



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
CENTRO DE ESTUDIOS DE
BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

**Efecto de tres sustratos
agroindustriales lignocelulósicos
en la producción de *Pleurotus
ostreatus* y *Lentinula edodes***

**Tesis presentada en opción al Título
Académico de Máster en Biotecnología**

Mención Ambiental

Autor: Lic. Luis Marino Álvarez Céspedes

Tutores:

Dr. C. Rosa Catalina Bermúdez Savón
Dr. C. Nora García Oduardo.

Consultante: M. Sc. Liuba Plana Pérez

Santiago de Cuba, 2021

Agradecimientos

En momentos como estos me pongo a pensar en todas aquellas personas que me apoyaron e hicieron posible que llegara hasta aquí, y créanme que la lista pudiera ser interminable, por lo que resulta algo difícil mencionarlos a todos sin que se me quede nadie, de antemano ofrezco disculpas si omito algunos nombres.

En primer lugar quiero agradecer a mi tutora, la Dr. C. Rosa Catalina Bermúdez, con la cual siempre he podido contar. A la Dr. C. Nora García por sus consejos y ayuda incondicional. De igual modo quiero agradecer a la M. Sc. Migdalia Serrano, por todo su apoyo en la parte experimental y contribuir cuidadosamente con la información que de esta se derivó, sin su ayuda el trabajo no hubiese llegado a feliz término. Al Dr. C. Manuel Serrat y al resto de los colegas del CEBI por toda su colaboración.

A la M. Sc. Liuba Plana, del INIFAT, por el apoyo brindado con parte del material biológico para el desarrollo de las investigaciones.

Mi agradecimiento al amigo M. Sc. Wilden La Era, por toda su ayuda en el tratamiento estadístico de la información y al Dr. C. Alexander Gorina por motivarme, por guiarme constantemente para que cumpliera con la etapa final de este importante proceso. Así como al resto del colectivo del CUM Contramaestre.

A los compañeros responsables de los sitios donde se encontraban los residuos agroindustriales, que nos dieron acceso para realizar esta investigación.

A la Dra. María Esther González por todo su apoyo y ayuda incondicional.

Quiero agradecer a mi familia por haberme apoyado y nunca renunciar a mis sueños.

Y a todos los que siempre me dieron una palabra de aliento:

Muchas gracias

RESUMEN

El uso de subproductos agrícolas lignocelulósicos en la producción de setas comestibles, constituye una fuente barata para la alimentación humana, relacionada con el desarrollo sostenible y cuidado el medio ambiente. Sin embargo, actualmente estos subproductos no se utilizan eficientemente y son fuente de contaminación. Este trabajo tiene objetivo evaluar aspectos del crecimiento y la producción de las cepas CCEBI 3024 de *Pleurotus ostreatus* y Le 236 de *Lentinula edodes*, sobre tres subproductos agroindustriales lignocelulósicos. Se emplearon como sustratos en el proceso de fermentación sólida; la pulpa de café, *Coffea canephora* Pierre ex Frhoener, la cáscara de maní, *Arachis hypogaea* L. y la cáscara (fibra) de coco, *Coco nucífera* L.; con un diseño experimental bifactorial en bloques completamente al azar. Se evaluaron como indicadores de productividad la eficiencia biológica (EB), el rendimiento (R) y la precocidad (P) de las cepas. La producción del *Lentinula edodes* en pulpa de café, cáscara de maní y de coco, y *Pleurotus ostreatus* en cáscara de maní fueron evaluadas por primera vez. Los resultados muestran que, con el *Pleurotus ostreatus*, la precocidad en los tres sustratos fue de 10 días, destacándose la cáscara de maní con mayor número de primordios, ramilletes y oleadas; en tanto, la mayor eficiencia biológica, **72,62%** se alcanzó sobre la pulpa de café. Para el *Lentinula edodes* solo se obtuvo producción con la cáscara (fibra) de coco, mostrando resultados de precocidad, 59 días y eficiencia biológica de 12,9%, lo que constituyó el principal hallazgo del presente trabajo.

PALABRAS CLAVE: *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, residuos lignocelulósicos, pulpa de café, cáscara de maní, cáscara de coco.

ABSTRACT

The use of lignocellulosic agricultural by-products in the production of edible mushrooms constitutes a cheap source for human nutrition, related to sustainable development and care for the environment. However, these by-products are currently not used efficiently and are a source of contamination. This work aims to evaluate aspects of growth and production of *Pleurotus ostreatus* strains CCEBI 3024 and *Lentinula edodes* Le 236, on three lignocellulosic agroindustrial by-products. They were used as substrates in the solid fermentation process; coffee pulp, *Coffea canephora* Pierre ex Frhoener, peanut shell, *Arachis hypogaea* L. and coconut shell (fiber), *Coco nucifera* L .; with a bifactorial experimental design in completely randomized blocks. The biological efficiency (BE), the yield (R) and the earliness (P) of the strains were evaluated as productivity indicators. The production of *Lentinula edodes* in coffee pulp, peanut and coconut shells, and *Pleurotus ostreatus* in peanut shells were evaluated for the first time. The results show that, with *Pleurotus ostreatus*, precocity in the three substrates was 10 days, highlighting the peanut shell with the highest number of primordia, bouquets and waves; meanwhile, the highest biological efficiency, 72.62%, was reached on the coffee pulp. For *Lentinula edodes*, production was only obtained with the shell (fiber) of coconut, showing results of precocity, 59 days and biological efficiency of 12,9%, which was the main finding of the present work.

KEY WORDS: *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, lignocellulosic residues, biological efficiency, peanut shell, coconut shell.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Hongos macromicetos - basidiomicetos	10
2.1.1. Hongos de pudrición blanca	11
2.1.1.1. <i>Pleurotus</i> spp.	11
2.1.1.2. <i>Lentinula</i> spp.	14
2.2 Fermentación en estado sólido	16
2.2.1. Cultivo de setas en bolsas de polietileno.	17
2.2.2. Inoculación del sustrato.	18
2.2.3. Colonización del sustrato.	18
2.2.4. Inducción de la fructificación.	19
2.2.5. Fructificación.	19
2.2.6. Cosecha y envasado.	20
2.3 Subproductos agroindustriales lignocelulósicos.	21
2.3.1. Pulpa de café.	21
2.3.2. Cáscara (fibra) de coco.	22
2.3.3. Cáscara de maní.	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Microorganismos.	24
3.2. Materiales y equipos.	24
3.3. Sustratos.	24
3.4. Características específicas de los experimentos.	25
3.4.1. Experimento I. Cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	25
3.4.2 Experimento II. Cultivo de <i>Lentinula edodes</i> .	26
3.5. Metodología de cultivo.	27
3.6. Determinación de los indicadores de productividad y biodegradabilidad.	30
3.7. Análisis estadísticos	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1. Efecto de los sustratos sobre el crecimiento y desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	33
4.2. Evaluación de la biodegradación de los sustratos por <i>Pleurotus ostreatus</i> .	38
4.3. Efecto de los sustratos sobre el crecimiento y desarrollo de <i>Lentinula edodes</i> .	42
5. CONCLUSIONES	50
6. RECOMENDACIÓN	51
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS	

1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología cobra interés, dado que ofrece alternativas viables para la transformación de los residuos lignocelulósicos (lignina, celulosa, hemicelulosa, pectina y almidón) en otras sustancias e incluso en energía. Se abre, entonces, un nuevo panorama de la investigación y la ingeniería basado en la biotecnología de los residuos agroindustriales. Zhang y col.,(2015). Han aparecido nuevas formas de utilizar los residuos sin que tengan que ser descartados, se “valorizan”, lo que le permite generar valor agregado, mediante una pequeña transformación sin afectar la salud humana o el medioambiente Grande, (2016).

En la actualidad la biotecnología se ha convertido en una verdadera alternativa para la obtención de alimentos para el consumo humano, por la posibilidad de obtener grandes cantidades en pequeñas áreas mediante técnicas sencillas, a bajo costo, en cortos periodos de tiempo y empleando residuos agroindustriales como sustrato para su cultivo, la producción de setas comestibles, es un claro ejemplo de cómo la biotecnología es una alternativa real para la obtención de alimentos (Kumla y col., 2020; Barshteyn y col., 2016)

Por otra parte, la producción comercial de setas comestibles es cada día más importante. Actualmente, la producción mundial supera los 6,2 millones de toneladas de setas frescas por año. Su valor económico aproximado supera los 30 billones de dólares. La tasa promedio de incremento anual es superior al 11% (Martínez, 2012) Se estima que ya se generan operaciones comerciales de alto valor agregado superiores a los 6 billones de dólares en los mercados internacionales de la industria alimenticia, la farmacéutica y la de perfumería y cosméticos (Mukundraj y col., 2021; Kamalakannan y col., 2020; Valenzuela y col.,2017; Wasser, 2010)

El aprovechamiento de los residuos agroindustriales lignocelulósicos, con el empleo de los hongos basidiomicetos de pudrición blanca se ha consolidado como una alternativa viable para la producción de alimentos funcionales de consumo humano capaces de satisfacer, en gran medida, las necesidades proteicas y nutricionales de la población en los países subdesarrollados (Anike y col., 2016; Heredia y col., 2016; Bermúdez y col., 2014)

El cultivo de setas comestibles constituye un sistema de producción-consumo, que ha adquirido gran relevancia desde el punto de vista económico, social y ecológico a

nivel mundial (FAO, 2018). Consiste en la aplicación de procesos biotecnológicos que pueden desarrollarse a pequeña y gran escala, para producir alimento humano de buena calidad nutritiva, con propiedades medicinales, suplementos dietéticos, enzimas y productos metabólicos con amplio potencial de utilización en la industria (Rangel y col., 2021; Menon y col., 2021; Beltrán y col., 2020; Antunes y col., 2020;) La importancia de un bioproducto radica en la capacidad de suplementar o movilizar nutrientes con un mínimo uso de recursos no renovables, lo que reduce costos y evita alteraciones ecológicas en el agroecosistema (Fasihah y col., 2018; Sánchez y col 2012) La elaboración de bioinsumos con actividad de regulación sanitaria y descomposición de residuos del cultivo de café (*Coffea canephora* ex Froener), coco (*Cocos nucifera*, L.) y maní (*Arachis hypogaea*, L.), cobra gran importancia, en términos de la sanitización de estos residuos generados en la poscosecha Marín y col., (2020)

Como se planteó anteriormente, 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 de basidiomicetos Kumla y col., (2020) Este tipo de fermentación en el cultivo de setas, en particular, de *Pleurotus* sp. y *Lentinula* sp., sobre subproductos agrícolas, constituye una alternativa en la producción de alimentos, así como una fuente barata de proteína (Menon y col., 2021; Raman y col., 2020; Bermúdez y col., 2018)

De este modo, se garantiza la producción de los mismos en un corto período de tiempo, a bajo costo y con residuos sólidos de origen vegetal, que de no ser utilizados para estos fines o ser tratados adecuadamente, generan impactos ambientales (Menon y col., 2021; Grimm y col., 2020), tales como, olores, presencia de plagas, entre ellos: insectos, roedores, etc. Así, estos residuos sólidos pueden dejar de ser contaminantes y convertirse en nuevos recursos, a través de un proceso biológico eficaz y relativamente corto de recuperación, como alimento proteico (Marín y col., 2020; Bermúdez y col., 2014).

Los hongos comestibles cultivados, constituyen un ejemplo del valor y productividad de los desechos agrícolas, forestales y agroindustriales, que existen en abundancia, al ser transformados en proteínas, vitaminas y aminoácidos, esenciales para la vida humana y animal, además de contribuir al reciclaje de desechos contaminantes Pérez y col., (2020) Diversos estudios demuestran que las setas poseen alto valor

nutritivo por la calidad de su proteína, presencia de vitaminas y otros macro y microelementos, lo que las convierte en alimentos saludables (Mukundraj y col., 2021; Bermeo y col., 2020; Shukla, 2020; Bernabé y col., 2006)

El cultivo de setas comestibles del género *Pleurotus* sp. comenzó en Cuba en 1988, por el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), con el empleo de subproductos de la agroindustria cañera (paja de caña). Este colectivo logró resultados positivos, así como el desarrollo de una tecnología para dicho cultivo. Posteriormente, otros investigadores demostraron que el empleo de subproductos del café, el cacao y el coco, como sustratos para el cultivo de estas setas, resultaba efectivo y permitía obtener rendimientos superiores a los alcanzados con la paja de caña (Mishra y col., 2020; Bermúdez y col., 2010).

En tal sentido, se aprovecharía su acción sobre la descomposición de la materia orgánica y la regulación sanitaria de cultivos de importancia económica, entre ellos, sorgo, maíz, caña de azúcar, café, coco, maní, entre otros, con el fin de contribuir a la sostenibilidad del agroecosistema, en función del uso apropiado de residuos de procesos agrícolas, que en este caso resultan recursos locales renovables Sow y col., (2020)

El Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), de la Universidad de Oriente (UO), ha dirigido sus investigaciones fundamentalmente a renglones agrícolas de gran importancia económica de la Provincia de Santiago de Cuba. En tal sentido, incursiona en el aprovechamiento biotecnológico de subproductos que generan la obtención de alimentos proteicos y medicinales, a partir del cultivo de setas comestibles del género *Pleurotus* sp. Beltrán y col., (2020) y en los últimos años inició estudios en el género *Lentinula* sp., a través de la evaluación de indicadores de su producción Bermúdez y col., (2014) Estas investigaciones se realizan con el uso de subproductos de la agroindustria, considerando que existe una gran variedad de residuos lignocelulósicos disponibles en la provincia, entre ellos algunos agroindustriales que resultan subutilizados y carecen de valor económico en el contexto en que se generan, por lo que constituyen fuentes de contaminación, con fuerte impacto medioambiental Grande, (2016).

Pleurotus spp. y *Lentinula edodes* se han caracterizado por su alto valor nutricional y pueden ser tomados como una fuente importante de proteínas, vitaminas y minerales. El valor nutricional de las setas comestibles es notable, ya que

constituyen una magnífica fuente de proteínas por contener hasta 35% en base seca. Este dato es significativo si se compara con el 13,2% del trigo y el 25,2% de la leche. Además, contienen vitaminas (B1, B2, B12, C y D), aminoácidos (niacina y ácido pantoténico), polisacáridos, así como ácidos grasos insaturados y bajo contenido calórico (Mukundraj y col., 2021; Kamalakannan y col., 2020; Wasser, 2010)

Problema

Estos basidiomicetos necesitan diferentes condiciones de crecimiento para el brote y la producción de los cuerpos fructíferos, el *Pleurotus ostreatus* requiere climas tropicales y subtropicales, mientras el *Lentinula edodes* necesita largos tiempos de incubación, sustratos específicos y bajas temperaturas (Mukundraj y col., 2021; Kamalakannan y col., 2020; Valenzuela y col., 2017)

En el presente trabajo se plantea la siguiente **hipótesis:**

El empleo de residuales lignocelulósicos de la agricultura, constituye una alternativa ecológica para el cultivo de *Pleurotus* sp. y *Lentinula* sp., en condiciones de bajos insumos, que mejora la velocidad de crecimiento radial y la producción de setas comestibles.

Objetivo general:

Evaluar el cultivo de las setas comestibles - medicinales *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*, utilizando la cáscara (fibra) de coco, pulpa de café y cáscara de maní como sustrato.

Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto de la pulpa de café, cáscara (fibra) de coco y cáscara de maní en la producción de setas comestibles, con el empleo de las cepas CCEBI 3024 de *Pleurotus ostreatus* y Le 236 de *Lentinula edodes*.
2. Caracterizar el desarrollo de las dos cepas en estudio mediante el crecimiento del micelio y el número de cuerpos fructíferos.
3. Establecer nivel de biodegradación de los sustratos evaluados, sobre la base de los indicadores de productividad: eficiencia biológica (EB), rendimiento (R) y precocidad (P) de las cepas estudiadas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Hongos macromicetos – basidiomicetos.

De manera general los hongos son organismos cosmopolitas, capaces de vivir en casi todos los hábitats posibles, siendo particularmente diversos en bosques húmedos Mukundraj y col., (2021) Aunque es importante destacar que existen especies endémicas de determinadas regiones. Los hongos son heterótrofos, es decir, requieren materia orgánica preformada, la que utilizan como fuente de energía y de carbono para la síntesis de estructuras celulares. Kamalakannan y col., (2020)

Los macromicetos son, generalmente, representantes de las subdivisiones Ascomycotina y Basidiomycotina. Estos se distribuyen ampliamente en el planeta terrestre, viven en cualquier sitio que presente material orgánico, agua y temperatura apropiada, generalmente cercana a los 25°C, aunque se pueden desarrollar en ambientes aún más cálidos o fríos, lo que depende de su fisiología Royse y col., (2017).

Dentro de los macromicetos se encuentran los basidiomicetos, que forman un grupo de hongos extenso y diverso, caracterizado por la producción de esporas sexuales en cuerpos fructíferos llamados basidiocarpos (del griego *basidion* que significa base pequeña y *basidion* más *karpos* que significa fruto), también conocidos como basiomatas, basidiomas o carpóforos, los cuales portan estructuras especializadas conocidas como basidias.

Estos hongos producen una amplia gama de productos naturales, que abarca desde componentes estructurales con actividad antitumoral e inmunológicamente activos, hasta agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, citostáticos, enzimas, reguladores de crecimiento y aromas (Thakur, 2020; Costinel y col., 2020; Wasser, 2010)

Uno de los basidiomicetos más conocidos es el *Lentinula edodes*, por ser el hongo comestible más cultivado en países como Japón, Corea y China, además de existir gran tradición de su uso como hongo medicinal. Por estos motivos este organismo ha sido ampliamente estudiado, para poder definir los principios activos que provocan sus efectos medicinales (Mukundraj y col., 2021; Wasser, 2010)

2.1.1. Hongos de pudrición blanca.

Los hongos son capaces de degradar lignina, celulosa y hemicelulosa de la madera, pero la velocidad y extensión de la degradación de cada componente de la pared celular varía considerablemente según la especie Royse y col., (2017).

El conocimiento acerca del papel de los hongos en la pudrición se hizo efectivo a los finales del siglo XIX, sin embargo, la asociación entre los hongos y la pudrición de la materia orgánica siempre ha sido notable, encontrando que la descomposición de ésta involucra el crecimiento espontáneo de hongos. Las principales categorías en la descomposición de la materia orgánica, de acuerdo al modo de colonización y a las condiciones en que ellos crecen, son la pudrición blanca, la pudrición café y la pudrición blanda. Raman y col., (2020)

Se plantea que el hongo causante de la pudrición blanca, remueve la lignina antes o al mismo tiempo que remueve el componente de celulosa de los vegetales. La lignina es un polímero aromático complejo de elevado peso molecular, marrón o de color oscuro, por lo que su degradación deja la materia orgánica de un aspecto decolorado o blanco pálido, en los últimos estadios del proceso de pudrición. Entre los hongos que causan la pudrición blanca puede citarse a *Phanaerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus* (Bermeo y col., 2020) *Lentinula edodes* es un basidiomiceto de pudrición blanca, crece de forma natural sobre *Quercus* spp. (Roble). Algunos autores refieren que presenta alta capacidad lignocelulolítica, durante el crecimiento vegetativo. Mukundraj y col., (2021)

2.1.1.1. *Pleurotus* spp.

Los hongos comestibles son uno de los alimentos más antiguos consumidos por el hombre, se plantea que de las aproximadamente 10 000 especies de 30 géneros de hongos comestibles, existentes en el mundo, solamente unas 80 de ellas son cultivadas experimentalmente, 40 cultivadas económicamente y alrededor de 20 cultivadas comercialmente y entre ellas, el hongo *Pleurotus* spp. conocido popularmente como “hongo ostra”, es el que se ha difundido más rápidamente a razón de casi un 15 % de incremento anual (Shukla, 2020; Royse y col., 2017).

Los hongos del género *Pleurotus* spp. son saprofitos, descomponedores primarios de madera y residuos vegetales, se alimentan de la materia orgánica en la que crecen, degradando las sustancias con enzimas que

liberan al medio húmedo que les rodea; se pueden encontrar ampliamente distribuidos en la naturaleza en los bosques tropicales y subtropicales, e igualmente pueden ser cultivados artificialmente. (Omen y col., 2013; Mintesnot y col., 2014; García, 1999).

Este hongo es apreciado por su delicioso sabor, adicionalmente tiene alto contenido de proteínas, carbohidratos, minerales (calcio, fósforo y hierro), vitaminas (tiamina, riboflavina y niacina) y bajo contenido en grasa (Sow y col., 2020; Singh, 2019) La diversidad del género *Pleurotus* abarca al menos 30 especies, entre ellas, *P. djamor*, *P. eryngii*, *P. smithii*, *P. levis*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-cajou*, *P. citrinopileatus* y *P. ostreatus* (Mukundraj y col., 2021; Yao y col., 2021)

Las setas de *Pleurotus* se caracterizan por tener sombrillas agrupadas en manojos deprimidos en forma de embudo, generalmente de simetría bilateral pero no axial, la sombrilla en forma de concha ostra unidas a un tallo excéntrico, de ahí el nombre de “hongo ostra” Shukla, (2020)

De las setas cultivadas, el cultivo de *Pleurotus* spp. es en la actualidad el más prometedor, ocupa el segundo lugar en la producción de setas comestibles (25% del total de la producción mundial), es el que más ha crecido desde sus inicios. China es el mayor productor de setas de *Pleurotus* spp. (Kamalakaran y col., 2020; Mukundraj y col., 2021)

La composición química del *Pleurotus* spp. es particularmente interesante desde el punto de vista dietético: la sombrilla contiene aproximadamente 90 % de agua, las proteínas representan de 27 a 48 %; los carbohidratos menos del 60 % y los lípidos entre 2 y 8 %. Su valor energético global varía, en dependencia del tipo de especie, oscilando entre 628 y 1465 kJ/kg de setas frescas, lo que constituye a la vez una valiosa fuente de vitaminas y diferentes sales minerales Royse y col., (2017)

El cultivo del *Pleurotus* spp. 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 es considerado un método valioso para la producción de proteína. Adicionalmente, los residuos fermentados obtenidos luego del cultivo de los hongos, pueden ser empleados como suplemento en la alimentación animal (Bermúdez y col., 2013; Sow y col., 2020; Vellaichamy y col., 2020)

El sustrato que queda después de la cosecha del hongo, llamado compost agotado, puede ser usado como sustrato para hongos de otros géneros, como forraje para ganado, como acondicionador del suelo o fertilizante y en procesos de biorremediación Antunes y col., (2020)

Con relación al uso como acondicionador del suelo o fertilizante de sustratos usados en el cultivo de hongos, existen datos que exhiben altos valores de rendimiento en el cultivo de limoncillo (*Cymbopogon citratus*), cuando se sembró en sustratos usados en el cultivo de *Pleurotus sajor-caju* Sow y col., (2020)

La capacidad biorremediadora de hongos del género *Pleurotus* spp., también es señalada, a través de la habilidad de cepas de *Pleurotus pulmonarius* para biotransformar herbicidas como la atrazina e insecticidas como el endosulfán Antunes y col., (2020)

Se plantea que los hongos de pudrición blanca como *P. ostreatus*, *P. cornucopiae*, *P. cystidiosus*, *P. strigosus*, *P. subareolatus*, se caracterizan por atacar y consumir nemátodos, probablemente porque utilizan los nutrientes de su presa como suplemento, dados los niveles bajos de N₂ disponible en la madera (García, 1999). Las hifas de estos hongos, unos “tallos” cortos que contienen una gota de toxina, al ponerse en contacto con el nemátodo, lo inmovilizan y las hifas del hongo crecen quimiotrópicamente (dirigidas) a través de la boca del nematodo, como en el caso de los anteriores hongos nematófagos Naranjo, (2008).

El proceso de fermentación sólida, al utilizar este hongo comestible saprófito, mejora la digestibilidad, aumenta el contenido de proteínas, vitaminas y minerales del sustrato residual. Estos hallazgos sugieren su empleo como materia prima para elaboración de concentrados o piensos para animales (Vellaichamy y col., 2020; Bermúdez y col., 2013; Gaitán, 2012).

Por otra parte, investigaciones más recientes indican atributos medicinales en varias especies de hongos, como antiviral, antibacteriano, antiparasitario, antitumoral, antihipertensivo, antiaterosclerosis, hepatoprotector, antidiabético, antiinflamatorios y efectos moduladores del sistema inmune (Martínez y col., 2016; Cano y col., 2016; Ramos, 2015; Beltrán y col., 2020).

2.1.1.2. *Lentinula* spp.

Lentinula spp., es una seta comestible originaria de China, nación donde se cultiva desde hace más de 1000 años. El primer documento escrito que alude al cultivo del shiitake se remonta a Wu Sang Kwuang, que vivió en los tiempos de la dinastía Song (960-1127). Este hongo es un macromiceto estable morfológicamente, se cultiva tradicionalmente en China y Japón, en ambientes naturales como cultivo extensivo y en occidente bajo ambientes controlados como cultivo intensivo. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (shiitake) es el segundo hongo comestible más popular del mundo por su sabor y calidad (Mukundraj y col., 2021; Wasser, 2010). Adicionalmente, es uno de los hongos más conocidos y el mejor caracterizado para propósitos de uso medicinal. Hinestrozay col., (2008)

El nombre Shiitake es tomado del idioma japonés, siendo “Shii o chinquapin” como lo llaman en Japón (*Castanopsis cuspidata* (thunb.) Schottky una especie de árbol del género *Castanopsis* nativa del sur de Japón y de Corea, donde crece naturalmente y “take” que significa hongo. También se le conoce como “hongo negro del bosque” y “Shiang-gu” (del chino, hongo con fragancia). Se caracteriza por crecer en troncos, por no tener anillo ni volva y por su consistencia subcarnosa; es de color café pardusco o color cuero Kamalakannan y col., (2020)

Lentinula spp., crece de forma silvestre y se desarrolla en árboles muertos de hoja ancha, principalmente en roble, sobre residuos de lignina y celulosa y sus derivados, distintos tipos de bagazo, como el de caña de azúcar y residuos agrícolas, puede crecer tanto en bloques sintéticos como en bloques naturales (Mukundraj y col., 2021; Martínez y col., 2012)

Entre las principales características de *Lentinula* spp. cabe destacar que, el píleo o sombrero mide entre 5 y 25 cm de ancho, es convexo o casi plano al madurar, y se torna de color café a medida que desarrolla el hongo. La superficie es seca y fibrosa apesada, cutícula rompiéndose en escamas de diversos tamaños y formas, textura blanda de color claro y pardo rojizo oscuro (Mukundraj y col., 2021; Wasser, 2010). Cercano a la cutícula se observa una tonalidad clara o parda; esta es firme, correosa carnosa en estado adulto y suave en especímenes inmaduros. Presenta sabor agrio, olor ligero, pero no característico; así como láminas blancas o pálidas tornándose pardo rojizas y algunas veces manchadas por la edad; en ocasiones con

un tono avellanado y moderadamente anchas, bordes detalladamente cerrados a dentados Baktemur y col., (2020)

El estípite o pie mide de 3 a 5 cm de longitud, y de 0,8 a 1,3 cm de grosor, casi igual o ensanchado hacia abajo, es sólido y correoso, de superficie delgada envainada por un velo delgado, que termina en la zona apical, conforme la cortina se rompe; esta es hialina o pardusca (Kamalakannan y col., 2020; Nieto y col., 2012)

Las esporas miden de 5,5 a 6,5 mm de longitud, y de 3 a 3,5 mm de ancho, son de forma subcilíndricas no amiloides, lisas de pared delgada. Son basidios tetrasporados, pleurocistidios, con trama laminar entre tejidos y no claramente distintas del contexto, presentan conexiones en grapa Kamalakannan y col., (2020)

Según Vetchinkina y col., (2008), se describen cinco etapas de desarrollo del Shiitake, de acuerdo a las características que este presente, con relación a la coloración del micelio, la formación de película sobre el sustrato, la aparición de primordios y del cuerpo de fructificación. Después de la inoculación del sustrato con el Shiitake, el micelio blanquecino crece hasta colonizarlo. Esta es una fase de asimilación de nutrientes, las enzimas están muy activas para actuar sobre los componentes del sustrato, tales como, celulosa, hemicelulosa o lignina, y transformarlos en moléculas más simples, que puedan ser absorbidas por el micelio para su crecimiento y propagación. Existen resultados que demuestran que una semana antes de la fructificación, la temperatura de los bloques que se forman entre el sustrato y el inoculo del Shiitake alcanza entre 25 y 27 °C Baktemur y col., (2020)

Dentro del género *Lentinula* spp. se encuentra la apreciada seta comestible *Lentinula edodes*, son varios los autores que señalan que en los últimos años ha existido un significativo incremento de su consumo llegando a ser una de las setas más cultivadas en el mundo. Existen diversas evidencias de su valor nutricional Mukundraj y col., (2021)

El Shiitake es bajo en calorías, alto en proteínas, hierro, fibra, minerales y vitaminas. Contiene vitaminas B1, B2, B6, B12 y D2, con altas cantidades de riboflavina y niacina. Constituye un excelente alimento con propiedades medicinales. El consumo de esta seta, es una forma más de prevenir enfermedades y ser saludables, además, se cree que puede aumentar la longevidad y que posee propiedades afrodisiacas (Mukundraj y col., 2021; Romero y col., 2015)

El consumo de Shiitake tiene diferentes efectos benéficos para la salud del ser humano, dado su valor medicinal ((Kamalakaran y col., 2020; Hineštrozay col., 2008)

2.2. Fermentación en estado sólido.

La fermentación en estado sólido (FES), consiste en el crecimiento de microorganismos sobre partículas sólidas en ausencia de agua libre en el sistema. El agua se encuentra ligada de forma compleja a una matriz porosa sólida, contiene una fase gaseosa continua y un mínimo de agua visible, ya sea absorbida en la superficie de las partículas o atrapada dentro de la región capilar del sólido (Gordana Šelo y col., 2021; Kumla y col., 2020)

El sistema de FES presenta tres fases:

- Fase sólida; generalmente es un sustrato vegetal que contiene los microorganismos y nutrientes.
- Fase líquida; para las diferentes transferencias de masa.
- Fase gaseosa.

La utilización del sustrato sólido por el microorganismo se afectada por varios factores físicos y químicos.

Dentro de los factores físicos puede citarse la accesibilidad del sustrato para los microorganismos, el efecto fílmico o de película y el efecto de masa, como los más importantes. La morfología física, especialmente la porosidad y el tamaño de partículas del sustrato, gobiernan el área accesible para el organismo.

En el caso de los factores químicos, la naturaleza química del sustrato (grado de polimerización y cristalización), es un criterio importante; la mayoría de los residuos agrícolas o agroindustriales, de naturaleza celulósica o amilácea, han sido utilizados en procesos de fermentación y sustratos sólidos (Sow y col., 2020; Barshteyn y col., 2016; Bernabé y col., 2004; García, 1999)

Es por ello que considerando las potencialidades de la FES, y la necesidad de obtener productos útiles al hombre y a los animales, así como la disponibilidad de millones de toneladas de residuos industriales y agrícolas, que contaminan cada día el medio ambiente, se han desarrollado procesos para la obtención de células microbianas en la alimentación animal y humana entre las que se encuentran; proteína unicelular (PUC), ej.: las levaduras (*Torula*, *Candida*, *Saccharomyces*) y la

producción de hongos comestibles, ej.: *Pleurotus*, *Lentinula* y *Agaricus* (Gordana Šelo y col., 2021) (Grimm y col., 2020) (Barshteyn y col., 2016)

2.2.1. Cultivo de setas en bolsas de polietileno.

Las bolsas de polietileno constituyen un tipo de biorreactor que es muy utilizado en la producción de setas comestibles de diferentes géneros Costinel y col., (2020). Son diversos los estudios que indican que el material utilizado, en la actualidad, para la producción de setas comestibles del género *Pleurotus* spp. y *Lentinula* spp. es el plástico, principalmente el polietileno Sow y col., (2020; Bermúdez y col., 2010). La industria ha desarrollado varios tipos de bolsa, entre las que se incluyen las esterilizables en autoclave. Las dimensiones de las mismas son variables, pueden ser de 40x60 cm o de 60x90 cm y soportan hasta 15 kg de sustrato Sow y col., (2020) Se recomienda que al usar las bolsas se le hagan perforaciones para que se establezca intercambio entre el sustrato y el aire.

El uso de bolsas de polietileno para la producción de setas resulta ventajoso ya que existe menor riesgo de fracaso de la cosecha, comparado con otros métodos de cultivo, es posible usar las bolsas dentro de casas o edificaciones en desuso, es fácil de controlar la contaminación, se necesita una inversión inicial pequeña, retorno rápido del capital y es posible lograr una producción continua durante todo el año Singh, (2019)

El uso de este biorreactor para la producción de setas comestibles está dado por la sencillez de su diseño y operación, además resulta fácil realizar los cálculos de balance de masa y rendimiento, Gordana Šelo y col., (2021) aspectos esenciales en los procesos productivos.

En los métodos modernos de cultivo de setas comestibles, incluyendo setas de *Pleurotus* y de *Lentinula*, se utiliza como sustrato subproductos de la industria maderera virutas y aserrín de maderas, pajas de cereales y residuos agroindustriales (desechos de maíz, hojas, cáscaras de café, coco, etc. (Kumla y col., 2020; Bernabé y col., 2004)

(Mukundraj y col., 2021) además de un suplemento rico en nitrógeno, como el afrecho de trigo, arroz, avena, cebada, soya, entre otros (Menon y col., 2021; Agbagwa y col., 2020)

En este caso, es indispensable someter el sustrato a un tratamiento físico o químico, a fin de disminuir o eliminar la carga de microorganismos

contaminantes. De este modo, se logra convertir el sustrato en una matriz altamente selecta para el crecimiento de la seta comestible seleccionada.

En términos generales, el sustrato artificial debe caracterizarse por cierta relación Carbono:Nitrógeno (C:N), pH, humedad, grado de compactación, granulometría, etc., que permita el rápido crecimiento vegetativo y reproductivo de la seta que es inoculada, sobre o dentro del mismo, y son estas propiedades unidas a las condiciones ambientales, las que determinan finalmente el éxito o no del cultivo Shuai y col., (2020)

2.2.2. Inoculación del sustrato.

Durante la etapa de inoculación del sustrato, ya pasteurizado, se deja enfriar de preferencia volteándolo para eliminar el vapor de agua, de lo contrario este se condensa y pueden ocurrir afectaciones por el exceso de humedad (Mahdizadeh y col., 2021; Bernabé y col., 2006). El contenido de humedad del sustrato recomendable para la siembra debe estar entre 70% y 80%.

Una práctica habitual es adicionar al sustrato, antes de la inoculación de la cepa del basidiomiceto, carbonato de calcio (cal) o sulfato de calcio (yeso), una cantidad entre 1% y 2% en base al peso húmedo, con el fin de aumentar parcialmente el pH a valores entre 6 y 6,5.

Una vez que el sustrato ha sido esterilizado o pasteurizado, se mezcla con el inóculo en una proporción entre 3% y 5% del peso húmedo del sustrato, luego se procede a formar el bloque. Para ello, en bolsas de polietileno de alta densidad, se coloca una capa de sustrato de 10 cm de alto seguido de una capa de inóculo, y así sucesivamente, hasta alcanzar la altura deseada.

Posteriormente, la bolsa debe cerrarse y compactarse, se identifica con una etiqueta donde se escribe la fecha de inoculación y se coloca en el área de colonización (Mahdizadeh y col., 2021; Silva y col., 2010).

2.2.3. Colonización del sustrato.

El sustrato, ya sea en forma de bloques o troncos, es llevado a un cuarto de incubación, lo que permite el desarrollo de la seta al interior del mismo. Para ello deben permanecer en esta área bajo determinadas condiciones de temperatura, humedad, ventilación y luminosidad. Se ha demostrado que el óptimo desarrollo se logra a una temperatura entre 24 y 28°C. Temperaturas inferiores provocan

un retardo en el crecimiento, mientras que temperaturas más elevadas pueden ocasionar la muerte del micelio.

Con respecto a la humedad, si el cultivo se realiza en bloques o bolsas plásticas, la humedad ambiental no es tan importante, ya que la bolsa conserva los niveles requeridos. En el caso de la ventilación, se ha observado que durante esta etapa puede ser mínima, ya que la mayoría de las setas comestibles toleran altas concentraciones de CO₂. Es importante realizar perforaciones a las bolsas, al segundo o tercer día, después de la siembra para facilitar la aireación Pineda y col., (2020)

Con relación a la luminosidad, ha sido demostrado que durante la colonización no se requiere de luz, sino de completa oscuridad.

La incubación o colonización puede demorar de 1 a 4 meses, lo que depende de la cantidad de inóculo y del sustrato utilizado. El término de este proceso se hace notable por el completo cubrimiento del sustrato, en el caso de utilizar bloques, por el micelio. Durante esta etapa, y en especial en la primera semana, se deben evaluar las bolsas o troncos inoculados diariamente, con el fin de comprobar el desarrollo del micelio libre de contaminación. Si en las bolsas se observan indicios de esta afectación, deben ser desechadas inmediatamente (Kamalakaran y col., 2020; Silva y col., 2010).

2.2.4. Inducción de la fructificación.

En esta etapa se induce la formación de carpóforos o cuerpos fructíferos. Para ello se aplican estímulos a la seta, tales como, cambios bruscos de luz, temperatura y aireación, que desencadenan un proceso irreversible de inducción de primordios, los que posteriormente formarán a los carpóforos (Prince y col., 2020; Shuai y col., 2020)

Para *Lentinula spp.* se reporta como inducción de la fructificación un choque térmico (golpe de frío), a través de la disminución de la temperatura, a niveles entre 0 y 10 °C, además de realizar perforaciones mayores a las bolsas, o retirar la bolsa, para permitir el desarrollo de los carpóforos (Baktemur y col., 2020; Silva y col., 2010).

2.2.5. Fructificación.

Durante el período de fructificación, es recomendable utilizar un sistema que permita colgar las bolsas para el desarrollo óptimo de los carpóforos.

Las condiciones ambientales en las cuales se desarrolla la etapa de fructificación son muy similares para ambos tipos de cultivo (bloques o troncos), y son las siguientes:

Temperatura: entre 18°C y 25°C.

Humedad relativa del ambiente: entre 80% y 90%.

Aireación: es necesario que la concentración de CO₂ sea baja. Lo que se puede garantizar con una ventilación constante con aire externo filtrado. En el caso del uso de bolsas, si éstas no se retiraron previamente en la etapa de colonización se debe hacer en esta fase o realizar perforaciones mayores a las existentes.

Luminosidad: Es recomendable emplear un fotoperiodo inicial de 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad. Una vez que han aparecido los primeros primordios se debe aumentar el período de iluminación a 12 horas. Es aconsejable evitar la exposición directa al sol.

En general, los resultados evidencian que la presencia de primordios puede observarse al tercer día luego de la inducción, en el caso del cultivo en bloques; mientras que en los troncos se observan a los siete días posteriores a la inducción. Un aspecto importante durante la evaluación del cultivo es que, si se observan pies de los carpóforos excesivamente largos, indican que la ventilación o la luz suministradas resultan insuficientes (Baktemur y col., 2020; Silva y col., 2010).

2.2.6. Cosecha y envasado.

El tiempo requerido para la cosecha de los primeros carpóforos puede ser de aproximadamente 14 días post-inducción, tiempo equivalente para el cultivo en bloques o en troncos, si las condiciones ambientales permanecen constantes durante la etapa de fructificación.

La cosecha se realiza con el empleo de un cuchillo previamente desinfectado. Es aconsejable efectuar el corte lo más próximo posible a la superficie del sustrato.

Es de señalar que, desde el punto de vista comercial, las setas de Shiitake óptimas para ser cosechadas son aquellas que presentan un sombrero con una abertura de aproximadamente 2,5 cm; se recomienda que la cosecha tenga lugar antes de que se extienda por completo el borde. Silva y col., (2010)

Las setas son envasadas en bandejas de polietileno, las que son selladas con plástico adherente y luego etiquetadas. Las bandejas deben ser inmediatamente refrigeradas a 7°C, con el objetivo de evitar la deshidratación de las setas. El uso de guantes y mascarillas es imprescindible, junto al material de embalaje, deben almacenarse en un lugar limpio (Baktemur y col., 2020; Silva y col., 2010).

Inducción de una nueva oleada: En el caso de los cultivos realizados en bloques o bolsas, una vez finalizada la cosecha, las bolsas son trasladadas al área de colonización por un período aproximado de 1 semana, luego se procede nuevamente a la inducción de la fructificación, mediante un shock térmico (Baktemur y col., 2020; Silva y col., 2010).

2.3. Subproductos agroindustriales lignocelulósicos.

En la década de los años 70 del siglo pasado, una parte importante de los biotecnólogos de todo el mundo dirigieron sus investigaciones hacia la utilización y aprovechamiento de residuos agroindustriales. Todo ello para la producción de compuestos útiles como insumos de otros procesos industriales; y a partir del presente siglo, la prioridad está enfocada a la producción de bioenergéticos y a la elaboración de nuevas formulaciones de alimentos para animales (Shradhdha y col., 2020; Kumla y col., 2020; Bermúdez y col., 2013; Saval, 2012)

Dentro de las alternativas para el aprovechamiento de los residuos como materia prima, está su uso como sustrato en el cultivo de los hongos basidiomicetos (Saval, 2012; Antunes y col., 2020; Hussain y col., 2019)

2.3.1. Pulpa de café.

El cultivo del cafeto (*Coffea* sp.), en las zonas montañosas llega a ser el 80 % del total que se cultiva en Cuba (MINAG, 2002). El consumo de café es tradición y costumbre en la provincia santiaguera, en la cual se realiza el beneficio del cultivo, mayoritariamente, por vía húmeda para garantizar un grano de mayor calidad. Este beneficio va acompañado de la generación de subproductos: pulpa, mucílago, pergamino, jugos, aguas de lavado, entre otros Bermúdez y col., (2010).

La pulpa de café que es el 40% de los residuales en el proceso húmedo del beneficio del café, para lograr el café oro, dada su composición química (Hoseini y col., 2021; Ling y col., 2020) presenta potencialidades que son atractivas para ser empleadas como materia prima en diferentes procesos o tecnologías, tales como, producción de bioabono, producción de biogás, alimento animal y como sustrato en

la producción de setas comestibles (Ogaboh y col., 2021; Marín y col., 2020) En la tabla 3 (Anexos) se presenta la composición de la pulpa de café.

En el caso del cultivo o producción de setas comestibles, su aprovechamiento constituye una alternativa eficaz, con impacto significativo. Estas tecnologías permiten utilizar un subproducto, eliminar la contaminación y, a su vez, generar beneficios en el orden económico, social y ambiental (Kumla y col., 2020; Bermúdez y col., 2001).

2.3.2. Cáscara (fibra) de coco.

El cocotero (*Cocos nucifera*, L.), es uno de los cultivos de mayor importancia y utilidad entre las palmas tropicales. Garantiza el sustento de millones de personas en el mundo y se cultiva en más de 80 países en la región del trópico Sudharmaidevi y col., (2015).

El coco crece a lo largo de las costas arenosas a través de los trópicos, así como en la mayoría de las regiones subtropicales. Se ha cultivado y se utiliza en India y Asia continental por más de 3 000 años Akter y col., (2014).

En Cuba, esta especie se ha dispersado por toda la isla, aunque las mayores áreas del cultivo se localizan fundamentalmente en Baracoa (Guantánamo), Niquero y Pílon (Granma), así como en algunos municipios de Holguín, Sancti Spíritus y Pinar del Río Cueto y col., (2007).

El cocotero es una drupa cubierta de fibras de 20 a 30 cm y puede llegar a pesar hasta 2,5 kg. La baja conductividad al calor, la resistencia al impacto, a las bacterias y al agua, son algunas de sus características.

Se caracteriza por una alta porosidad, hasta el 95%, lo que le confiere una excelente distribución de aire y agua, el paso del aire es superior al 20%. Además, dado su contenido en lignina (>45%), es muy estable asegurando buenas características físicas durante largo periodo de tiempo.

Debido a su extensa versatilidad, se puede utilizar en la mayoría de las industrias para diferentes fines, algunos ejemplos, construcciones, tableros de partículas, pasta y papel, carbón vegetal, leña, abono y cultivo de hongos comestibles. Varios autores refieren resultados favorables al utilizarla en la producción de setas comestibles (Wabali y col., 2021; Heredia y col., 2016; Bermúdez y col., 2013). En la tabla 1 (Anexos) se presenta la composición de la cáscara de coco.

2.3.3. Cáscara de maní.

El maní (*Arachis hypogaea* L.), es un cultivo muy apreciado. La cáscara está constituida aproximadamente por 95% de materia orgánica y 5% de minerales presentes en las cenizas (generalmente Si, Ca, Mg, K, Al, P, S, Cl). La estructura celular de la cáscara de maní está formada principalmente por celulosa, lignina y hemicelulosa (Singh y col., 2021; Fasihah y col., 2018) Contiene, además, otros polisacáridos, lípidos, proteínas, minerales, azúcares libres y resinas.

La cáscara de maní es difícilmente degradable en su exposición al exterior, debido a su alto contenido de lignina y bajo contenido de nitrógeno. Su tamaño no supera los 2,5 cm de longitud, 1,5 cm de ancho y 1 cm de espesor. Varios estudios muestran resultados favorables al ser utilizado este subproducto agrícola como sustrato en el cultivo de setas comestibles (Ganguly y col., 2020; Ravera y col., 2008; Bernabé y col., 2006). Se presenta la composición de la cascara de maní en tabla 3 (Anexos).

En la producción de setas comestibles influyen tres factores fundamentales: cepa, sustrato y condiciones de cultivo (Mukundraj y col.,2021; García, 2008). Es por ello que, considerando los aspectos descritos anteriormente, sobre la procedencia y disponibilidad de estos tres subproductos agrícolas, así como sus potencialidades, se desarrolló el presente trabajo con la finalidad de evaluar el efecto de los mismos, al ser empleados como sustratos, en el cultivo de setas comestibles *Pleurotus* y *Lentinula*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología y en la Planta de Investigación-Producción de setas comestibles del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, en el período noviembre 2017 a junio 2018.

3.1. Cepas de basidiomicetos.

Se utilizó la cepa CCEBI 3024 de *Pleurotus ostreatus* (Florida), procedente de la colección de cultivos del CEBI y la cepa Le 236 de *Lentinula edodes* procedente de la colección del Laboratorio de Cultivos Puros de Hongos del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT), originaria de la Universidad de Fujian, China y donada al CEBI .

3.2. Materiales y equipos.

Entre los equipos empleados en la investigación están: autoclave (BK-75, URSS), cámara climatizada, balanza analítica y balanza técnica, (Sartorius, Germany), flujo laminar, estufa de cultivo (Mettler, Germany), mufla (MLW, GDR), plancha de calentamiento, pH-Metro (Philips, UK), quemadores Bunsen, aire acondicionado, refrigerador doméstico, báscula y extractor de aire.

Entre los materiales y utensilios empleados en la investigación están: bolsas de polietileno transparentes (PVC), de 15x25cm, hilo o soga pita, cubos, bandejas metálicas, cuchillas, sistema de riego por aspersion, cristalería, pomos de vidrio, ollas, cal hidratada seca o CO_3Ca , canastas metálicas, termómetro e higrómetro. El grano semilla utilizado como soporte para elaborar los inóculos fue el sorgo rojo (*Sorghum vulgare*).

3.3. Sustratos.

Para el crecimiento y fructificación de las cepas de *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*, se emplearon sustratos naturales recolectados en la provincia Santiago de Cuba, tratados según la metodología descrita por Bermúdez y col., (2010).

Los sustratos utilizados fueron:

- Pulpa de café (*Coffea canephora* Pierre ex Frhoener), con tamaño de partícula entre 1,25cm y 2,00cm, proveniente del Centro de beneficio húmedo “Filé”, en el municipio Tercer Frente.

- Cáscara (fibra) de coco (*Cocos nucifera* L.), con tamaño de partícula entre 2 y 3cm, procedente de las producciones de trabajadores por cuenta propia del Consejo Popular “Baire”, municipio Contramaestre.
- Cáscara de maní (*Arachis hypogaea* L.), con tamaño de partícula entre 1 y 2cm, recolectada de planta descascaradora de trabajadores por cuenta propia del Consejo Popular “Baire”, municipio Contramaestre.

Estos sustratos fueron sometidos a un proceso de secado solar para su almacenamiento y posterior traslado hasta la planta de investigación producción de setas comestibles del CEBI.

3.4. Características específicas de los experimentos.

3.4.1. Experimento I. Cultivo de *Pleurotus ostreatus*.

En el Experimento I se estudió el efecto del sustrato, con los tres subproductos agroindustriales lignocelulósicos de diferentes especies vegetales seleccionados, en el crecimiento y producción de la cepa CCEBI 3024 de *Pleurotus ostreatus*, profundizándose en lo relacionado con la respuesta de los diferentes indicadores de la productividad, según metodología de Bermúdez y col., (2010).

El material fúngico de la cepa CCEBI 3024 de *Pleurotus ostreatus* fue conservado en agar extracto de malta (AEM) a 4°C en oscuridad, hasta su empleo en las investigaciones. Se utilizó esta cepa por ser la de referencia de la planta de investigación producción del CEBI (Bermúdez y col., 2010; Bermúdez y col., 2018)

Durante el desarrollo del experimento, para la producción de las setas comestibles, se consideró como unidad experimental la bolsa de polietileno transparente termo-resistente (biorreactor). Se establecieron 5 réplicas para el cultivo. Se empleó un diseño estadístico bifactorial en Bloque Completos al Azar, incluyendo parámetros de interacción:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_{ij} + \epsilon_{ijk} \quad \text{con } i=1,2; j=1,2; k=1, \dots, n_{ij}$$

donde Y_{ijk} representa la respuesta de la k-ésima repetición en el i-ésimo nivel del factor A y j-ésimo nivel de factor B, μ representa una media general, α_i el efecto que produce el i-ésimo nivel del factor A, β_j corresponde al efecto del j-ésimo nivel del factor B, δ_{ij} el efecto adicional (interacción) para la combinación de los niveles i del factor A y j del factor B y ϵ_{ijk} es el error aleatorio asociado a la observación ijk-ésima. Los términos ϵ_{ijk} que usualmente se suponen normal e independiente distribuidos con esperanza cero y varianza común σ^2 . Debe notarse que el subíndice k se

mueve entre 1 y n_{ij} , es decir, el número de repeticiones para el tratamiento puede ser distinto.

3.4.2. Experimento II. Cultivo de *Lentinula edodes*.

En el Experimento II se evaluó el efecto del sustrato, con los tres subproductos agroindustriales lignocelulósicos de diferentes especies vegetales seleccionadas, en el crecimiento y producción de la cepa Le 236 de *Lentinula edodes*, de la cual no se tiene experiencia en la planta de investigación producción de setas comestibles del CEBI.

Dadas las características de esta cepa es necesario realizar una modificación en la metodología de trabajo, consistente en la introducción de un choque térmico en refrigeración (0-4°C) por 24 horas. La cepa Le 236 de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, caracterizada por ser una cepa tropicalizada y de buena productividad, fue conservada en agar extracto de papa dextrosa (AED) a 4°C en oscuridad, hasta su empleo en las investigaciones.(Tabla 1)

Tabla 1. Parámetros de temperatura para L 236 de *Lentinula edodes*

Temperatura	Temp. Crec. Micelial	Temp. Crec. Fructificación.	Temp. óptima Micelial	Temp. óptima Fructificación
Le236	5-32	5-25	23-25	8-15

En este experimento, al desarrollar la producción de las setas comestibles sobre los sustratos pulpa de café, cáscara de maní y cáscara de coco, se consideró como unidad experimental la bolsa de polietileno transparente termo-resistente (biorreactor). Se utilizó un diseño estadístico bifactorial en bloques completos al azar, considerando resultados precedentes García, (2008). Se establecieron 6 réplicas para el cultivo de la cepa de *Lentinula edodes*.

Para el análisis estadístico de la colonización de la cepa de *Lentinula edodes* en los sustratos ensayados, se estableció una escala jerárquica convencional (Escala 1), creada a tales efectos, donde se les dio valor a los diferentes grados de colonización en los biorreactores:

Escala 1: Grado de colonización de la cepa de *Lentinula edodes* en los sustratos pulpa de café, cáscara de coco y cáscara de maní.

Colonización del 90 al 100 % -----10 puntos (Colonización completa)

Colonización del 89 al 60 % -----8 puntos (Colonizado)

Colonización del 59 al 20 % -----5 puntos (Colonización parcial)

Colonización < 20 %-----3 puntos (Colonización pobre)

Se realizó un muestreo aleatorio simple, en un plan donde el tamaño de la muestra fue de $n=6$, existiendo entre ellas la misma probabilidad de ser seleccionada.

3.5. Metodología de cultivo.

Preparación del inóculo.

El inóculo se elaboró con granos semillas de sorgo rojo (*Sorghum vulgare*), las que fueron seleccionadas y luego hidratadas por 24 horas. Para la esterilización se emplearon frascos de vidrio de boca ancha, la misma se realizó en autoclave a 121°C, durante 1 hora y 15 minutos.

Para iniciar la producción del inóculo se sembraron las cepas CCEBI 3024 de *P. ostreatus* y Le 236 de *L. edodes* en placas Petri con medio agarizado, colocando una pequeña porción en el centro de la placa con el asa microbiológica, para lograr una colonia gigante. Los cultivos se incubaron a 22°C durante 12 o 17 días, tiempo en que el micelio logró cubrir toda la placa.

La inoculación se realizó en condiciones asépticas, en la cámara de flujo laminar, utilizando frascos de vidrio de boca ancha, una vez que la semilla soporte estuvo completamente estéril y fría. Los envases se mantuvieron en reposo, a una temperatura de 22 °C, en condiciones de penumbra hasta lograr la total propagación del micelio.

Preparación del sustrato.

El procedimiento que se utilizó para preparar la pulpa de café, la cáscara (fibra) de coco y la cáscara de maní fue: limpieza del subproducto para eliminar los cuerpos extraños, molienda hasta obtener un tamaño de partícula entre 1 y 3 cm, hidratación por inmersión en agua por 24 horas, se escurre y se pasteuriza por 1 hora a 90°C o se esteriliza en autoclave a 121°C y 1atm de presión durante 1 hora y 15 min..

Inoculación del sustrato.

Una vez escurridos y a temperatura ambiente los sustratos, en condiciones de asepsia, se mezclaron con el inóculo a partir de las cepas seleccionadas CCEBI

3024 y Le 236, a razón del 10% de inóculo con relación al peso de sustrato húmedo. Se homogenizó de forma tal que todo el inóculo quedara distribuido en el volumen de sustrato (Figura 1).

Se colocaron en bolsas con un peso húmedo de 500g para la pulpa de café y 400g para las cáscaras de maní y coco. Posteriormente las bolsas fueron selladas y se les eliminó las puntas para favorecer el intercambio con el medio circundante. Luego se colocaron en estantes ubicados en el cuarto de colonización. Se prepararon un total de 15 unidades experimentales para *Pleurotus ostreatus* y 18 para *Lentinula edodes* Bermúdez y col., (2010).

Colonización.

La producción de setas se realizó en el cuarto de colonización bajo condiciones controladas, con penumbra, a una temperatura entre 24 y 26⁰C. En esta etapa el micelio, de ambas cepas, se desarrolló de forma vegetativa y se obtuvo crecimiento sobre toda la masa del sustrato. Al tercer día de incubadas a las bolsas se le realizaron perforaciones de 1 cm de diámetro, separadas cada perforación a una distancia de 8 cm (Figura 2). Durante esta etapa se realizaron evaluaciones diarias, con la finalidad de verificar el estado sanitario del sustrato inoculado.

Fructificación.

Cuando el micelio colonizó el sustrato, se observó un grado de compactación que facilitó el retiro de la bolsa de nylon. Además, se realizaron cambios en las condiciones ambientales del local de fructificación para la estimulación y desarrollo de los cuerpos fructíferos (Arenas y col., 2015; Bermúdez y col., 2010).

La humedad relativa en el local oscilo entre 90-95%, lo cual se logró mediante la nebulización con un dispositivo de riego por aspersion, efectuándose dos riegos diarios, uno en la mañana y otro en la tarde.

Con el aire acondicionado se estableció una temperatura del local entre 22-26⁰C.

La iluminación de alrededor de 400 Lux, con fotoperiodos de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, que se logró con lámparas fluorescentes colocadas en el techo y paredes del cuarto de fructificación.

La ventilación para regular el CO₂ ambiental, o sea el producido durante la respiración del hongo, se logró mediante extractor de aire, removiendo el aire 2 o 3 veces al día.

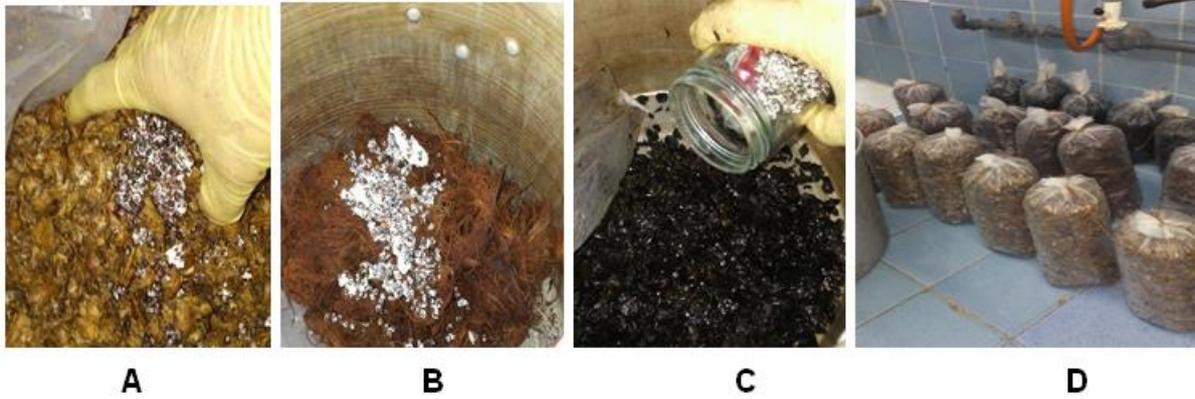


Figura 1. Mezcla de los inóculos, cepas de *Lentinula edodes* y *Pleurotus ostreatus* con los sustratos, **A** cáscara de maní, **B** cáscara de coco **C** pulpa de café, **D** preparación de las bolsas o biorreactores.



Figura 2. Procedimiento para realizar las perforaciones en biorreactores inoculados con la cepa CCEBI 3024 de *P. ostreatus*, sobre los sustrato pulpa de café, cascara de coco y cascara de maní.

Cuando aparecieron los brotes o primordios se inició la inducción con iluminación; una vez desarrollado el cuerpo fructífero o seta, o sea cuando la oreja se encontraba ya en forma plana se inició la cosecha, para lo cual se utilizó un instrumento afilado. Una vez cosechadas las setas, se eliminaron los restos de sustrato y se pesaron, se registró el peso fresco y estas fueron conservadas en refrigeración para su posterior análisis.

3.6. Determinación de los indicadores de productividad y biodegradabilidad.

Indicadores de productividad.

- Producción promedio por bolsa: definida como el total de setas frescas producidas entre el número de bolsas que produjeron.
- Rendimiento: definido como la relación en porciento entre el peso fresco de las setas y el peso del sustrato húmedo.

$$\text{Rendimiento (R)} = \frac{\text{Peso de las setas frescas}}{\text{Peso del sustrato húmedo}} \times 100 \quad (1)$$

- Eficiencia biológica: Definida como la relación en porciento del peso de las setas frescas y el peso seco del sustrato.

$$\text{Eficiencia biológica (EB)} = \frac{\text{Peso de las setas frescas}}{\text{Peso del sustrato seco}} \times 100 \quad (2)$$

Para determinar la factibilidad económica del proceso se consideró lo establecido para esta tecnología, rendimientos superiores al 10% y eficiencia biológica con valores como mínimo del 40% (Shuai y col., 2020; Puig y col., 2020)

- Precocidad (P): Definida como el tiempo que transcurre entre el día de la inoculación y el día en que aparecen los primeros primordios o carpóforos.

Los parámetros morfológicos de las setas comestibles se evaluaron según las características cualitativas y cuantitativas de las fructificaciones (aspectos morfológicos, color, diámetro de los cuerpos fructíferos y número de setas).

Se registraron las observaciones sobre el crecimiento del micelio y el día de aparición de los primordios. Para cada bolsa se llenó un formulario con los datos de la producción y los parámetros de control: precocidad, rendimiento, eficiencia biológica y tasa de producción (García y col., 2011; García, 2008).

Criterio de biodegradación.

Para obtener información sobre este proceso, una vez concluida la cosecha de las setas comestibles, el sustrato remanente se mantuvo en los estantes de producción durante 3 o 4 días hasta observar la pérdida de humedad, para luego realizar el pesaje y determinar el porcentaje de masa seca remanente Bermúdez y col., (2010). El nivel de biodegradación del sustrato se evaluó a través de la pérdida del contenido de materia orgánica en el mismo, considerando las pérdidas de CO₂ y H₂O durante el metabolismo de las cepas estudiadas, así como la remoción de materiales del sustrato por la formación de las setas García y col., (2011).

Para ello se tuvo en cuenta el comportamiento de los parámetros precocidad, rendimiento, eficiencia biológica y variación en el peso inicial de los sustratos. A modo de resumen en la (Figura 3) se muestra el esquema de trabajo desarrollado durante las diferentes etapas de la investigación con las cepas *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*.

3.7. Análisis estadísticos.

En el Experimento I, con la cepa de *Pleurotus ostreatus*, para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó un análisis de varianza bifactorial, para determinar la interacción entre los factores analizados. Se realizó la comparación múltiple entre la media de los tratamientos y sus interacciones mediante el test de Comparación de Rangos Múltiples de Duncan, con una confiabilidad del 95% Di Piazza y col., (2021). En el Experimento II, con la cepa de *Lentinula edodes*, para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó un análisis de varianza bifactorial, para determinar la interacción entre los factores analizados. Se analizó el grado de colonización del hongo en los sustratos ensayados de acuerdo a la Escala 1 (Epígrafe 3.4.2).

Se realizó un muestreo aleatorio simple, en un plan donde el tamaño de la muestra fue de $n=6$, existiendo entre ellas la misma probabilidad de ser seleccionada.

Utilizando el paquete estadístico *InfoStat*, Vers. 2008, fue creada una matriz de datos, para procesarla mediante el análisis estadístico completamente aleatorio; el archivo de datos contuvo dos columnas, una identificando al tratamiento (variable de clasificación) y otra a la variable respuesta (variable dependiente).

El nivel de error experimental seleccionado tanto para muestreo, el análisis estadístico y la prueba de normalidad (Shapiro –Wilks modificada), según Di Rienzo y col., (2011), fue < 0.05 p, los parámetros de normalidad mostraron valores muy confiables (0,004), para este nivel de error escogido.

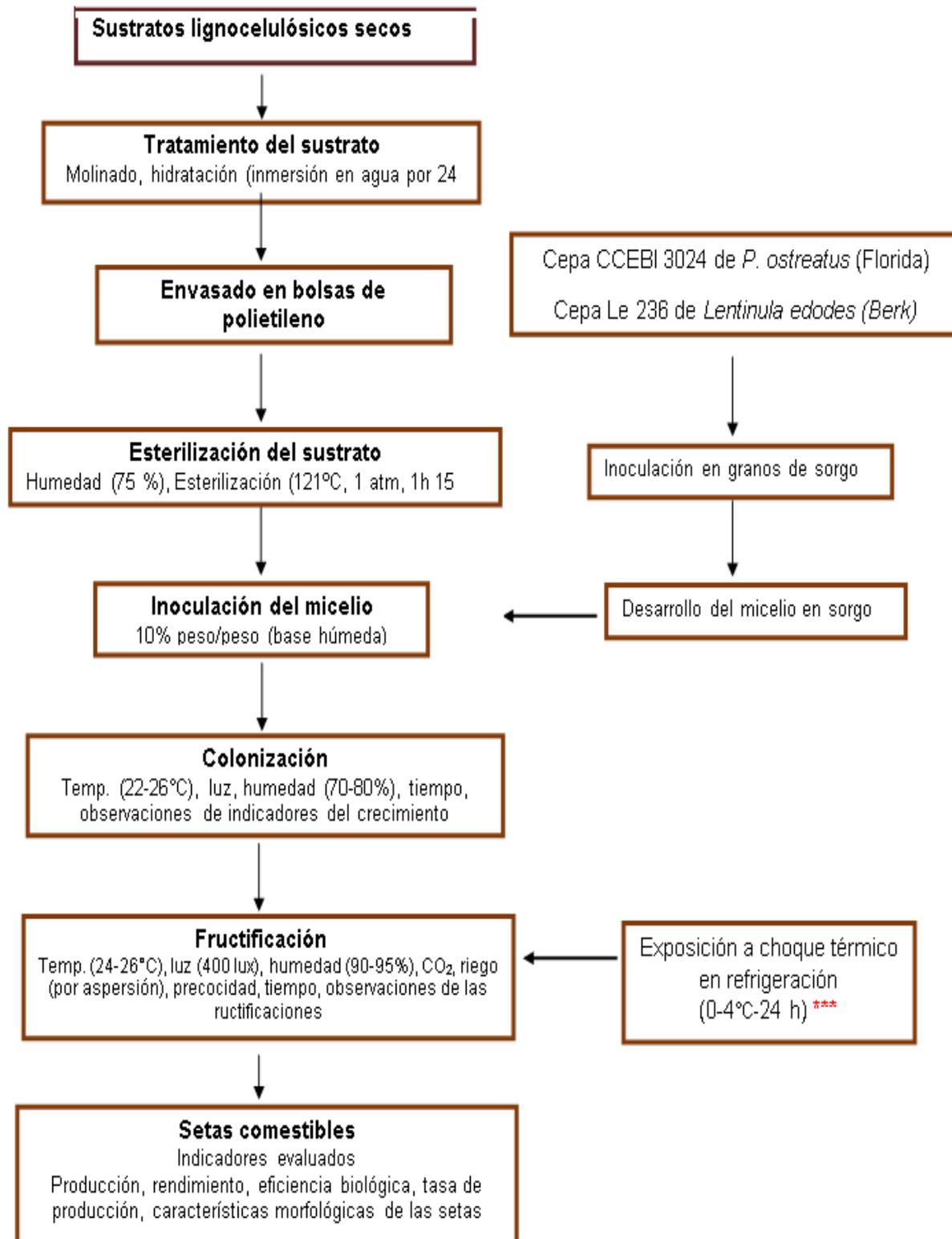


Figura 3. Esquema de las etapas de investigación desarrolladas con las setas comestibles *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*.

Leyenda: ***Solo para la Cepa Cepa Le 236 de *Lentinula edodes*

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de los sustratos sobre el crecimiento y desarrollo de *Pleurotus ostreatus*.

Es de destacar que la preparación de la cepa CCEBI 3024 de *P. ostreatus*, en placas Petri sobre medio de cultivo AEM, para iniciar los experimentos resultó exitosa, aspecto que permitió avanzar en el cultivo. A diferencia de algunas investigaciones, donde la producción de micelios uniformes de siembra constituye uno de los problemas primordiales en las acciones de introducción y cultivo para la producción de hongos comestibles Kamalakannan y col., (2020)

En este sentido, el desarrollo de los métodos de trabajo para el cultivo de la seta *P. ostreatus*, al tercer día de cultivo permitió un crecimiento abundante del micelio en los sustratos pulpa de café, cáscara de maní y coco. A los cinco días de cultivo fue notable la presencia de una colonización homogénea, cercana al 80%, en la totalidad de los biorreactores inoculados (Figura 4).

Se observó que el sustrato colonizado quedó bien compactado y cubierto de micelio blanco, resultó factible las aberturas a las bolsas; así como la inducción de luz lo que estimuló la aparición de primordios, con una precocidad de 10 días en los tres sustratos. Otro aspecto a considerar es la densidad del sustrato, que al parecer en este caso garantizó que la seta pudiera invadir al mismo de forma homogénea, propiciando el intercambio gaseoso de manera efectiva entre éste y el medio ambiente inmediato.

La respuesta observada se relaciona con la capacidad que tiene esta seta de producir determinadas exoenzimas, que degradan eficientemente la celulosa, hemicelulosa y lignina en compuestos de bajo peso molecular, que pueden ser asimilados por estos organismos. Algunos autores señalan que quizás el objetivo metabólico de la degradación de lignina por este grupo de hongos es acceder a la celulosa y hemicelulosa, que representan su fuente de carbono y energía (Marín y col., 2020; Meera y col., 2020; Vellaichamy y col., 2020)

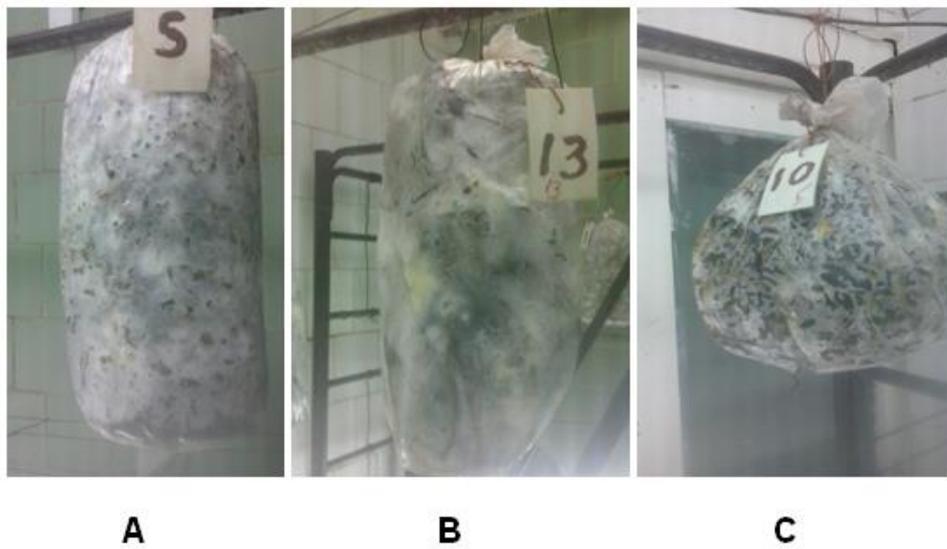


Figura 4. Colonización completa de los sustratos **A** cáscara de maní **B** cascara de coco y **C** pulpa de café en biorreactores inoculado con la cepa CCEBI 3024 de *P. ostreatus* a los cinco días de cultivo.

Al realizar el tratamiento estadístico a los datos experimentales, con el análisis de varianza bifactorial con interacciones, se obtuvo que entre los parámetros productivos; el sustrato (Sust); y la interacción (PPr x Sust), existieron diferencias altamente significativas desde el punto de vista estadístico.

Es de señalar que este comportamiento puede estar dado a que el peso fresco es directamente proporcional al parámetro productivo eficiencia biológica, y en este estudio se emplearon sustratos naturales que presentan características adecuadas para la propagación del micelio y la formación de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus*, ya que son lignocelulósicos, que aportan nutrientes esenciales para el desarrollo y crecimiento de estas setas. Bermúdez y col., (2018)

A la vez la biodegradación de estos residuos de naturaleza lignocelulósica constituye una de las herramientas biotecnológicas con la que es factible disminuir la contaminación ambiental.

Las eficiencias biológicas logradas (Figura 5), son superiores a los informados por varios autores para *P. ostreatus* crecido sobre otros sustratos, aunque también a partir de residuos agroindustriales. Así, por ejemplo, se reportan valores de 37 a 41% sobre mosto proveniente de la vitivinicultura (Kılıç, 2020; Besufekad y col., 2019) valores de 10 a 33% sobre bagazo de la agroindustria del mezcal (Heredia y col., (2016).

Es válido destacar que, aunque en estos estudios se empleó la seta *P. ostreatus* y residuos agroindustriales, estos se diferencian de los resultados citados anteriormente en la forma de preparación del sustrato de siembra, así como la metodología para las etapas de incubación, fructificación y cosecha del hongo.

El rendimiento obtenido, 8.9 % con la pulpa de café, y 5.4 y 5.3 % con cáscara de coco y maní, respectivamente (Figura 6), alcanzó valores superiores a los informados en la literatura al desarrollar algunos estudios similares. Así, por ejemplo, se informó un rendimiento de sólo 3% con cáscara de maní (Kumla y col., 2020; Ravera y col., 2008).

Sin embargo, a su vez los porcentajes de este estudio resultaron inferiores a los alcanzados por otros investigadores al emplear diferentes residuos agroindustriales, tales como, 15% con paja de arroz, y 11% con hojas de plátano (Muswati y col., 2021; Ganguly y col., 2020)

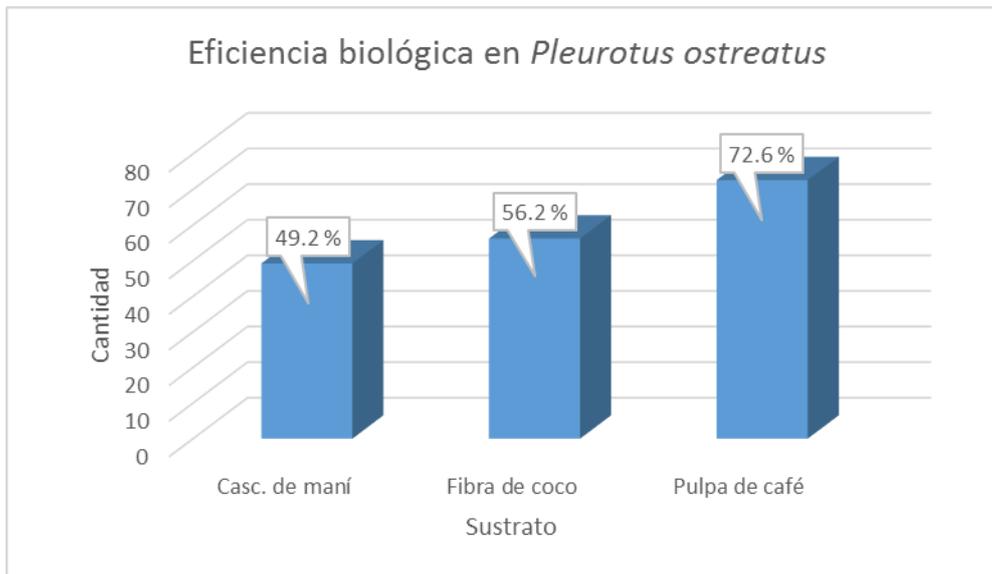


Figura 5. Valores de eficiencia biológica (EB) durante el cultivo de la cepa CCEBI 3024 de *P. ostreatus* en los sustratos estudiados.

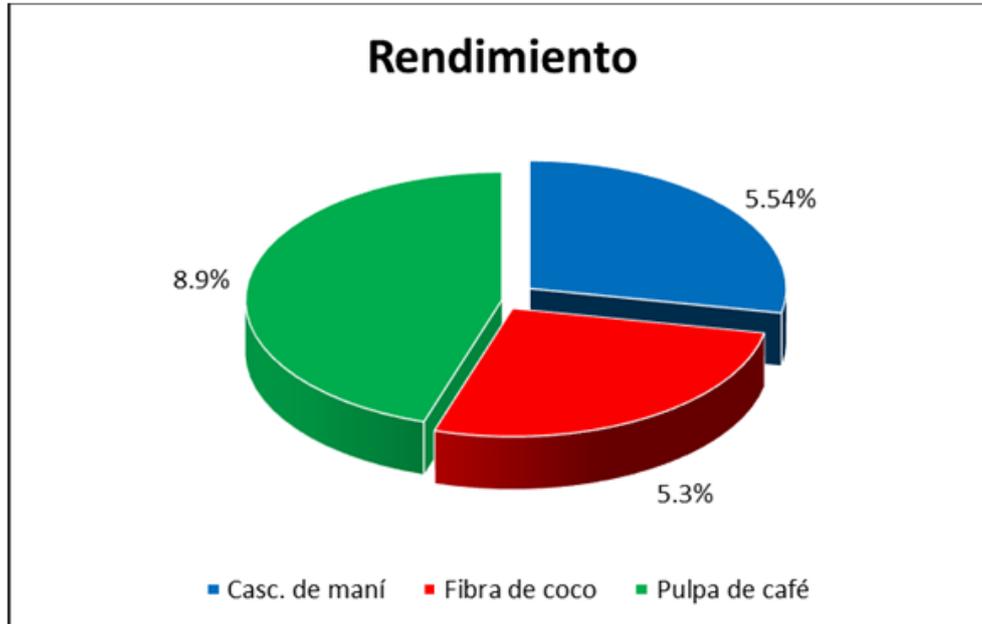


Figura 6. Valores del Rendimiento durante el cultivo de la cepa CCEBI 3024 de *P. ostreatus* en los sustratos pulpa de café, cáscara de coco y cáscara de maní.

Los resultados corroboran la validez de profundizar en estudios de esta índole, a fin de obtener mayor información de las alternativas más factibles de utilizar durante el desarrollo de estas prácticas, que resultan de efectos benéficos para la salud humana y el medioambiente (Winston y col., 2017; Grande., 2016).

Estos sustratos presentan determinadas características químicas y físicas, que de una u otra forma influyen en el desarrollo micelial, fructificación y rendimiento final del cultivo de *P. ostreatus* (Cunha y col., 2019; García y col., 2011; Bermúdez y col., 2010; Escobar y col., 2007; Bernabé y col., 1994)

No obstante, del valor alcanzado en el sustrato cáscara de maní con la cepa CCEBI 3024 de *P. ostreatus*., o sea inferior al que se obtuvo con la pulpa de café, es importante su consideración, por la influencia de la gran cantidad de oleadas, el número de primordios, entre otros aspectos a tener en cuenta en este tipo de experimentaciones. Este constituye un resultado novedoso y que puede ser de gran aplicación práctica en el cultivo de hongos comestibles, siendo útil, económico y beneficioso. Es de destacar que, la producción mundial de setas comestibles cobra cada día mayor auge, a tal punto que la producción mundial exhibe cifras que superan los 6 millones de toneladas de setas frescas por año (Mukundraj y col., 2021; Martínez y col.,2012)

Las características de sustratos naturales como la cáscara de maní, son favorables para la propagación del micelio y la formación de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus*, ya que es un sustrato lignocelulósico, compuesto por celulosa, lignina y hemicelulosa (Costinel y col., 2020; Fasihah y col., 2018) (Tabla A1, en Anexos).

Contiene, además, otros polisacáridos, lípidos, proteínas, minerales, azúcares libres y resinas, que permite la obtención de cuerpos fructíferos de calidad y listos para ser cosechados. Otro aspecto valioso a considerar es que dicho sustrato es propio de la región, o sea un recurso de procedencia local, lo que garantizaría la disponibilidad y a la vez se facilita la recolección, el traslado y la aplicación de los tratamientos necesarios, hasta quedar listo para ser utilizado como sustrato con estos fines.

Por otro lado, este sustrato presenta una característica muy atractiva y es la baja probabilidad de presencia de microorganismos contaminantes, a pesar de ser expuesto al medio ambiente durante el proceso de secado (Ganguly y col., 2020; García y col., 2011; Bernabé y col., 1994) lo que se atribuye a su alto contenido de lignina y bajo contenido de nitrógeno, todo esto contribuye a una mayor eficiencia

del proceso de producción de setas comestibles (Figura 7), a diferencia de la pulpa de café que se contamina fácilmente, dada su composición química rica en azúcares (Gordana Šelo y col., 2021; García y col., 2011) unido a al factor humedad. El estudio de las potencialidades de este residuo, así como su aprovechamiento constituye una forma de aplicación de gran valor desde el punto de vista económico y medioambiental.

4.2. Evaluación de la biodegradación de los sustratos por *Pleurotus ostreatus*.

Al realizar un análisis comparativo de los niveles de los sustratos evaluados al iniciar y al finalizar del proceso de biodegradación por la cepa de *P. ostreatus* estudiada, se observó un cambio significativo. Los resultados muestran que por cada kilogramo de sustrato fresco: pulpa de café, cáscara de maní y cáscara de coco, se obtuvieron como promedio 320, 235 y 200 g de setas frescas, respectivamente. Al realizar la evaluación del volumen del sustrato en cuanto a su contenido en materia orgánica, debido al proceso de bioconversión, fue notable la reducción en los niveles de la misma. (Tabla 2)

Es conocido que durante el metabolismo de los hongos ocurren pérdidas de CO₂ y H₂O, así como la remoción de materiales del sustrato por la formación de las setas (Bermeo y col., 2020; García y col., 2011) se plantea que la extensión de la biodegradación del sustrato a través de la pérdida de la materia orgánica, es el criterio más simple para dicha evaluación. En investigaciones precedentes, ha sido demostrado por diferentes autores que los procesos de crecimiento y fructificación de las setas, sobre los diversos sustratos lignocelulósicos que suelen emplearse como sustratos de siembra conllevan a la reducción en el contenido de materia orgánica Anike y col., (2016).

Respecto al indicador de precocidad, los resultados obtenidos en los tres sustratos evaluados, se manifestó a los 10 días de cultivo, aspecto significativo al ser menor que los reportados (Yao y col., 2021; Bermúdez y col., 2018; García y col., 2011; García, 2008; Bermúdez y col., 2001)



A

B

C

Figura 7. Biorreactores con la presencia de cuerpo fructífero de la cepa CCEBI 3024 de *P. ostreatus*, crecida sobre **A** cáscara de maní, **B** cascara (fibra) de coco **C** pulpa de café.

Tabla 2. Bioconversión de los sustratos con la cepa CCEBI 3024 de *P. ostreatus*

Sustratos puros	Cantidad de setas frescas (%)	Volumen de Sustrato bioconvertido (%)	CO₂ y H₂O (%)
Pulpa de café	32	62	6
Cáscara de maní	23	73	4
Cáscara de coco	20	67	13

Este resultado es de gran importancia, ya que dicho indicador es uno de los principales elementos a tener en cuenta en la valoración de la calidad del sustrato, para ser introducido en la tecnología de cultivo de cualquier especie de seta comestible. Al analizar el número de brotes y de ramilletes por bolsa, se observó que con el sustrato cáscara de maní se obtuvo mayor valor, con respecto a la cáscara de coco y la pulpa de café (Figura 8); resultado que constituye otras de las evidencias para valorar la factibilidad de empleo de este subproducto lignocelulósico en el cultivo de setas comestibles.

Las primeras oleadas de setas generaron menor rendimiento con el sustrato pulpa de café, en este sentido es de destacar que la seta se desarrolló más rápidamente sobre cáscara de maní y coco. Esta diferencia en cuanto a la velocidad de crecimiento se observó desde la fase de colonización, donde el micelio del hongo mostró una rápida activación sobre estos dos sustratos de siembra, a diferencia de la pulpa de café; respuesta que puede atribuirse a un menor contenido de fenoles totales en estas variantes de sustrato, lo que facilita un mayor nivel de acceso del hongo cultivado a los nutrientes demandados (Yao y col., 2021; García y col., 2011). Estos resultados difieren de los alcanzados por otros autores al trabajar con *P. ostreatus*, que encontraron que los altos niveles de lignina presentes en cáscara de maní limitaron el proceso de biodegradación y tuvieron que incluir un co-sustrato para favorecer el proceso dicho Anike y col., (2016).

Además el comportamiento de las oleadas en los distintos biorreactores, que presentaron diferencias marcadas según el tipo de sustrato, con un número mayor en la cáscara de maní, obteniéndose 4 oleadas en 3 de los biorreactores, seguido por el sustrato cáscara de coco y en menor número la pulpa de café, (Figura 9) se pudiera atribuir al nivel de división del sustrato, ya que al ser mayores las partículas, con gran cantidad de fibras se dificulta la reducción del tamaño y la absorción de la humedad necesaria para el buen funcionamiento del residuo como sustrato (Kamalakaran y col., 2020; García y col., 2011; Bernabé y col., 1994)

Es importante considerar que el nivel de compactación, la granulometría, entre otros, son importantes propiedades que unidas a las condiciones ambientales permiten en menor o mayor grado el crecimiento vegetativo y reproductivo de la seta que se cultiva, llegando a determinar finalmente el desarrollo satisfactorio o no del cultivo Raman y col., (2020)



Figura 8. Precocidad a los 10 días de cultivo con la cepa CCEBI 3024 de *P. ostreatus*

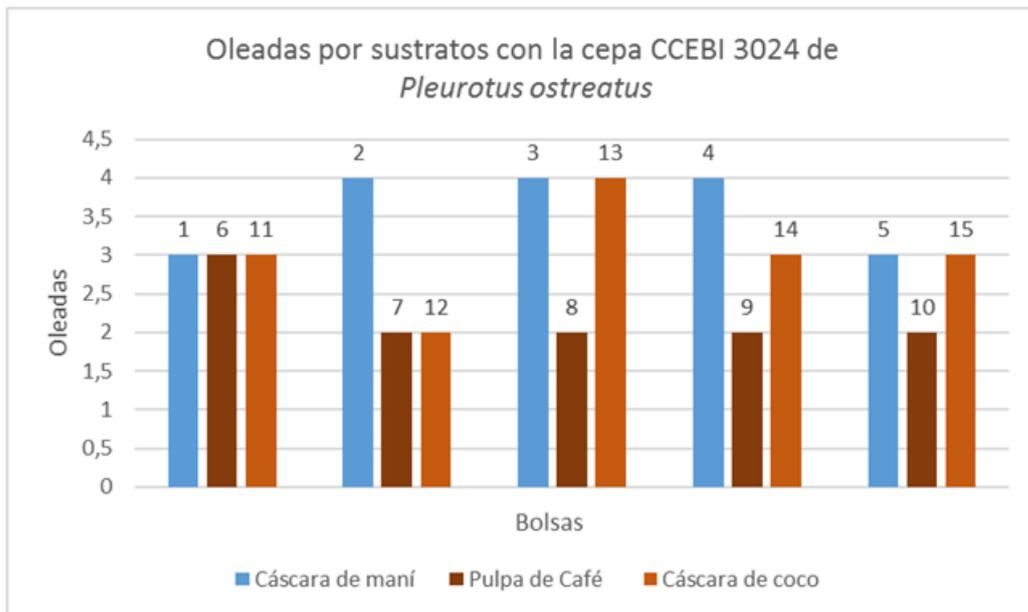


Figura 9. Comportamiento de oleadas por sustrato de siembra con la cepa CCEBI 3024 de *P. ostreatus*.

4.3. Efecto de los sustratos sobre el crecimiento y desarrollo de *Lentinula edodes*.

La preparación de la cepa Le 236 de *L. edodes*, en placas Petri sobre medio de cultivo APD, para iniciar los experimentos resultó satisfactoria, lo que propició el desarrollo del cultivo. Se obtuvieron abundantes micelios uniformes para la introducción y producción de la seta comestible. Algunos autores realizan este proceder, en la fase inicial de preparación de las cepas de las distintas setas comestibles, con medios de variada composición química, así por ejemplo sobre el mosto de la cerveza con agar Mahdizadeh y col., (2021)

En este caso, durante la obtención de los inóculos primarios se observó una colonización total en la mayoría de los frascos inoculados, con aglomeración del micelio en forma de motas algodonosas en el soporte grano semilla de sorgo rojo utilizado, con más del 80% de colonización del micelio y libre de contaminación microbiana. (Figura 10)

En este experimento, al realizar el análisis de varianza se obtuvieron diferencias altamente significativas $< 0,0001$ p en la colonización de los sustratos cáscara de coco, cáscara de maní y pulpa de café por la cepa de *L. edodes*.

Como se puede apreciar, en la (Figura 11) el mayor grado de colonización por la seta *L. edodes* se obtuvo en el sustrato de siembra cáscara (fibra) de coco, lográndose un nivel de colonización completa, seguido por la respuesta observada sobre el sustrato cáscara de maní que resultó solo colonizada, (Figura 12) de acuerdo con la escala jerárquica convencional (Escala 1), establecida a tales efectos.

Un resultado menos favorable fue obtenido con el sustrato pulpa de café donde se apreció una media inferior a 5, (Figura 13) aunque este es un sustrato rico en nutrientes para el crecimiento de setas, algunos estudios evidencian que en el caso de *Shiitake* esto no es suficiente, y es necesario garantizar determinadas condiciones de cultivo previas, que faciliten su adaptación.

Se plantea que existen grupos de enzimas del tipo oxidorreductasas como la lignina peroxidasa, la manganeso peroxidasa o la lacasa, que permiten la degradación por vía oxidativa de componentes estructurales de la lignina y compuestos de estructuras similares, que juegan un importante papel particularmente en la iniciación del crecimiento micelial.



Figura 10. Frascos inoculados con las cepas **A** Le 236 de *L. edodes*, **B** CCEBI 3024 de *P. ostreatus* con el empleo de sorgo rojo (50 g) como sustrato, conservados en penumbra a temperatura de 22°C. Observándose abundante crecimiento de los micelios maternos.

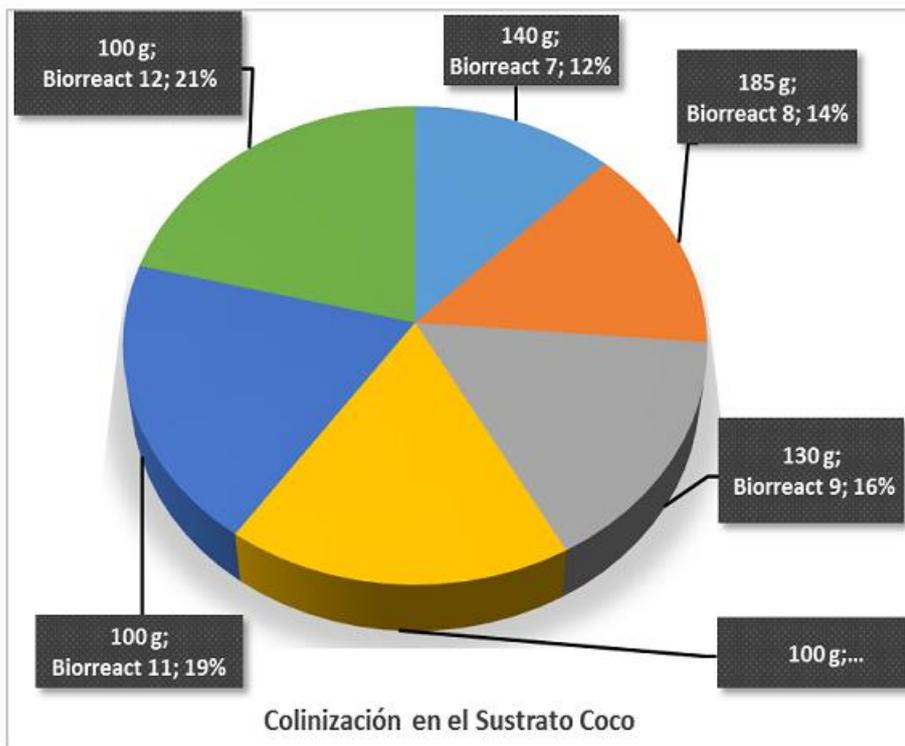


Figura 11. Porcentaje de colonización de la cepa Le 236 de *L. edodes* crecida sobre sustrato cáscara de coco.

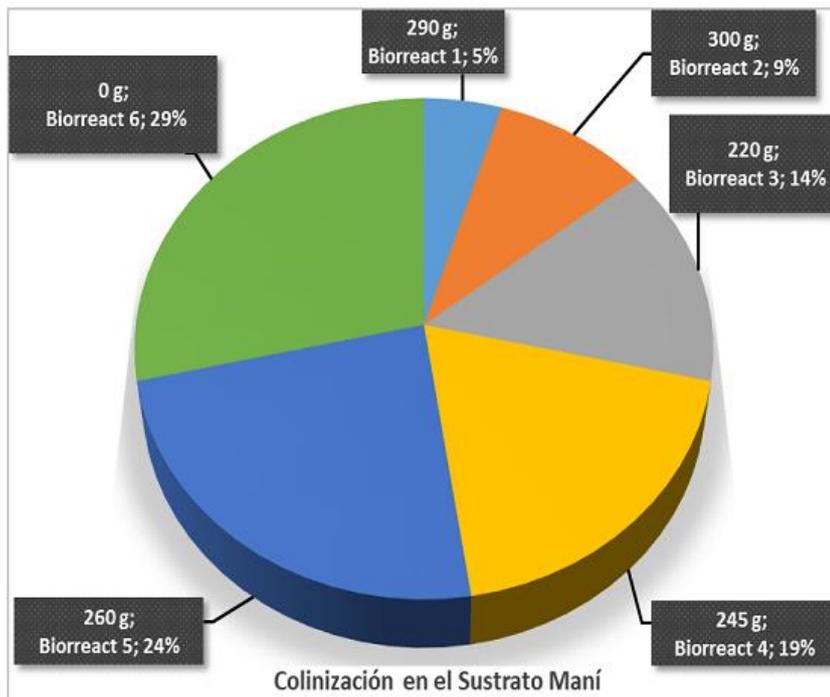


Figura 12. Porcentaje de colonización de la cepa Le 236 de *L. edodes* crecida sobre sustrato cáscara de maní.

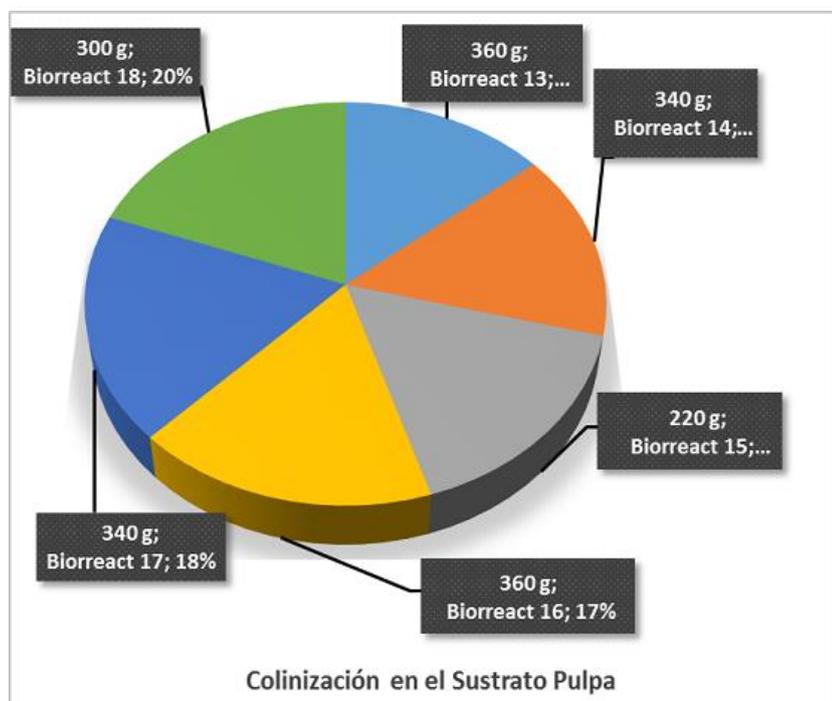


Figura 13. Porcentaje de colonización de la cepa Le 236 de *L. edodes* crecida sobre sustrato pulpa de café

De aquí que, para lograr incrementos en la eficiencia biológica de este sustrato, es necesaria una adecuada selección de las cepas, o sea se deben escoger aquellas que presenten características que satisfagan un nivel de desarrollo adecuado en la pulpa de café. (Raman y col., 2020; García N. (2008)

Al analizar los resultados productivos en cáscara de coco, se observó la colonización completa en 5 de los biorreactores inoculados, con la aparición de primordios y la formación de carpóforos, con una precocidad de 59 días, pero caracterizado por una baja eficiencia biológica.

En el sustrato cáscara de maní, donde se manifestó una colonización completa, solo en algunos biorreactores, se observó la formación de micoderma, posterior a ello hubo presencia de significativas contaminaciones microbianas.

En el sustrato pulpa de café, la totalidad de los biorreactores exhibieron escasa colonización (colonización pobre), según Escala 1, por parte de la cepa evaluada, o sea inferior al 20 % del sustrato de siembra, sin que tuviera lugar la formación de micodermas.

En el estudio con la cepa Le 236 y referente a los parámetros productivos, al emplear el sustrato cáscara de coco y durante un ciclo de 120 días, cabe destacar que la eficiencia biológica (EB), fue el indicador que mayor valor exhibido, obteniéndose un promedio de 12,9%; con un rendimiento muy bajo de solo 1,21 % (Figura 14).

Es de destacar que durante este estudio en todos los casos se emplearon los sustratos puros. Por lo que resulta de interés la respuesta observada en la producción de carpóforo con la cepa Le 236 de *L. edodes* sobre el sustrato cáscara (fibra) de coco, (Figura 15) aspecto que resulta ventajoso y facilita esta práctica. (Menon y col., 2021; Elisashvili y col., 2009)

A diferencia otros autores han señalado la necesidad de la mezcla de sustratos de siembra para lograr éxitos durante las etapas de colonización y fructificación (Mukundraj y col., 2021; Wasser, (2010). En este caso, la respuesta observada se atribuye a la relación carbono nitrógeno (C:N) presente en el sustrato cáscara de coco, dicho valor fue de 112 (Tabla A1 de Anexo), aunque según algunos autores, este puede alcanzar cifras de hasta 194. Shuai y col., (2020)

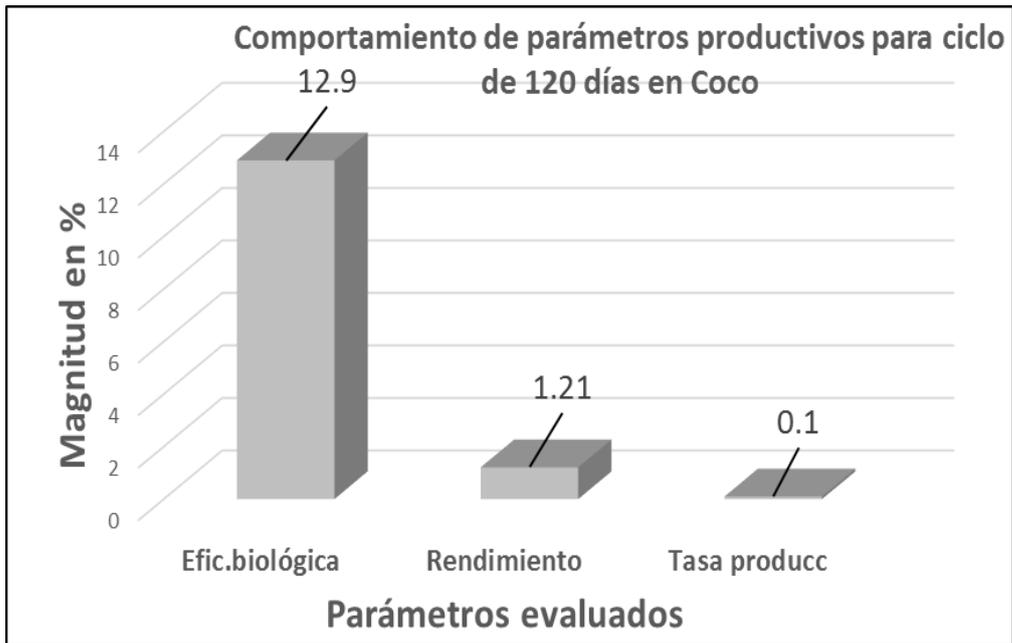


Figura 14. Comportamiento de los indicadores productivos de la cepa Le 236 de *L. edodes* sobre sustrato cáscara de coco.



Figura 15. Biorreactor con la presencia de cuerpo fructífero de la cepa Le 236 de *L. edodes*, crecida sobre cáscara de coco.

Estos resultados indican que la pulpa de café y la cáscara de maní, como sustratos puros quizás no poseen todos los requerimientos nutricionales necesarios para la tecnología de cultivo de setas comestibles de la especie *Lentinula edodes*, pues no se logró la fructificación. Con la cepa Le 236 de *L. edodes*, solo se lograron resultados promisorios al emplear el sustrato puro cáscara (fibra) de coco.

Otro factor que pudiera haber influido en estos resultados puede ser el pH (Tabla A1 del Anexo), al describir la caracterización química de los sustratos de siembra, la pulpa de café, cáscara de coco y cáscara de maní, subproductos utilizados en el presente estudio, los valores de pH aunque son ligeramente superiores en cáscara de maní y coco, se encuentran dentro de los parámetros óptimos para el cultivo del género *Lentinula* sp. Esto no ocurre así para la pulpa de café, con un valor muy alto (8.17), que pudo haber influido en el bajo grado de colonización observado en el sustrato. De forma general, la metodología desarrollada permitió obtener resultados alentadores con el cultivo de la cepa Le 236 de *L. edodes*, sobre el sustrato cáscara de coco. Se observó que a los 59 días de cultivo, el crecimiento del micelio en los biorreactores con este sustrato fue abundante, lo que permitió la cosecha de setas en 5 biorreactores a los 31 días de cultivo, con formación de micoderma color café.

Es de destacar que, por primera vez, en la planta de investigación producción de setas comestibles del CEBI se logró aplicar la metodología de exposición a choque térmico en refrigeración, a una temperatura de 0-4 °C por 24 horas. Lo que facilitó la inducción y formación de carpófagos de *Lentinula*, que durante la fructificación, bajo condiciones apropiadas de humedad del sustrato (70-80%), temperatura (20-25°C), luz diurna indirecta y aeración, presentaron una colonización homogénea y compacta, lo que coincide con lo descrito por (Arenas y col., 2015; Bermúdez y col., 2010). Haciendo un análisis integral de los resultados, se puede plantear que los subproductos agroindustriales pulpa de café, cáscara (fibra) de coco y cáscara de maní, de naturaleza lignocelulósica, poseen los requerimientos nutricionales necesarios para el desarrollo de la tecnología de cultivo de setas comestibles del género *Pleurotus* sp., en el caso de *Lentinula edodes*, donde solo se lograron resultados promisorios en el sustrato de cáscara de coco, (Tabla 3). pues no se obtuvo fructificación al utilizar la pulpa de café y la cáscara de maní, es válido considerar que las condiciones de crecimiento que se requieren para ambas especies de hongos superiores difieren.

Tabla 3. Resultados de la producción de setas de *Lentinula* sobre los sustratos de siembra pulpa de café, cáscara de coco y cáscara de maní.

Sustratos	P (días)	R (%)	EB (%)	TP (%)	Total Cosechado carpófagos	No. bolsas que produjeron	Sustrato remanente
Pulpa de café	-	-	-	-	-	0	1920g
Cáscara de maní	-	-	-	-	-	0	1315g
Cáscara de coco	59	1,2	12,9	0,1	91,5 g	5	755g

Leyenda. Número de bolsas 5 P precocidad R rendimiento EB eficiencia biológica TP tasa de producción

Así, por ejemplo, *L. edodes* necesita de sustratos específicos y de bajas temperaturas (Valenzuela, J.D. y col., 2017), causas a las cuales pudiera obedecer la respuesta observada.

El uso y aprovechamiento de la cascara de maní constituye un resultado novedoso y que puede ser de gran aplicación práctica en el cultivo de hongos comestibles, en especial de *Pleurotus*, dada la disponibilidad de dicho sustrato. Otro aspecto a considerar al emplear la cáscara de maní, es la baja probabilidad de presencia de microorganismos contaminantes, atribuible al alto contenido de lignina y bajo contenido de nitrógeno, a diferencia de la pulpa de café que se contamina fácilmente dada su composición química, rica en azúcares, lo que facilita la proliferación de microorganismos (Tabla A1 del Anexo).

Los resultados corroboraron que las cepas estudiadas, pertenecientes a diferentes especies fúngicas, *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes* presentaron un comportamiento diferenciado, aún en condiciones muy similares de cultivo, a no ser la modificación de la metodología empleada para lograr la fructificación en *Lentinula edodes*, consistente en la introducción de un choque térmico en refrigeración (0-4°C) por 24 horas, y por primera vez aplicada en el CEBI, lo que facilitó la inducción y formación de carpóforos durante la fructificación bajo condiciones apropiadas.

Lentinula edodes exhibió una colonización completa en el sustrato cáscara (fibra) de coco, aunque con bajos porcentajes de eficiencia biológica. Y de forma general, resultados menos favorables para los sustratos pulpa de café y cáscara de maní, donde no hubo fructificación, al parecer motivado por las características de la cepa evaluada, sus requerimientos nutricionales y de cultivo, que son más específicos. La literatura revisada refiere que para lograr éxitos durante las etapas de colonización y fructificación con *L. edodes*, una mezcla de sustratos es requerida. (Mahdizadeh y col., 2021; Valenzuela y col., 2017; Silva, S. y col., 2010; Escobar y col., 2007)

Es por ello que, la respuesta observada en el presente estudio con la cáscara de coco y la cepa Le 236, cobra mayor interés y sugiere que la alta relación carbono nitrógeno (C:N) favorece el proceso (Tabla A1 del Anexo). De aquí la importancia de realizar posteriores ensayos, a fin de optimizar el proceso y explotar de manera más eficiente las potencialidades de la cepa evaluada, que permite prescindir de la mezcla con sustratos de madera y resulta ventajoso desde el punto de vista económico, además facilita esta práctica de cultivo de setas comestibles.

5. CONCLUSIONES

1. Los residuos agroindustriales lignocelulósicos pulpa de café, cáscara (fibra) de coco y cáscara de maní, poseen los requerimientos nutricionales para el cultivo de setas comestibles del género *Pleurotus* sp., y en menor grado para *Lentinula edodes*, donde se obtienen resultados promisorios con la cáscara de coco.
2. Las cepas CCEBI 3024 y Le 236, pertenecientes a las especies fúngicas *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*, respectivamente, presentaron un comportamiento diferenciado en la extensión en días de su ciclo productivo, las etapas de investigación desarrolladas y el rendimiento de cuerpos fructíferos, teniendo en cuenta condiciones similares de cultivo.
3. La precocidad de 10 días en la cepa CCEBI 3024, se expresó a través del incremento significativo del número de brotes y ramilletes en biorreactores de cáscara de maní y cáscara de coco, aunque la eficiencia biológica, peso de setas y rendimiento fueron ligeramente inferiores a lo observado en el sustrato pulpa de café.

6. RECOMENDACIÓN

1. Evaluar la respuesta de la cepa Le 236 de *Lentinula edodes* durante el cultivo ante otras variantes de mezclas de sustratos y de temperatura, atendiendo a su especificidad.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agbagwa y col.,(2020) Determination of Mineral and Proximate Compositions of *Pleurotus Ostreatus* Grown on three Agrowastes. International Journal of Research in Agriculture, Biology & Environment (ijagri), Vol. 1(2) E-ISSN : 2582-6107
2. Akter, N., Kalam A.A., Alam N. (2014). Mite management of coconut in SAARC member countries [Internet]. (ed.Akter, N.; Kalam, A. A.; Alam, N.), 1ra edición, edit. SAARC Agriculture Centre (SAC) BARC Complex, Farmgate Dhaka, Bangladesh, 2014, 144p. ISBN 978-984-33-9031-8, [cited from 2020 November 9]. Available in: <http://www.sac.org.bd/archive/publication/MiteManagement.pdf>
3. Anike, F.N., Yusuf M. and Isikhuemhen O.S. (2016). Co-substrating of peanut shells with cornstalks enhances biodegradation by *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Bioremediation & Biodegradation* 7: 327.
4. Antunes y col., (2020) Valorization of Mushroom By-Products as a Source of Value-Added Compounds and Potential Applications. *Molecules*, 25, 2672; doi:10.3390/molecules25112672
5. Arenas, O. *et al.* (2015). Producción del hongo Shiitake (*Lentinula edodes* Pegler) en bloques sintéticos utilizando residuos agroforestales. *Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6: 60
6. Baktemur y col., (2020) The Effect of Different Agricultural Wastes on Aroma Composition of Shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) Mushroom. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 8(7): 1540-1547
7. Barshteyn y col., (2016) Utilization of agro-industrial waste by higher mushrooms: modern view and trends. *Journal of microbiology, biotechnology and food science*. International peer-reviewed scientific online journal. doi: 10.15414/jmbfs.5.6.563-577
8. Beltrán, Y.; Morris, H.; Llauradó, G.; Bermúdez, R.C.; Garcia, N. (2020) Procedimientos para la producción de setas del género *pleurotus* con potencial aplicación farmacológica. *Rev. Cubana Quím.* Vol.32, no.2 págs. 245-261, e-ISSN: 2224-5421
9. Bermeo y col., (2020) Effect of culture preservation methods in the stability and nutritional characteristics of *pleurotus ostreatus*. *Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc.* Vol. 22 (2) : 359-368 *Global Science Publications ISSN-0972-3005*

10. Bermúdez R.C, García N, Gross P, Serrano M. (2001). Cultivation of *Pleurotus* on agricultural substrates in Cuba. *Micología Aplicada Internacional* 13(1): 25-29.
11. Bermúdez R.C, y García N. (2010). Cultivo de setas comestibles (*Pleurotus*) en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Cuba. Capítulo 27. En: Daniel Martínez, *Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Puebla, México:, pp. 489-512. ISBN 970-9752-01-4.
12. Bermúdez y col., (2013) Una tecnología sostenible, aporte a la seguridad alimentaria. RTQ vol.33 no.2. versión On-line ISSN 2224-6185
13. Bermúdez, R.C.; García, N.; Kekeli, K.; Serrano, M. (2018). Evaluación de la productividad de dos cepas de *Pleurotus* spp sobre pulpa de café *Coffea canephora* Pierre ex Frhoener. *Tecnología Química.*, **38**(2), 246-255. ISSN: 2224-6185.
14. Bermúdez, R.C.; García, N.; Serrano, M.; Rodríguez, M.I. (2014) Conversión de residuales agroindustriales en productos de valor agregado por fermentación en estado sólido. *Tecnología Química.* XXXIV (3), 217-225. ISSN: 2224-6185.
15. Bernabé-González, T., J.M. Arzeta-Gómez. (1994). Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre cáscara de cacahuate y hoja seca de maíz. *Revista Mexicana de Micología* 10: 15-20.
16. Bernabé-González, T.; Mata, G.; Cayetano-Catarino, M.; Gutiérrez Reyes, G. (2006). Cultivo experimental del hongo shiitake, *Lentinula edodes*, sobre dos subproductos agrícolas en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Micología* 23: 63-68.
17. Besufekad y col., (2019) Selection of appropriate substrate for production of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Journal of Yeast and Fungal Research.* Vol.11(1),pp.15-25,DOI:10.5897/JYFR2019.0187 Article Number: 5CE639762968 ISSN: 2141 -2413
18. Cano A, Romero L, (2016) Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres Rev Chil Nutr Vol. 43, N°1.
19. Costinel y col., (2020) Fungal biotechnology of lignocellulosic waste conversion- a review. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, Vol. XXIV, No. 2, ISSN 2285-1364.

20. Cuba. MINAGRI. (2002). Programa de acciones para implementar los elementos rectores que rigen el desarrollo de las producciones agropecuarias y forestales de las montañas.-- Ciudad de La Habana: MINAG, 2002. -- 26 p.
21. Cueto, J.R.; Alonso, M.; Llauger, R.; González, V.; Romero, W. (2020). Historia del cultivo de cocotero (*Cocos nucifera* L) en Cuba: su origen en la región de Baracoa. [Consultado en October de 2020]. Disponible en internet [http: <www.fao.org/docrep>](http://www.fao.org/docrep).
22. Cunha y col., (2019) Use of peanut waste for oyster mushroom substrate supplementation-oyster mushroom and peanut waste. Brazilian Journal of Microbiology. Environmental microbiology. <https://doi.org/10.1007/s42770-0100130-1>
23. Di Piazza y col., (2021) Fungi and Circular Economy: *Pleurotus ostreatus* Grown on a Substrate with Agricultural Waste of Lavender, and Its Promising Biochemical Profile. *Journal Recycling* ,6,40. <https://doi.org/10.3390/recycling6020040>
24. Di Rienzo *et al.* (2011) FAO, FIDA, UNICEF, PMA y OMS. (2018) El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo. Fomentando la resiliencia climática en aras de la seguridad alimentaria y la nutrición. Roma: Ediciones FAO, ISBN978-92-5-130841-7
25. Elisashvili, V., Penninckx M., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Metreveli E., Kharziani T., Kvesitadze G. (2009). *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresour Technol.* 99: 457-623.
26. Escobar y col., (2007). Evaluación de la producción del hongo *Lentinula edodes* Pegler en bloques sintéticos a base de residuos agroindustriales. *Rev. Ingeniería y Ciencia* 3(6): 23-39.
27. Fasahah y col., (2018) A Review on Peanut Shell Powder Reinforced Polymer Composites. A Review on Peanut Shell Powder Reinforced Polymer Composites, *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, DOI:10.1080/03602559.1471720
28. Gaitán, R; Mata, M; Muñoz, E. (2012). Elaboración de abono bocashi con la paja obtenida del cultivo de *Pleurotus* spp. En: José SÁNCHEZ y Gerardo MATA, Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica. El Colegio de la Frontera Sur. INECOL. pp. 181-190. ISBN 9786077637738.
29. Ganguly y col., (2020) Valorization of food waste: Extraction of cellulose, lignin and their application in energy use and water treatment. *Journal Fuel*. Department of

Chemical Engineering, Jadavpur University, Kolkata, India b0016-2361/ Elsevier Ltd.
All rights reserved.

30. García N, Bermúdez RC, Serrano M. (2011). Formulaciones de sustratos en la producción de setas comestibles *Pleurotus*. *Tecnología Química* 31(3):15-22.
31. García N. (1999). Producción de setas comestibles *Pleurotus ostreatus* sobre subproductos del café y del cacao. Tesis de Master en Biotecnología. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Universidad de Oriente. 90p.
32. García N. (2008). Producción de setas comestibles y enzimas lacasas por fermentación en estado sólido de la pulpa de café con *Pleurotus* spp. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Técnicas. Universidad de Oriente.
33. Gatani M. y col. (2010). Materiales compuestos de cáscaras de maní y cemento. Influencia de diferentes tratamientos químicos sobre las propiedades mecánicas. *Materiales de Construcción* 60(298): 137-147.
34. Gordana Šelo y col., (2021) A Comprehensive Review on Valorization of Agro-Food Industrial Residues by Solid-State Fermentation. *Comprehensive Review on Valorization of Agro-Food Industrial Residues by Solid-State Fermentation*. V10, 927
35. Grande C. (2016). Valoración biotecnológica de residuos agrícolas y agroindustriales. Cali: Editorial Bonaventuriana. ISBN 978-958-8785-81-3. 78p.
36. Grimm y col., (2020) Integration of mushroom production into circular food chains. Springer Nature. Org. Agr. B.V. Thünen-Institut of Agricultural Technology, Braunschweig, Germany
37. Grimm y col.,(2020) Cultivation of *Pleurotus ostreatus* Mushroom on Substrates Made of Cellulose Fibre Rejects: Product Quality and Spent Substrate Fuel Properties. *Waste and Biomass Valorization* (2021) 12:4331–4340
38. Heredia-Solís, A., Esparza-Ibarra EL, Romero-Bautista L, Cabral-Arellano FJ, Echavarría-Chairez FG. and Bañuelos- Valenzuela R. (2016). Evaluación de mezclas para sustrato y producción de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kumm. *Agroproductividad* 9(6): 67-72.
39. Hinestroza-Córdoba, LI.; A., López-Malo. (2008). Aspectos relacionados con la producción de *Lentinula edodes* (Shiitake): una seta con alto potencial alimenticio y medicinal. *Rev. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos* 2: 16-21.

40. Hoseini y col., (2021) Coffee by-products derived resources. A review journal Biomass and Bioenergy, 0961-9534. Published by Elsevier Ltd
41. Hussain y col., (2020) Impact of different lignocellulose substrates on growth and yield of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). Published by Bolan Society for Pure and Applied Biology 9(1): 768-775.
42. Kamalakannan y col., (2020) mushrooms – A hidden treasure. International Standard Book Number (ISBN): 978-81-945631-8-1 pp 36-75
43. Kılıç, (2020) Production of *pleurotus ostreatus*, *pleurotus citrinopileatus* and *pleurotus djamor* in different contents and some physical analysis. Wood Industry and Engineering. ISSN: 2687-6043 e-ISSN: 2687-6035. Volume: 02 Number: 01, Pages: 17 – 23
44. Kumla y col., (2020) Cultivation of Mushrooms and Their Lignocellulolytic Enzyme Production Through the Utilization of Agro-Industrial Waste. *Molecules*, 25, 2811; doi:10.3390/molecules25122811
45. Ling y col., (2020) Green application and toxic risk of used diaper and food waste as growth substitute for sustainable cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). Journal of Cleaner Production. Reference: JCLP 122272 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.122272>
46. Mahdizadeh y col., (2021) Substrate preference of Shiitake *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler strains *J. Crop Prot. Vol. 10 (1): 63-74*
47. Marín y col., (2020) Coffee Pulp: An Industrial By-product with Uses in Agriculture, Nutrition and Biotechnology. *Reviews in Agricultural Scienc 8*
48. Martínez D, A. Larqué, T. Bernabé, Y. Mayett, (2016). Contribución de los hongos comestibles funcionales y medicinales a la construcción de un paradigma sobre la producción, la dieta, la salud y la cultura en el sistema agroalimentario de México. In: Martínez-Carrera D., J. Ramírez Juárez (eds.), *Ciencia, tecnología e innovación en el sistema agroalimentario de México*. Editorial del Colegio de Posgraduados-AMC-CONACYTUPAEP-IMINAP, San Luis Huexotla, Texcoco, México, pp. 581
49. Martínez, D., Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M., Martínez, W. y Mayett, Y. (2012). Los hongos comestibles, funcionales y medicinales: Su contribución al desarrollo de las cadenas agroalimentarias y la seguridad alimentaria en México. En: *Memorias Reunión General de la Academia Mexicana de Ciencias: Ciencia y Humanismo*

- (*Agrociencias*). Academia Mexicana de Ciencias, México D.F, pp. 449-474. ISBN: 970-9752-01-4.
50. Martínez, G. M. A.; Sihuana, D.; Macías, L. A.; Pérez, L.; Martínez, M. D and López O. (2012). Characterization and production of Shiitake (*Lentinula edodes*) in Mexico using supplemented sawdust. *Afr. J. Biotechnol.* 11(46):10582-10588.
 51. Meera y col., (2020) Bioconversion of Lignocellulose materials using different pre-treatment strategies. *Research Journal of Chemistry and Environment* Vol. 24 p12
 52. Menon y col., (2021) Growth and Nutritional Indices of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on Different Substrates. *Current Trends in Biotechnology* Vol. 15 (5) 365-372, ISSN 0973-8916 (Print), 2230-7303SSN DOI: 10.5530/ctbp.2
 53. Mintesnot, B.; Ayalew, A.; Kebede, A. (2014). Evaluation of biomass of some invasive weed species as substrate for oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) cultivation. *Pakistan journal of biological sciences* 17: 213-219.
 54. Mishra y col., (2020) Coconut fibre: its structure, properties and applications. Elsevier Ltd. All rights reserved. ICAR -National Institute of Natural Fibre Engineering and Technology, Kolkata, WestBeng
 55. Mukundraj y col., (2021) Oyster mushroom: cultivation, bioactive significance and commercial status *Frontiers in Life Science (Volume II)* ISBN: 978-81 -953600-8-6
 56. Muswati y col., (2021) The Effects of Different Substrate Combinations on Growth and Yield of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *International Journal of Agronomy*. Volume 2021, Article ID 9962285, 10 pages
 57. Nieto, R. J.; Rocío, R. L. and Suárez, A. C. (2012). Evaluación del estípite de Shiitake como portante de fibra y bioactivos con miras a su empleo en alimentos funcionales. *Vitae*. 19(1):331-333.
 58. Ogaboh y col., (2021) Growth and yield impact of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq P. Kumm) cultivated on different agricultural wastes. *Journal of Bioscience and Agriculture Research*. Published with Open Access at Journal BiNET Vol. 27, Issue 01: 2225-2233
 59. Omen, R.L.R.; Mamián, C.A.M.; Velasco, S.M. (2013). Evaluación de residuos agrícolas como sustrato para la producción de *Pleurotus ostreatus*. *Luna Azul-Universidad de Caldas*. 37: 89-100.

60. Pérez y col., (2020) Edible mushrooms as a novel trend in the development of healthier meat products. Published by Elsevier. Journal Pre-proof. S2214-7993(20)30082-5
61. Pineda y col., (2020) Effect of water activity on the stability of freeze-dried oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) powder. Drying Technology An International Journal ISSN: 0737-3937 (Print) 1532-2300
62. Prince y col., (2020) Proximate Nutrient Potential, Phytochemical Screening and Vitamin B-Composition of *Pleurotus ostreatus* Cultivated by Substrate Organic Supplementation Techniques. Asian Journal of Research in Botany 4(4): 138-146, 2020; Article no. AJRIB.61603
63. Puig, Y.; Crespo, L.; Cardona, Y.; Mosqueda, L.; Serrano, M. (2020) Evaluación de tres residuos agroindustriales como sustratos para cultivo del *pleurotus ostreatus* var. Florida. Revista Científica Multidisciplinaria Arbitrada YACHASUN. Volumen 4, Número 7 ISSN: 2697-3456
64. Raman y col., (2020) Cultivation and Nutritional Value of Prominent *Pleurotus* Spp.: An Overview. Journal Mycobiology. Project No. PJ01419640), NIHHS, Rural Development Administration. DOI: 10.1080/12298093.2020.1835142
65. Ramos I.R (2015) Centro Tecnológico de Investigación del Champiñón de la rioja (CETICH) ed. Propiedades Nutricionales y saludables de los hongos, p 12-23.
66. Rangel y col., (2021) Edible Mushrooms as a Natural Source of Food Ingredient/Additive Replacer. Review. Food Ingredient/Additive Replacer. *Foods*, V 10, 2687
67. Ravera, C., Bettera C., Fernández M.A., Estive E. y Piñeda H. (2008). Aprovechamiento de los residuos agrícolas. Procesamiento de la caja del maní, su conversión biológica y productos. I Simposio Iberoamericano de Ingeniería de Residuos. Castellón, 23-24 de julio de 2008. Disponible en <http://www.redisa.net/doc/artSim2008/tratamiento/A22.pdf> (accedido el 23-6-2020).
68. Romero-Arenas, Omar; Martínez Guerrero, Marco A.; Damián Huato, Miguel A.; Ramírez Valverde, Benito; López-Olguín, J. Francisco (2015). Producción del hongo Shiitake (*Lentinula edodes* Pegler) en bloques sintéticos utilizando residuos agroforestales. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, vol. 6, núm. 6
69. Royse, D.J. Sánchez J.E. (2017). Producción mundial de setas *Pleurotus* spp. con énfasis en países iberoamericanos. En: La biología, el cultivo y las propiedades

- nutricionales y medicinales de las setas *Pleurotus* spp. (Sánchez J.E and Royse D.J, eds). Editorial El Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México, pp. 17-25.
70. Sánchez, J. y G. Mata (2012). Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: investigación y desarrollo en un entorno multicultural. Colegio de la Frontera Sur. 393 p.
71. Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. *Biología* 16(2): 1-46.
72. Shradhdha y col., (2020) Production of Lignolytic and Cellulolytic Enzymes by using Basidiomycetes Fungi in the Solid State Fermentation of Different Agro-Residues. *Research Journal of Biotechnology* Vol. 15 (9) Res. J. Biotech
73. Shuai y col., (2020) Effects of mixed agro-residues (corn crop waste) on lignin-degrading enzyme activities, growth, and quality of *Lentinula edodes*. This journal is © The Royal Society of Chemistry. *RSC Adv.*, 10, 9798–9807
74. Shukla, (2020) Research Trends in Food Technology and Nutrition Kumar, Vinny, Singh, (2020) Cultivation Techniques of Oyster Mushroom (*Pleurotus* sp.) Volume – 14 Chapter – 6 pp 96-99
75. Silva, S. *et al.* (2010). Manual para la producción de hongos comestibles Shiitake. Proyecto Conama RM-027 “Utilización de desechos de podas del arbolado urbano como sustrato para la producción de hongos comestibles (Shiitake) en la comuna de La Pintana, Chile.p.6-42
76. Singh Y CL., (2021) Nutritional and health importance of fresh and dehydrated oyster Mushroom (*Pleurotus Florida*) *Journal of Current Research in Food Science* 2(2):10-14 E-ISSN:2709-9385P-ISSN:2709-9377 JCRFS 2(2):10-14
77. Singh, (2019) Biodegradation of Lignocellulosic Wastes by Cultivation of Mushrooms as Nutrient Source. *International Journal of Science and Research (IJSR)*. ISSN: 2319-7064. V 7.p 583
78. Sow y col., (2020) Bioconversion of Agricultural Wastes for Mushroom Production. Bihar Agricultural University, Sabour, Bhagalpur. *Agriblossom*, e-magazine for Agriculture & allied Sciences .Volume-1 Issue-9 ISSN-2582-8258
79. Sudharmaidevi, C.R.; Vinith, V.; Kavitha, G.V. (2015). Effect of potassium-sodium interaction on foliar nutrient concentration and nut quality of coconut (*Cocos nucifera*). *Malaysian Journal of Soil Science* 19: 107-114.

80. Thakur (2020) Advances in mushroom production: key to food, nutritional and employment security. Review article. Indian Phytopathological Society
81. Valenzuela, J.D. y col., (2017). Production of hybrid strains among *Pleurotus* and *Lentinula* and evaluation of their mycelial growth kinetics on malt extract agar and wheat grain using the Gompertz and Hill models. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 29(12): 927-935.
82. Vellaichamy y col., (2020) Fermentation Technology: A Viable Tool for Bio-conversion of Lignocellulosic Biomass into Value-Added Products. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* ISSN: 2319-7706 Volume 9 Number 7
83. Vetchinkina, E., Nikitina, V., Tsvileva, O., Garibova, L. (2008). Activity of *Lentinus edodes* intracellular lectins at various developmental stages of the fungus. *Applied Biochemistry & Microbiology* 44(1): 66-72.
84. Wabali Y col., (2021) Performance of Different Substrates on Growth Parameters of (*Pleurotus ostreatus*) Mushroom. *European Journal of Agriculture and Food Sciences* www.ejfood.org ISSN: 2684-1827 DOI: 10.24018/ejfood.2021.3.2.265
85. Wasser, S. (2010). Shiitake (*Lentinus edodes*). En: Paul COATES, *Encyclopedia of Dietary Supplements*. 2da. Edición. CRC Press, pp. 653-664. ISBN 9781439819289.
86. Winston Franz Ríos-Ruiz; Renzo Alfredo Valdez-Nuñez; Juan Pablo Jiménez-Flores. (2017). Aislamiento, propagación y crecimiento de hongos comestibles nativos en residuos agroindustriales. *Scientia Agropecuaria* 8(4): 327 – 335.
87. Yao y col., (2021) Assessment of coffee waste in formulation of substrate for oyster mushrooms *Pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus floridanus*. *Journal Future Food* 4 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license 2666-8335
88. Zhang, J.X.; Chen, Q.; Huang, C.Y.; Gao, W.; Qu, J.B. (2015). History, current situation and trend of edible mushroom industry development. *Mycosystema* 34: 524–540.

Tabla A1. Caracterización química de los sustratos pulpa de café, cáscara de coco y cáscara de maní.

Parámetro (% peso seco)	Pulpa de café	Cáscara de coco	Cáscara de maní
pH	8.17	6.69	6.81
Humedad (%)	9	9	8-10
Materia seca (%)	90.3	91	90
Cenizas (%)	9.3	3.5	2-4
Nitrógeno (%)	1,6-2,9	0,5	1.3
Proteína bruta (%)	9.37	3	6-11
Fibra (%)	13-23	no determinado	60-67
Grasa (%)	2-8	1	1-2
Carbono (%)	50-54	56	46.1
C:N	18-31	112	35
Fenoles totales (%)	1,34	0,022	no determinado
Taninos (%)	0,38	n.d.	no determinado
Lignina (%)	12,2-17,5	42.5	27-33
Celulosa (%)	17,7-18,0	32.3	35-45
Hemicelulosa (%)	0,98-2,00	no determinado	23-30

Fuentes: Ganguly y col., 2020; Fasihah y col., 2018