Trabajo	Código	No. de páginas
1	Inoculación de la cepa <i>Pleurotus</i> spp. en placas Petri	CEBI/PT/01/03	4
2	Inoculación de la cepa <i>Pleurotus</i> spp. en tubos de ensayo	CEBI/HC/PT/01	8
3	Reglas de bioseguridad en el proceso de cultivo de <i>Pleurotus</i> spp.	CEBI/HC/PT/02	7
4	Obtención de inóculos.	CEBI/HC/PT/03	7
5	Selección del sustrato	CEBI/HC/PT/04	4
6	Tratamiento del sustrato	CEBI/HC/PT/05	5
7	Siembra del sustrato seleccionado	CEBI/HC/PT/06	5
8	Incubación del sustrato	CEBI/HC/PT/06	5
9	Fructificación de las setas	CEBI/HC/PT/08	5
10	Cosecha	CEBI/HC/PT/09	5