

*FACULTAD DE CIENCIAS
NATURALES Y EXACTAS*

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

**Título: Evaluación de la productividad de dos cepas
de *Pleurotus* spp. sobre pulpa de café *Coffea
canephora* Pierre ex Frhoener**

Autor: Lic. Kodjovi Kekeli Agbozouhoue

Tutores: Dra. C. Rosa Catalina Bermúdez Savón
Dra. C. Nora García Oduardo

Julio 2017

DEDICATORIA

- ✓ *A mis muy queridos padres, Mr. Agbozouhoue A. Anato, Mme. Agbozouhoue K.A. Antoinette, por su amor y apoyo incondicional, por todo el esfuerzo que han hecho y que todavía hacen para asegurar mi futuro; por haberme dado todas las condiciones que necesitaba para lograr esa meta, por haber confiado en mí y haberme motivado todo el tiempo.*
- ✓ *A mi hermano, Agbozouhoue Y.B .Blaise, por su presencia todo el tiempo y por la atención especial que siempre me ha dado; por nunca haberme fallado.*
- ✓ *A mi hermana, Agbozouhoue A. A .Nina y mis adorables sobrinas, Rosario y Hosanna y a su padre Ayetan Charles; por sus oraciones.*
- ✓ *A todos los miembros de mi familia que de una manera u otra han hecho posible este momento; en especial a mi primo Sanvee A. Fabrice, a mi tío Louis, Tía chérie, todas mis queridas primas.*
- ✓ *A mi dulce y muy amable pareja, novia,... Milena Soto Guerra, por su amor incondicional, su imprescindible presencia, cariño y apoyo incondicional, a su Papa, a su Mama Yaila Guerra Guerra, a su abuela y a su tío.*
- ✓ *A todas mis amistades, especialmente Patrick Kwame Gogo, Benon Tarzan, Hamza Gueré, Bangaly Diaby, Elianis (Nani).*

AGRADECIMIENTOS

- ✓ *A Dios todo poderoso por darme vida, salud, determinación, constancia, fortaleza, paciencia; por su amor incondicional y protegerme siempre.*
- ✓ *A mis queridos Padres por su apoyo económico, moral y espiritual.*
- ✓ *A mis tutoras: DrC Rosa Catalina Bermúdez Savón y DrC Nora García Oduardo por haberme guiado en la terminación exitosa de nuestra investigación y en mi formación, haciendo especial énfasis en la destacada labor de MSc. Migdalia Serrano Alberni por su apoyo y ayuda todo lo largo del experimento, al claustro del CEBI.*
- ✓ *A mis compañeros de aula, Osmar, Cristóbal, Gorki, Lizet, Ianna, Eslis, Tani, Alis, y todos los demás.*
- ✓ *A cada una de esas personas cuyos nombres aquí no están porque los grave mejor en mi corazón.*

Índice	páginas
Introducción	1
CAPÍTULO1.Revisión bibliográfica	4
1. Fermentación en estado sólido	4
1.1. Biorreactores de FES	9
1.1.1 Bolsas de polietileno	10
1.1.2 Biorreactores de bandejas	11
1.2 <i>Pleurotus</i> spp	12
1.3 Cultivo de <i>Pleurotus</i> spp. sobre pulpa de café	15
CAPÍTULO 2. Materiales Y Métodos	17
2.1 Localización	17
2.2 Equipos y materiales	17
2.3 Cepas	18
2.4. Sustrato	19
2.5 Diseño experimental	19
2.6 Metodología de cultivo	20
2.7 Parámetros determinados	22
2.8 Características de las setas comestibles	23
CAPÍTULO 3. Resultados y discusión	24
3.1 Cultivo en bolsas	25
3.2 Cultivo en bandejas	27
3.3 Valoración económica y ambiental	29
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXOS	

RESUMEN

La aplicación y generalización de la biotecnología de setas comestibles-medicinales en Cuba están muy relacionadas con el desarrollo sostenible. El empleo de subproductos agrícolas e industriales para obtener beneficios, utilizando la vía biotecnológica, es una de las ramas que actualmente se explota en el mundo y ha visto crecer su práctica. Las despulpadoras que benefician el café por vía húmeda, generan grandes cantidades de pulpa de café que se vierten al ambiente, constituyendo una contaminación para éste. La pulpa de café tiene una cantidad apreciable de materiales fermentables, que se pueden aprovechar por la fermentación en estado sólido, cultivando setas comestibles del género *Pleurotus*, el cual ha sido objeto de numerosos estudios por constituir un alimento su cuerpo fructífero y ser productor de enzimas de interés industrial. El objetivo de este trabajo fue evaluar la productividad de dos cepas de *Pleurotus*, utilizando dos tipos de biorreactores: en bolsas y en bandeja. El estudio se desarrolló en la planta de investigación-producción del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, empleando como sustrato la pulpa de café *Coffea canephora* Pierre ex *Frhoener*. El sustrato fue inoculado con dos cepas CCEBI 3024 y CCEBI 3023, con 7 réplicas para cada biorreactor, en una proporción de 10 % del peso húmedo de sustrato. Como parámetros de productividad se midieron Eficiencias Biológicas (EB), Rendimiento (R), la Precocidad (P) y el diámetro y textura de los cuerpos fructíferos. Los resultados obtenidos en las dos cepas CCEBI 3024 y CCEBI 3023 en las bolsas mostraron que las Eficiencias Biológicas fueron 63,3% y 64,1%, respectivamente y el Rendimiento 17,0% y 17,2%, respectivamente, fueron similares para las dos cepas, solo presentaron diferencias significativas en la Precocidad. El número de setas producidas por la cepa de referencia, la CEBI 3024 y la CCEBI 3023 en bolsas fueron 209 y 214 respectivamente. Con respecto al cultivo en bandejas, las Eficiencias Biológicas fueron 37,0% y 30,6%, respectivamente y el Rendimiento fue 10,0% y 8,2% presentaron diferencias significativas, y también diferencias significativas en la Precocidad. El número de setas producidas por la cepa de referencia, la CEBI 3024 y la CCEBI 3023 en bandejas fueron 186 y 165 respectivamente. Dada la productividad mostrada se puede concluir, que es más conveniente, el cultivo en bolsas para ambas cepas.

Palabras claves: Rendimiento, eficiencia biológica, precocidad, biorreactor

ABSTRACT

The application and generalization of the biotechnology of edible-medicinal mushrooms, in the conditions of the east specifically and of the country in general are very related to the sustainable development. They are also related to economic and social development; to the care and conservation of the environment. The use of agricultural and industrial waste products to obtain benefits, using the biotechnological route, is one of the branches that is currently exploited in the world and has seen its practice grow. The coffee process industries, that benefit the wet coffee, generate large amounts of coffee pulp that are discharged into the environment, constituting a contamination for this. The coffee pulp has an appreciable amount of fermentable materials, which can be exploited by solid-state fermentation by cultivating edible mushrooms of the *Pleurotus* genus, which has been the object of numerous studies because its fruiting body constitute a food and also because is a producer of enzymes of Industrial interest. The objective of this work was to evaluate the productivity of two strains of *Pleurotus* using two types of bioreactors: in bags and in tray. The study is carried out in the research-production plant of the Industrial Biotechnology Center Study, using coffee pulp *Coffea canephora* Pierre ex Frhoener as substrate. The substrate was inoculated with two strains CCEBI 3024 and CCEBI 3023, with 7 replications for each bioreactor, at a ratio of 10% of the wet substrate weight. As productivity parameters, Biological Efficiencies (EB), Yield (R) and Precocity (P) were measured. The results obtained in both strains CCEBI 3024 and CCEBI 3023 using the bags showed that Biological Efficiencies (63, 3% -64, 1 %,) and Yield (17, 0% -17.2%) were similar for both strains, only showed significant differences in Precocity. The number of mushrooms produced by tne CCEBI 3024, reference mushroom and the CCEBI 3023 strains in bags were 209 and 214 respectively. With respect to tray culture, Biological Efficiencies (37,0% -30,6,0%) and Yield (10,0% -8,2%) presented a significant difference , and also with a significant difference in Precocity. The number of mushrooms produced by tne CCEBI 3024, reference mushroom and the CCEBI 3023 strains in bags were 186 and 165 respectively According to the productivity shown, the culture in bags for both strains can be concluded more convenient.

Key words: yield, biological efficiency, precocity, bioreactor

Introducción

El cultivo de los hongos comestibles-medicinales es una práctica que se ha desarrollado desde hace más de 200 años en Europa, con el cultivo del champiñón *Agaricus bisporus* y en Asia con el cultivo de especies como *Lentinula edodes*, *Auricularia spp.* Esta tecnología llegó al nuevo mundo hacia finales del siglo 19 y la primera mitad del siglo 20 de una manera muy discreta. No fue sino hacia la segunda mitad de este siglo, gracias al mejoramiento de las técnicas existentes, que esta industria se hizo presente de una manera importante en varios países de América.

El cultivo de *Pleurotus spp.* pertenece al siglo XX. A pesar de ser relativamente reciente, ha tenido un desarrollo muy rápido, de tal manera que en la actualidad se cultiva en casi todas las latitudes del mundo. Su caso merece una atención especial: más que cualquier otro de los géneros cultivados hasta ahora, debido a la diversidad de sustratos sobre los que es capaz de crecer, permite apreciar de manera directa el impacto benéfico de cultivar hongos para el aprovechamiento de desechos agropecuarios. (Sánchez y Royse, 2001)

La fermentación en estado sólido brinda la posibilidad de producir, por vía biotecnológica y de forma combinada, setas comestibles *Pleurotus spp.* y forraje beneficiado; siendo la única tecnología que permite obtener mediante la bioconversión de subproductos agrícolas, alimento humano y alimento animal (Chang, 2007).

En el proceso de fermentación sólida el micelio de *Pleurotus* puede producir una cantidad significativa de enzimas, que permiten degradar los residuos lignocelulósicos y usarlos como nutrientes para el crecimiento y la fructificación (Elisashvili, 2008). Sin embargo, la naturaleza y la composición de los nutrientes del sustrato afectan el crecimiento del micelio, la calidad del hongo y el rendimiento de este valor añadido del proceso de biotransformación.

El *Pleurotus ostreatus* es un hongo comestible, reconocido por su alto valor nutritivo. En los últimos años, debido al cambio en los hábitos alimenticios, se ha registrado un aumento creciente en su consumo per cápita, asociado a su bajo aporte calórico, una baja relación de ácidos grasos saturados a insaturados, 2.0-4.5:1, una relación fibra dietaría total a fibra cruda mayor que la de los vegetales, una buena digestibilidad

($67.75 \pm 0.54\%$), al contenido en compuestos funcionales (betaglucanos y glucosamina), aminoácidos esenciales, minerales, vitaminas y provitaminas (Chang, 2004; Llauradó, 2017; Nieto, 2010).

Además se le atribuyen propiedades medicinales (anticolesterolémica y antitumorales) y antioxidantes. El consumo per cápita mundial de setas y hongos en el 2001 se estimó en 0.44 kg por persona al año, con un crecimiento promedio anual de 3.8%. Este consumo tan alto está fundamentalmente condicionado a los países asiáticos, aunque en los últimos años, ha tendido a generalizarse a países occidentales, presentando un interesante potencial de mercado (Morris et al, 2012)

La producción de café es un ejemplo destacado de agroindustria de Cuba que genera grandes volúmenes de pulpa de café, un subproducto lignocelulósico derivado del objetivo central de la actividad cafetalera. Este material, tiene poca salida de aprovechamiento y su acumulación puede llegar a crear problemas con carácter contaminante. La pulpa de café fresca tiene una cantidad apreciable de materiales fermentables, que se pueden aprovechar por la fermentación en estado sólido, cultivando setas comestibles que degradan esta pulpa previamente tratada para su fructificación.

Existen dos variedades principales de café: *Coffea arábica* L, originaria de las altiplanicies de Abisinia y cultivada en tierras altas, sobre todo en América Central y del Sur, con granos muy aromáticos y mucha cafeína; y *C. canephora* Pierre ex Frhoener, cultivada sobre todo en tierras bajas africanas, con granos menos aromáticos y con poca cafeína (Verdecia, 1999). Ambas variedades son cultivadas en Cuba y aunque presentan composición semejante, generan diferentes rendimientos en el cultivo de *Pleurotus* spp. (Bermúdez y García, 2010; Verdecia, 1999; Gross, 2001).

A pesar de las investigaciones realizadas por varios autores sobre la producción de setas comestibles sobre pulpa de café (Martínez-Carrera et al, 2000; Fan et al, 2000, Rodríguez, 2005) todavía resulta de interés conocer las particularidades que presenta la pulpa de café de la variedad *Coffea canephora* Pierre ex Frhoener en este proceso, pues para la valoración económica de las plantas de producción es muy necesario.

Problema

Profundizar en las características de las setas comestibles *Pleurotus* spp, cultivadas sobre pulpa de café de la variedad *Coffea canephora* Pierre ex Frhoener.

Hipótesis

La producción y los parámetros morfológicos de los cuerpos fructíferos en el cultivo del *Pleurotus* spp. varían no solo en dependencia de la especie, sino también en dependencia del biorreactor empleado.

Objetivo

Producir setas comestibles-medicinales de dos especies de *Pleurotus* en biorreactores de bandeja y de bolsa sobre pulpa de café *Coffea canephora* Pierre ex Frhoener

Objetivos específicos

- Realizar la producción de setas comestibles *Pleurotus* sobre pulpa de café *Coffea canephora* Pierre ex Frhoener, utilizando las cepas CCEBI 3023 y CCEBI 3024 en bolsas
- Realizar la producción de setas comestibles *Pleurotus* sobre pulpa de café *Coffea canephora* Pierre ex Frhoener, utilizando las cepas CCEBI 3023 y CCEBI 3024 en bandejas
- Evaluar el diámetro, el color y el número de los cuerpos fructíferos de las setas.

Capítulo 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Fermentación en estado sólido.

La fermentación en medio sólido o también fermentación en estado sólido, se define como el crecimiento de microorganismos en medios sólidos, o semi-sólidos, en ausencia de agua libre. Esta técnica ha sido aplicada desde la antigüedad en la preparación de alimentos fermentados.

La fermentación en estado sólido (FES) involucra el crecimiento de microorganismo en partículas sólidas húmedas donde los espacios entre las partículas contienen una fase gaseosa continua y un mínimo de agua visible. Aunque pueda haber gotas de agua entre las partículas y películas delgadas de agua en la superficie de la partícula, la fase de agua inter- partículas es discontinua y el mayor espacio es lleno de la fase gaseosa. La mayor parte del agua en el sistema es absorbida dentro de la partícula húmeda. (Mitchell. A et al, 2006)

El sistema de FES comprende tres fases:

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

Esta última fase es muy importante, porque a su vez representa tres partes en FES: Para regular temperatura del sustrato, regular el nivel de humedad del medio, durante el curso de la fermentación y para mantener condiciones aeróbicas.

Varios grupos de microorganismos pueden crecer sobre sustratos sólidos. Los hongos filamentosos sin embargo, muestran la mayor capacidad de crecer en la carencia de agua libre.

Dentro de este grupo, tres clases:

1. *Phycomycetes (Mucor y Rhizopus)*.

2. *Ascomycetes* (*Aspergillus* y *Penicillium*).

3. *Basidiomycetes* (Hongos de pudrición blanca, Polypores).

Han sido los más comúnmente utilizados.

Los tipos de microorganismos que pueden crecer en sistemas de FES son determinados por el factor actividad del agua (a_w). Este factor es, la humedad relativa de la atmósfera gaseosa en equilibrio con el sustrato. La actividad del agua del sustrato expresa cuantitativamente el requerimiento de agua para la actividad microbial. La regulación de la a_w del sustrato sólido puede ser controlada por la humedad relativa (HR) del aire. En los procesos de fermentación sólida pueden ser utilizados sustratos naturales y sintéticos. Los materiales orgánicos más aconsejables son los de estructura polimérica (ejemplo: polisacáridos, lignina, proteínas, etc.); en general, todos pueden ser utilizados por los microorganismos como fuente de carbono.

Los sustratos utilizados son insolubles en agua, en la práctica el agua es absorbida dentro de las partículas del sustrato pudiendo ser utilizadas por los microorganismos para el crecimiento de la actividad metabólica; las bacterias y las levaduras crecen sobre la superficie del sustrato, mientras que el micelio fúngico penetra dentro de las partículas del sustrato. La utilización del sustrato sólido por el microorganismo se afecta por varios factores físicos y químicos.

Dentro de los factores físicos encontramos; accesibilidad del sustrato para los microbios, efecto fílmico o de película y 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. Dentro 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 (Ferrer G y col, 2014).

Teniendo en cuenta las posibilidades de la FES, la necesidad de obtener una serie de productos útiles al hombre y a los animales y 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* y *Agaricus* (Sánchez y Royse, 2001).

Desde el punto de vista de la ingeniería, las características de las FES permiten el desarrollo de procesos biotecnológicos en condiciones no estériles, por lo que estos son escalables y de bajo consumo de agua y energía, cuestiones que hacen a las FES más atractivas (Pérez-Guerra y col., 2003, Rodríguez-Couto y Sanromán, 2006).

De manera general, la fermentación en estado sólido consiste en el crecimiento de microorganismos sobre partículas sólidas en ausencia de agua libre en el sistema. El agua se encuentra ligada de una forma compleja a la matriz porosa sólida, ya sea absorbida en la superficie de las partículas o atrapada dentro de la región capilar del sólido (Pandey, 2003).

Otros prefieren considerar la fermentación en estado sólido como un proceso en el cual se desarrollan microorganismos en materiales sólidos húmedos (Julián y Ramos, 2007). La matriz porosa puede estar constituida por un sustrato húmedo que participa aportando nutrientes o por un soporte inerte capaz de absorber los nutrimentos que se encuentran en solución. La humedad del sólido oscila entre 12 y 80% y depende del nivel máximo de retención de agua en el material utilizado como sustrato o soporte (Pérez-Guerra y col., 2003).

Un modelo que explica algunos de los procesos que ocurren a micro escala en la fermentación sólida (Hölker y Lenz, 2005; Rahardjo y col., 2006) se presenta en la figura 1: después de la inoculación del microorganismo, las hifas de este desarrollan una capa de micelio que se extiende sobre la superficie del sustrato. Del micelio sobresalen dos tipos de hifas: unas aéreas, que penetran en el espacio gaseoso y otras que penetran al sustrato mediante el crecimiento a través de los poros llenos de líquido. Los espacios vacíos entre las hifas aéreas están llenos de gas (g), mientras que, los espacios vacíos en el interior del micelio y del sustrato están llenos de líquido (l). La

actividad metabólica ocurre, principalmente, lo más próxima a la superficie del sustrato y dentro de los poros, sin embargo las hifas aéreas también muestran actividad metabólica, ellas sirven de transporte de sustancias desde la parte interior del sustrato hacia el exterior. Las enzimas hidrofóbicas son producidas por el micelio, se difunden dentro de la matriz sólida y catalizan la degradación de las macromoléculas en unidades más pequeñas. (Figura. 1)

Por otra parte, la fermentación en sustrato sólido es una alternativa más adecuada para la producción de enzimas dadas las características fisiológicas y morfológicas de los hongos filamentosos; Es por ello que el uso integral y racional de los desechos agroindustriales como sustratos en la producción de enzimas de interés industrial se convierte en una alternativa extremadamente atractiva debido a la presencia en estos compuestos de grandes cantidades de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina, los cuales sirven como inductores para la síntesis de enzimas hidrolíticas.

Los microorganismos más efectivos son los del género Basidiomicetos, particularmente los de pudrición blanca que atacan los componentes de la pared celular. La lignina es un biopolímero aromático, estructuralmente amorfo, encontrado abundantemente en la pared de algunas células vegetales y extremadamente resistente al ataque microbiano. Los mayores conocimientos de enzimología de la biodegradación de lignina se han generado a partir de los estudios del hongo de pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium*. La actividad lignolítica de *P. chrysosporium* se ha correlacionado estrechamente con la secreción de dos peroxidasas específicas; lignina peroxidasa (LiP) y Manganese peroxidasa (MnP). LiP, también denominada ligninasa se ha considerado como la enzima clave en el proceso lignolítico, principalmente por su alto potencial redox, que la hace capaz de oxidar las unidades no-fenólicas que representan más del 80% del polímero de lignina. (García Torres, 2003)

La fermentación en estado sólido brinda la posibilidad de producir, por vía biotecnológica y de forma combinada, setas comestibles *Pleurotus* spp. y forraje beneficiado pleurotina; siendo la única tecnología que permite obtener mediante bioconversión de los residuos agrícolas, alimento humano y alimento animal. (Chang, 2007 ; Ferrer y col, 2014)

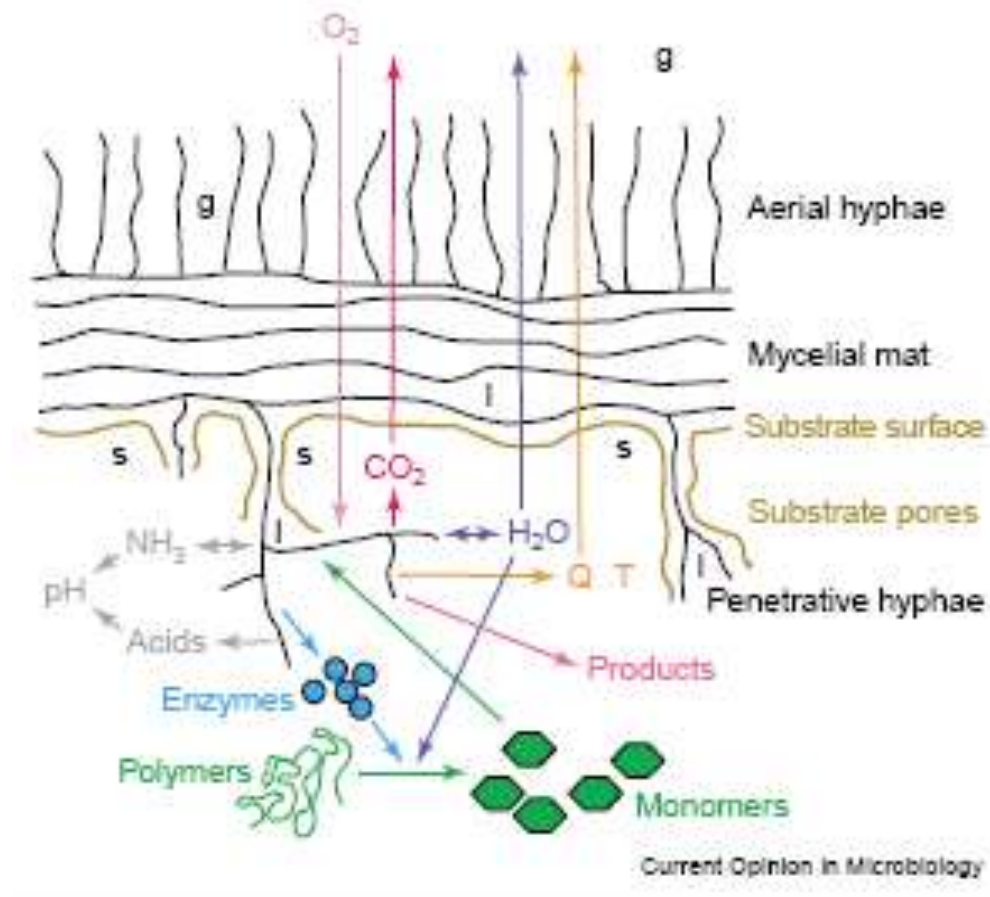


Figura 1. Proceso de la Fermentación en Estado Sólido.

Los investigadores presentan las principales ventajas de la fermentación sólida con respecto a la fermentación sumergida. (Rodríguez, 2006; Ruiz Leza, 2007)

Menor requerimiento de energía, obtención de productos concentrados y los procesos de recobrado son más simples, menos producción de efluentes, condiciones no estériles, bajo consumo de agua, es decir baja actividad del agua, lo cual evita las contaminaciones por bacteria y levaduras. La concentración natural de los sustratos utilizados, permite utilizar reactores más pequeños en comparación con los utilizados en otro tipo de fermentación. La aireación forzada es a menudo más fácil porque los espacios entre las partículas permiten la transferencia de aire fresco a la película de agua en la superficie del sustrato. Pueden emplearse frecuentemente esporas como inóculo. Estas son mucho más resistentes y tienen mejor adaptabilidad a estas condiciones de fermentación. Los medios de cultivo son simples, generalmente son subproductos agrícolas.

Todas estas ventajas son importantes y deben tenerse en cuenta no sólo por el aspecto económico, sino también por el aspecto ambiental, ya que la fermentación en medio sólido de modo general, tiene menor impacto sobre el medio ambiente.

Las desventajas de este tipo de fermentación son:

Difícil control del proceso, debido a que la naturaleza sólida del sustrato trae problemas al medir los parámetros de la fermentación, pocos conocimientos técnicos, fisiológicos y bioquímicos. Muchos aspectos ingenieriles están muy poco caracterizados. La remoción del calor metabólico puede ser un problema, sobre todo cuando se trabaja a gran escala y no se controla el proceso. Problemas de transferencia de masa.

El entorno que el organismo experimenta en la FES es diferente de lo que experimenta en fase sumergida o líquida. La fase sumergida es relativamente fácil controlar las condiciones a las cuales el organismo está expuesto. El entorno de la FES puede ser estresante para el organismo.

Las hifas fúngicas están expuestas a una fase aérea que puede desecarlas, las temperaturas pueden elevarse a volares que están por encima de la óptima para el crecimiento debido a la inadecuada extracción del calor de los desechos metabólicos.

La temperatura a la cual está expuesto el organismo puede variar durante el ciclo. El oxígeno está libremente disponible en la superficie de la partícula, sin embargo pueden haber restricciones severas del suministro de oxígeno a una insignificante proporción de la biomasa que está dentro de una biopelícula en la superficie o penetrando en una partícula. La disponibilidad de los nutrientes al organismo puede ser pobre, incluso cuando el promedio de la concentración de nutriente dentro de la partícula determinada después de la homogeneización de una muestra de partículas sólidas en fermentación, es alta. El movimiento de las partículas del sustrato sólido puede causar impacto y destrucción de la esquila, en caso de proceso fúngico la hifa puede sufrir daños severos. Puede ser difícil de proporcionar el control de pH.

1.1 Biorreactores de FES

Entre los biorreactores o fermentadores utilizados en el laboratorio para las FES se encuentran los simples como: las placas Petri y los erlemmeyers y los complejos como: las columnas Raimbault, las columnas de vidrio o plásticas y el biorreactor de tambor. Para el nivel piloto e industrial se emplean el tambor rotatorio, el fermentador de bandeja, el de cama empacada, el gas-sólido de cama fluidizada, entre otros (Mitchell, 2006). Ellos pueden operar en discontinuo, discontinuo alimentado o en continuo, siendo el modo discontinuo el más común (Pérez-Guerra, 2003 y Durand, 2003; Rodríguez-Couto y Sanromán, 2006).

En las últimas décadas ha evolucionado el diseño, la operación y el escalado de estos biorreactores, la clave de este avance se debe a la aplicación de las técnicas de modelación matemática para describir los fenómenos bioquímicos y fisicoquímicos de la FES.

El principal aspecto a tener en cuenta en la selección y diseño de un biorreactor es “la cama de sustrato sólido”, por ser el lugar donde transcurre el proceso biológico, se genera el calor metabólico y ocurren la transferencia de masa y energía (Pandey, 2003; Dustet e Izquierdo, 2004). Para desarrollar un nuevo proceso en FES la mejor vía es probar a nivel de laboratorio los diferentes biorreactores, antes de decidir cuál es el adecuado para el microorganismo a escala industrial (Mitchell y col., 1999).

1.1.1 Bolsas de polietileno.

Este tipo de biorreactor es muy utilizado en la producción de setas comestibles de diferentes géneros (Kwon y Kim, 2005). El material utilizado en la actualidad para la producción de setas comestibles del género *Pleurotus* spp. y *Lentinus* spp. es el plástico, principalmente el polietileno. La industria ha desarrollado varios tipos de bolsa, inclusive las hay esterilizables en autoclaves. Las dimensiones de las bolsas pueden ser de 40x60 cm o de 60x90 cm y soportan hasta 15kg de sustrato (Sánchez y Royse, 2001). Se recomienda que al usar las bolsas se le hagan perforaciones para que se establezca un intercambio entre el sustrato y el aire. Entre las ventajas de usar bolsas de polietileno para la producción de setas tenemos: -menor riesgo de fracaso de la cosecha, comparado con otros métodos, -es posible usarlas 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 una producción continua todo el año (Mandeel y col, 2005).

También, empleando plásticos especiales que permiten el intercambio de O₂ y CO₂, pero no permiten el intercambio de agua, permitiendo al microorganismo respirar, pero previniendo a la cama secarse. La gran ventaja de ese sistema sobre la tradicional tecnología de bandejas abiertas, es que el plástico impide el paso de contaminante a la cama

Debido a los hábitos de crecimiento que presentan los basidiomicetos como *Pleurotus* spp. las bolsas que se utilizan presentan una mayor superficie vertical que horizontal y es de hacer notar que dentro de ciertos límites (4-20 kg), mientras mayor sea la cantidad de sustrato que se maneje por lote, los problemas de pérdida de humedad serán menores y se incrementen los problemas de heterogeneidad en la humedad del centro de la cama empacada y de disipación del calor producido dentro del sustrato (Sánchez y Royse, 2001).

En dependencia de la cantidad de sustrato empacado en la bolsa de polietileno será la escala de fermentación que se emplee, puede ser usada en el laboratorio para investigaciones o en la producción como se menciona anteriormente. Se conoce el uso de este biorreactor para la producción de setas comestibles por la sencillez de su diseño y operación, además resulta fácil realizar los cálculos de balance de masa y rendimiento (Kwon y Kim, 2005).

1.1.2 Biorreactores de bandejas

El grupo de los biorreactores de bandejas representa la tecnología más simple de la FES. Estos han sido utilizados por muchos siglos en la producción tradicional de alimentos fermentados como el Tempe y en la producción de salsa de soya *koji*. Las bandejas pueden ser apropiadas para un nuevo proceso si el producto no es producido en grandes cantidades, si un “producto –paquete” de un producto fermentado puede ser vendido directamente, o si la labor es relativamente barata.

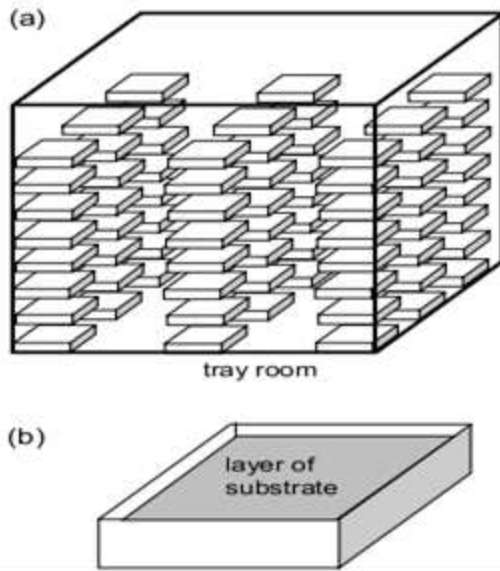
El diseño básico de los biorreactores de bandejas puede presentar las siguientes características:

La cámara de las bandejas puede ser relativamente pequeña, como una incubadora, o puede ser un cuarto tan grande que puedan entrar personas. La bandeja puede ser construida por varios materiales, como madera, bambú, plástico, de hecho, una bolsa plástica puede ser usada en lugar de una bandeja rígida. El fondo y los lados de la bandeja pueden ser perforados o no, pueden ser incorporadas las superficies de intercambio de calor con enfriamiento de agua.

Los parámetros disponibles para biorreactores de bandejas son: Las dimensiones de las bandejas, largo, ancho y altura, el posicionamiento de las bandejas en el biorreactor, la presencia de superficies de enfriamiento en la cámara de bandejas.

Las variables de operación disponibles son: La temperatura, la humedad relativa y el flujo de aire entrando en la cámara de bandejas y la velocidad de circulación en la superficie de la bandeja, si hay superficie de enfriamiento, la temperatura del agua circulante. (Figura2)(Mitchell. A et al 2006)

Debido a la falta de criterios para el escalado de biorreactores de procesos de FES, a nivel comercial se maneja escalas intermedias y fermentadores de bandejas. En los últimos años se han desarrollado modelos que describen la transferencia de calor y



- a) cámara con bandejas
- b) bandeja de sustrato

Figura.2 Biorreactor de bandeja

masa en fermentadores de lecho empacado, de bandejas y rotatorios que pueden servir como guía para el escalado ya que a escala industrial la remoción de calor generado es el mayor inconveniente. (Mitchell et al., 1999; Mitchell et al., 2006)

I.2. *Pleurotus* spp

En general *Pleurotus* spp. es cosmopolita, encontrándose presente en todos los continentes. La producción de hongos de este género para consumo humano ha experimentado un crecimiento extraordinario a nivel mundial fundamentalmente en países como Japón, Corea, Taiwán, Filipinas, Estados Unidos y Alemania; lo cual se debe a las ventajas de su cultivo en comparación con el cultivo del champiñón, como presentar una tecnología sencilla, la utilización de una mayor gama de sustratos y además, poder ser cultivado en climas tropicales (Martínez-Carrera y col., 2000; Sánchez y Royse, 2001).

Los hongos ostra 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”.

La mayoría de los hongos cultivados desarrollan estructuras visibles que producen esporas (basidiomas). Estas son de construcción compleja y poseen un alto grado de diferenciación de tejidos hifales, las hifas provienen de micelio vegetativo, el cual se transforma en micelio reproductor.

Pleuroma es el nombre que se aplica al basidioma del hongo *Pleurotus*. Es un órgano reproductor y productor de estructuras generadoras de esporas, también recibe los nombres de carpóforo, cuerpo fructífero o setas. Su forma depende de la edad, cambiando de redondeada, al principio, para luego abrirse y ensancharse, después el borde se va levantando hasta que todo el conjunto adquiere la forma de un plato. El primer estado del desarrollo del pleuroma es el "primordio". A un tamaño de 1-2 mm de altura se pueden reconocer como cuerpos redondos blanquecinos. El cuerpo está separado en dos regiones aparentemente idénticas. Conforme el primordio se alarga, las dos zonas se diferencian en tres regiones píleo, láminas y estípite. (Figura 3)

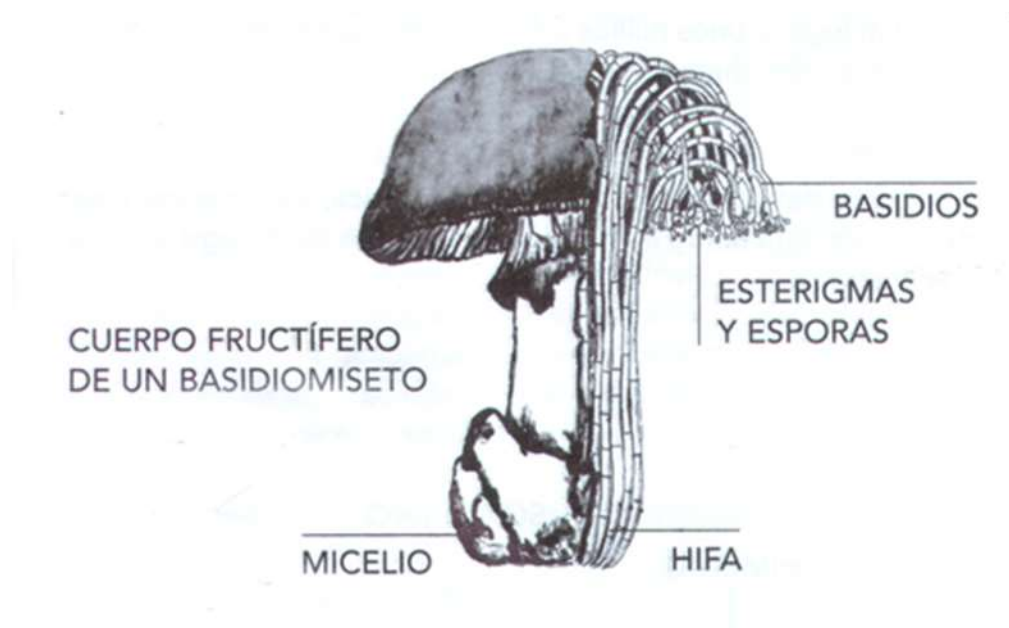


Figura 3. Esquema de cuerpo fructífero

La identificación de cepas y especies de hongos comestibles puede ser realizada por características morfológicas o microscópicas como el color, el tamaño y la forma del cuerpo fructífero, tamaño y forma de las esporas o características fisiológicas como la temperatura de fructificación o de crecimiento micelial. Pero la mayoría de los caracteres morfológicos dependen de las condiciones ambientales y es difícil identificar especies cercanas o especies aisladas de diferentes biotipos.

La superficie del sombrero o píleo, es lisa y generalmente uniforme y el pie o tallo (estípite) que lo sostiene es corto, algo duro, blanco y ubicado de forma excéntrica. En la parte inferior, el sombrero tiene laminillas dispuestas radialmente, que van desde el pie hasta el borde del mismo. Están separadas unas de otras y son de color blanco-crema. En ellas, se producen las esporas destinadas a la reproducción de la especie. Las esporas se ven a simple vista cuando, al desprenderse del sombrero, se depositan en masa como un polvillo harinoso de color blanco (Sánchez y Royse, 2001).

Con respecto a la diversidad fúngica, estima que en la Tierra existen 1.5 millones de especies. En el ámbito mundial se han domesticado aproximadamente 22 especies fúngicas, la mayoría de regiones tropicales y subtropicales. Sin embargo, de éstas sólo diez presentan una producción a escala industrial, con un volumen de producción del orden de los dos millones de Toneladas (Martínez-Carrera, 2010).

Los hongos comestibles son uno de los alimentos más antiguos consumidos por el hombre (Kwon y Kim, 2005). De las aproximadamente 10000 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.

De todas 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) y es el que más ha crecido desde sus comienzos. China

es el mayor productor de setas *Pleurotus* spp. (Chang, 2004, Cayetano y col, 2008; Bazán et al, 2004; Córdova, 2009; Gutiérrez y col, 1995; Klibansky y col, 1993).

Dentro de las ventajas que presenta este producto se pueden destacar que es sencillo de producir, en comparación con el champiñón y aun en condiciones adversas siempre se obtienen fructificaciones (Sánchez y Royse, 2001). Esto es posible, gracias a que este basidiomiceto secreta una gran cantidad y variedad de enzimas que tienen la capacidad de degradar compuestos complejos, convirtiendo así una materia de insignificante valor económico en alimento y medicina para humanos.

Los *Pleurotus* spp. constituyen alrededor de 50 especies, muy conocidas en el mundo entero, son diversas tanto por sus colores, (amarillo, blanco, gris, marrón oscuro e inclusive rosado) como por sus formas, sabor o por sus exigencias técnicas.

Las especies de *Pleurotus* spp. tienen alta capacidad saprofítica y pueden lo mismo colonizar sustratos esterilizados, pasteurizados y fermentados, e incluso en ocasiones, sin esterilizar (García y col, 2006; Gamarra y col, 2013; Mercedes, 2009; Rodríguez, 2015)

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 en dependencia del tipo de especie, oscila entre 628 y 1465 kJ/kg de setas frescas constituyendo a la vez una valiosa fuente de vitaminas y diferentes sales minerales%. (Sánchez y Royse, 2001)

Son probióticos, lo cual significa que ayudan al organismo a combatir las enfermedades, restaurando el bienestar y el equilibrio natural, haciendo que nuestro sistema inmune funcione correctamente para eliminar a los agentes externos que pudieran desequilibrar nuestra salud. Además de que son deliciosos y muy versátiles para ser utilizados en cualquier estilo culinario (Salas et al, 2004)

Cabe mencionar, que existe un gran interés en la producción de este tipo de hongos ya que su valor nutricional es muy bueno, contienen una apreciable cantidad de carbohidratos que no son del tipo de los almidones (los que engordan), su contenido de fibra dietética, es también alto, sobretodo de quitina, un polisacárido con propiedades

excepcionales en cuanto a que puede absorber fácilmente las grasas en el tracto digestivo (Gayosso, 2001).

Por otra parte, investigaciones recientes indican atributos medicinales en varias especies de hongos, como antiviral, antibacteriano, antiparasitario, antitumoral, antihipertensivo, antiaterosclerosis, hepatoprotector, antidiabético, anti inflamatorios y efectos moduladores del sistema inmune (Wasser, 1999), (Morris et al, 2007; ITISAM, 2006, Llauradó, 2016).

I.3.Cultivo de *Pleurotus* spp. sobre pulpa de café

El cultivo del café en las zonas montañosas es el 85 % del total que se cultiva en Cuba y en su beneficiado por vía húmeda se generan subproductos: pulpa, mucílago, pergamino, jugo, agua de lavados, etcétera. Se demostró que estos subproductos no son completamente aprovechados y se vierten al medio sin tratamiento, lo cual provoca contaminación de aguas y suelos deteriorando el medio ambiente. (Bermúdez y García, 2010; Salmones, 1997)

La pulpa de café representa el 40 % de todo el grano que se despulpa, por su composición química rica en azúcares, presenta potencialidades que son atractivas para ser empleadas como materia prima en diferentes procesos o tecnologías de FES como son: producción de bioabono, producción de biogás, alimento animal, y como sustrato puro o mezclado en la producción de setas comestibles. Estas tecnologías permiten utilizar un sustrato disponible y barato, eliminar la contaminación y a su vez generar beneficios en el orden económico, social y ambiental (Bermúdez y García, 2010)

La pulpa de café también contiene compuestos con efectos antifisiológicos como la cafeína y anti-nutricionales como los taninos y los poli-fenoles, para la degradación de estos se estudian mecanismos enzimáticos, aprovechando la capacidad de los basidiomicetos. (Elisashvili, 2008, García, 2008; Rodríguez, 2006).

Entre los microorganismos estudiados y empleados para la biotransformación de los compuestos antes mencionados y a la vez producir setas comestibles, dándole valor a la pulpa de café; está el *Pleurotus* spp. Este basidiomiceto ha sido objeto de

numerosos estudios por constituir un alimento su cuerpo fructífero, ser productor de enzimas de interés industrial (Bermudez et al, 2010; Rodríguez, 2006) y además por ser biotransformador de sustratos lignocelulósicos (Bonatti, M, 2004; Chang, 2007; García N, 2011; López-Rodríguez, 2008; Martínez Carrera, 2000 ; Rodríguez Valencia, 2005; Martínez Miranda, 2014; Vega, 2013; Pani y Mohanty, 1998).

El café de la zona oriental se cultiva en las dos variedades (Bressani, 1979; Sasson, 1993). Cuando se cultivó sobre ellas la cepa de referencia CCEBI 3024, el mayor rendimiento se obtuvo con la pulpa *Coffea arábica* L. (Verdecia 1999)

Existe mucha información sobre el cultivo de *Pleurotus* spp. sobre pulpa de café *Coffea arábica* L (Fan et al,2000; Martínez Carrera, 2000;Bermudez et al, 2001; Rodríguez Valencia, 2005; Mata, G ,2011) pero, son pocos los resultados de la producción de las cepas de *Pleurotus* sobre pulpa de café *Coffea canephora* Pierre ex Frhoener, por lo que resulta interesante evaluar las potencialidades productivas de este sustrato. Además, en la región oriental, después del huracán Sandy en 2012, existen cambios climáticos, que han traído como consecuencia que sea mayor la producción de café *Coffea canephora* (Verdecia, comunicación personal).

Por otra parte, la producción y los parámetros morfológicos de los cuerpos fructíferos en el cultivo del *Pleurotus* varían no solo en dependencia de la especie, sino también en dependencia del biorreactor empleado. (Oviedo, 2016; Reinoso 2015)

Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localización

El desarrollo experimental de la presente investigación se realizó en condiciones controladas 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.

2.2 Equipos y materiales

Se emplean equipos y materiales disponibles en los laboratorios de Microbiología del Centro de Estudio de Biotecnología Industrial, (CEBI) así como el de la Planta de investigación-producción del CEBI.

- Autoclave.
- Cámara Climatizada.
- Flujo laminar
- Quemadores Bunsen o Fisher
- Plancha de calentamiento.
- Cristalería.

Planta de investigación-producción

- Aire Acondicionado
- Refrigerador.
- Autoclave.
- Báscula.
- Mesa de siembra.
- Extractor de aire.
- Termómetros.
- Higrómetro.
- Materiales para el cultivo: bolsas de PVC transparentes, hilo o sogá pita, cubos, bandejas plásticas y metálicas, cuchillas, mecanismo de riego por aspersión, pomos de vidrio, ollas, etc.

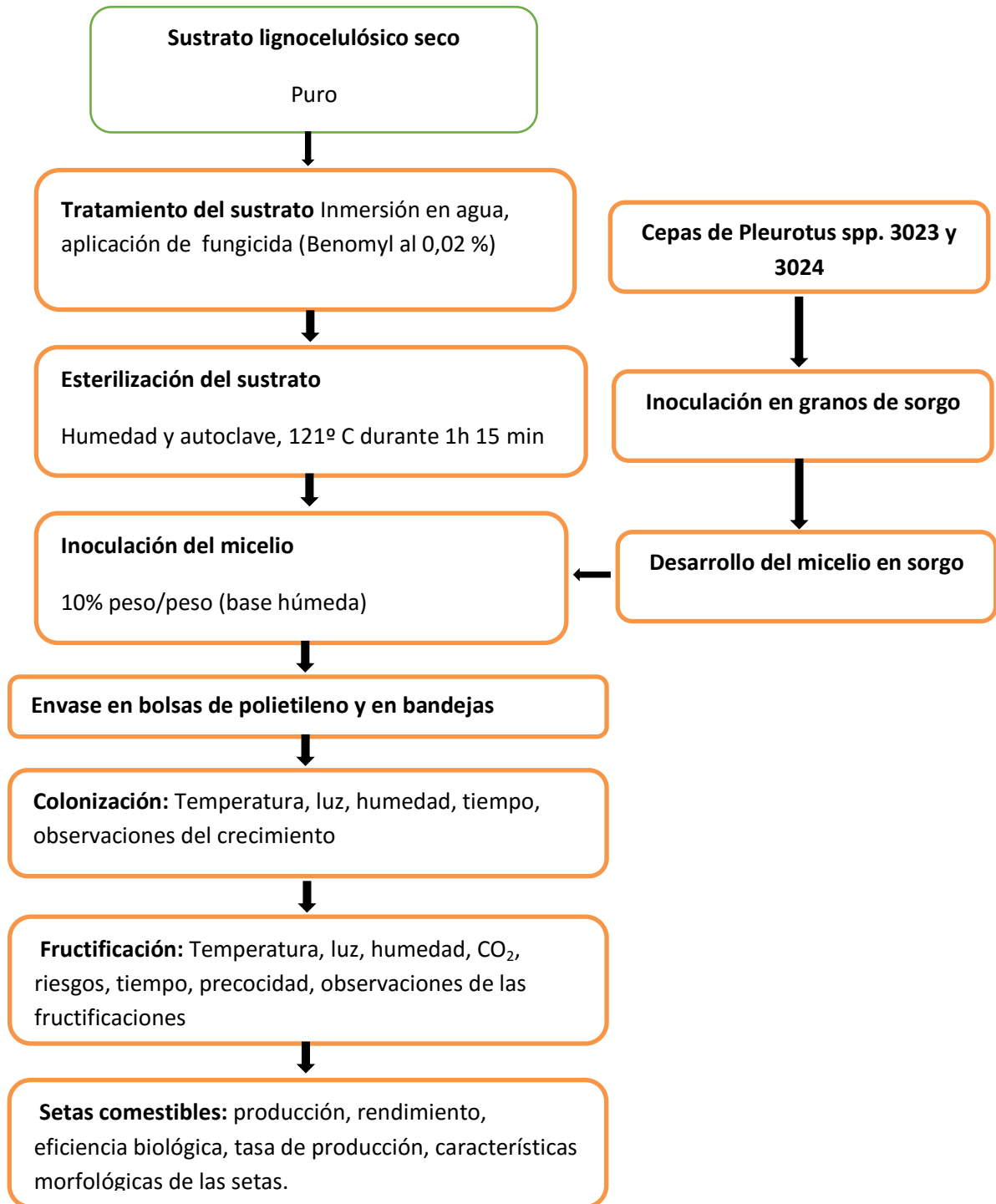


Fig 4. Etapas de la investigación

2. 3 Cepas

Se emplearon las siguientes cepas:

- *Pleurotus ostreatus* variedad Florida, clasificada como 3024 en la colección de cultivos del CEBI.
- *Pleurotus ostreatus*, clasificada como 3023 en la colección de cultivos del CEBI.

Se cultivaron en medio de Agar Malta a 28 °C durante siete días para su inoculación.

2.4 Sustrato

Se utilizó como sustrato la pulpa de café, de la especie *Coffea canephora*, procedente del Centro de beneficio húmedo “Filé” en el municipio III Frente, sometida a un proceso de secado solar para su posterior almacenamiento y traslado.

2.5 Diseño experimental

Para la producción de las setas comestibles, las unidades experimentales (biorreactores) fueron las bolsas de polietileno transparente termo-resistente y las bandejas plásticas. Las respuestas a obtener fueron: observaciones del crecimiento y la fructificación, la precocidad, el rendimiento, la eficiencia biológica, la producción, diámetro, número de setas, color y textura de las setas.

Se prepararon 7 réplicas de cada tipo de biorreactor y de cada cepa

Tabla 1: diseño experimental para la producción de las setas comestibles

Variables	Niveles	Peso sustrato inoculado (g)
Cepas	CCEBI 3023 Y CCEBI 3024	
Sustrato lignocelulósico natural	Pulpa de café <i>Coffea canephora</i>	
Tipo de Biorreactor	Bandeja 22 cm x 20 cm x 5 cm	500
	Bolsa 29 cm x 15 cm	500

2.6 Metodología de cultivo (fig. 1)

Preparación del inóculo

Para iniciar la producción del inóculo se siembra la cepa en placas Petri con Agar Malta, colocando una pequeña porción en el centro de la placa con el asa Microbiológico, para lograr una colonia gigante. Se incuba a 28 °C durante 17 días, hasta que el micelio cubra toda la placa.

Con las semillas de sorgo se procede a su limpieza, remojo en agua durante 24 horas, desinfección con Benomyl al 0,02 % y esterilización en autoclave a 121°C durante una hora y 15 minutos.

Generalmente para la esterilización se emplean frascos de vidrio de boca ancha. Cuando el soporte está completamente estéril y enfriado se procede a su inoculación en el propio envase, posteriormente se mantiene en reposo a una temperatura de 28 – 30 °C, en penumbras hasta lograr la total propagación del micelio.

Los frascos inoculados directamente de la placa Petri se llaman inóculos primarios, los cuales se emplean en inocular otros frascos; llamados inóculo secundario. Para grandes producciones es necesario propagar el micelio en un número significativo de frascos, lo cual se logra de inóculos secundarios a terciarios.

El inóculo producido de esta forma debe ser almacenado en frío (4-6 °C) hasta su utilización.

Preparación del sustrato

Independientemente de las características específicas de cada sustrato el procedimiento general que se utiliza es el siguiente:

- Moler el residual hasta obtener un tamaño de partícula entre 1 y 3 cm
- Limpiar el residual y eliminar los cuerpos extraños.
- Remojar en agua por 24 horas.
- Escurrir.
- Cocinar o pasteurizar por una hora a 90 °C.

- Escurrir y remojar en solución fungicida al 0.02 % por espacio de 5-10 minutos.
- Drenar hasta alcanzar un 75 % de humedad.

Estudio en diferentes biorreactores.

- Se emplearon dos tipos de biorreactores: la bolsa de polietileno termo-resistente y la bandeja plástica. En cada biorreactor se sembraron las diferentes cepas.

Inoculación y montaje.

Se realiza mezclando el inóculo con el sustrato; a una razón del 10 % de inóculo con relación al peso de sustrato húmedo; homogeneizando de forma que todo el inóculo se distribuya en el volumen de sustrato. Se empaca en bolsas de PVC transparentes, y bandejas plásticas cuidando no dejar espacios libres, en el caso de las bolsas se sellan y se eliminan las puntas para favorecer el intercambio con el medio. Se colocan en los estantes ubicados en el cuarto de colonización.

Colonización.

Se realiza en un local con penumbra a una temperatura entre 26 y 28 ° C y humedad de un 70-80 % (en el cuarto de colonización de la planta de producción). En esta etapa el micelio de *Pleurotus* spp. se desarrolla de forma vegetativa sobre toda la masa del sustrato. Al tercer día de colocadas las bolsas se realizan perforaciones de 1 cm de diámetro separados por 8 cm cada una. En las bandejas se hacen orificios en la parte inferior, ya que la parte superior no está cubierta.

Fructificación

Una vez colonizado el sustrato, el hongo cambia de su fase de crecimiento vegetativa al desarrollo de los cuerpos fructíferos, por lo que se realizan cambios en las condiciones establecidas, para la estimulación y desarrollo de los mismos.

- Humedad: Entre 90-95 %, se logra mediante la nebulización con un dispositivo de riego por aspersión.
- Temperatura: Entre 24-26 %.

- Iluminación: Se requiere de más de 400 Lux, en fotoperíodos de 12 horas / día se logra con lámparas fluorescentes colocadas en el techo y paredes.
- Ventilación: Es decisivo eliminar el CO₂ producido durante la respiración de las setas, se logra mediante extractor de aire, removiendo el aire 2 o 3 veces por hora.

Cuando aparecen los brotes o primordios, se comienza a inducir con iluminación; una vez desarrollado el cuerpo fructífero o seta, lo cual se indica cuando la oreja se encuentra en forma plana, se cortan los racimos con un instrumento afilado.

La colonización completa del micelio sobre el sustrato permite tal compactación que puede retirarse la bolsa de nylon y la bandeja plástica.

Una vez cosechadas las setas, se eliminan los restos de sustratos y se pesan. Luego se almacenan en refrigeración para su posterior análisis y/o consumo.

2.7 Parámetros productivos determinados.

- Producción promedio por bolsas: 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.

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

Según establece esta tecnología los rendimientos deben ser superiores al 10 % y la eficiencia biológica debe alcanzar valores como mínimo del 40 %, lo cual determina que sea factible económicamente el proceso. (Tschierpe y Hartmann, 1977, Patra y Pani,1995)

- 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

2. 8 Características de las setas comestibles.

Se evaluaron algunas características de las fructificaciones obtenidas por los aspectos morfológicos: color; diámetro de los cuerpos fructíferos y número de setas.

2.8.1 Tamaño de los cuerpos fructíferos.

Se midió el diámetro de todos los cuerpos fructíferos cosechados, se promediaron y se compararon los tamaños promedios entre las cepa.

2.9 Tratamiento estadístico

De cada tipo de biorreactor se realizaron 7 réplicas. Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizó el software Statgraphics® Centurion XV. En el caso de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos experimentales, las medias fueron comparadas mediante el test de rangos múltiples de Duncan. En todos los casos se utilizó un nivel de significación del 0.05 %.

Capítulo 3. RESULTADOS Y DISCUSION

La caracterización de las dos variedades de pulpa de café, de la cual se empleó en este caso la variedad *Coffea canephora* Pierre ex Frhoener, utilizados como sustratos se muestran en la tabla 2 (Verdecia, 1999). Estas especies de café presentan determinadas características químicas y físicas, que de una u otra forma influyen en el desarrollo micelial, fructificación y rendimiento final del cultivo. (Sales-Campo et al. 2009) Se observa que esta pulpa, posee los requerimientos nutricionales necesarios para la tecnología de cultivo de las setas comestibles del género *Pleurotus* spp.

En la tabla 2 se observan valores ligeramente superiores en la pulpa de café arábica utilizada en el experimento, en cuanto a materia seca, proteína bruta, calcio, potasio, fósforo, hierro, taninos, carbohidratos y aminoácidos. La pulpa de café, representa un buen medio de cultivo, lo cual garantiza realizar un aprovechamiento biotecnológico de este subproducto agrícola mediante la biotécnica de la fermentación en estado sólido, la cual ya ha sido reportada por varios autores (Sánchez y Royse, 2001, Bermudez y García, 2010).

Hay que precisar que la investigación fue realizada en una época del año en la provincia donde la variedad que se utilizó, *Coffea canephora* no está disponible fresca, fue necesario emplear la pulpa de las reservas del CEBI que tenía un tiempo de conservación de aproximadamente un año, pudiendo esto afectar las características físico químicas y fisiológicas de la pulpa.

Se puede observar que la pulpa de café arábica, tiene un mayor valor de humedad que la pulpa de café *Coffea canephora*, debido a que esta última tiene mayor dureza, menor porosidad y por lo tanto menor capacidad de absorción de agua, lo que influye de forma negativa en el desarrollo del hongo en su fase de colonización, así como en la asimilación de nutrientes, también tendrá pocos espacios intercelulares, por lo que dificultará la aireación, tan importante para los hongos, creemos que todos estos factores traen como consecuencia que se obtengan menores rendimientos en el cultivo de *Pleurotus* en pulpa de café *Coffea canephora*.



Figura 5. Propagación del micelio de *Pleurotus ostreatus* en semillas de sorgo previamente esterilizados



Figura 6. Semillas de sorgo completamente colonizadas

Tabla 2. Características de dos variedades de pulpa de café (% en base seca)
(Verdecia 1999)

Parámetros	sustratos	
	Pulpa de café <i>Coffea arábica</i> **	Pulpa de café <i>Coffea canephora</i> *
Humedad	12.0	9.0
Materia seca	88.0	90.3
pH	7.1	4.8
Cenizas	7.6	9.3
Extracto etéreo	2.5	n.d.
Fibra bruta	20.3	n.d.
Proteína bruta (N x6.25)	12.2	9.37
Calcio	0.61	0.158
Sodio	0.08	0.019
Potasio	2.40	1.650
Fosforo	0.14	0.797
Hierro	0.04	n.d.
Taninos	4.92	n.d.
Carbohidratos	21.8	9.65
Proteína soluble	12.7	n.d.
Aminoácidos	0.34	0.26
Lípidos	2.6	n.d.

Serrat, 1998*

Traba et al, 1994**

n.d.: no determinado.

Para controlar y evaluar el comportamiento de la temperatura, se realizaron mediciones sistemáticas al menos tres veces al día con intervalo de 4 horas, empezando a la 8.30 de la mañana, luego a la 12.30 p.m. y finalmente a la 4.30 pm, obteniendo valores medios inferiores a los óptimos durante todo el experimento (ambas fases del proceso). Los mismos se hizo con la humedad relativa, que todo el tiempo tuvo ligeramente por debajo de los 95 % de humedad como se puede observar en la tabla 3.

Las condiciones han sido controladas durante toda la investigación como se señala en la tabla 3, excepto algunos momentos que surgieron algunas dificultades con interrupciones del fluido eléctrico en 4-5 ocasiones, afectando la programación de los fotoperiodos. El desarrollo de este trabajo transcurrió durante los meses de mayo de 2017 a julio de 2017, con una duración total desde la inoculación hasta la última cosecha de 61 días, el comienzo de la fructificación fue a partir de los 10 días.

3.1 Cultivo en bolsas.

En las tablas 4,5 y 6 se presentan los resultados de la producción de las cepas estudiadas. La cepa CCEBI 3024 tuvo menor tiempo de precocidad, de 13 días y la cepa CCEBI 3023 tuvo 18 días una diferencia de 5 días que significa que la primera tiene un mayor tiempo de crecimiento que la segunda, coincidiendo con los resultados que se han obtenido anteriormente por otros autores. (García 2008, Verdecia 1999)

Las eficiencias biológicas de las dos cepas CCEBI 3024 y CCEBI 3023 fueron de 63,3% y 64,1% respectivamente que es por encima de los 40% y los rendimientos de 17 y 17,2 % respectivamente también por encima de los 10% significando que esas dos cepas son buenas productoras según (Tschierpe y Hartmann, 1977, Prata y Pani, 1995).

Las producciones de las dos cepas fueron similares, porque las diferencias registradas no fueron significativas; sin embargo hubo 4 oleadas en la cepa de referencia CCEBI 3024 y solo hasta 3 en la CCEBI 3023.

En la primera oleada las producciones de las dos cepas fueron similares ya que la diferencia que presentan los resultados no fue significativa (tabla 3). El diámetro promedio de las setas de la CCEBI 3024 fue de 3,27 cm y de la CCEBI 3023 fue de

Tabla 3. Condiciones establecidas para el cultivo de setas comestibles *Pleurotus*

Sustrato	Pulpa de café variedad <i>Coffea canephora</i>
Capacidad del biorreactor	500 g de sustrato húmedo
Humedad del sustrato de siembra	70-75 %
Inoculación	Micelio crecido en sorgo, 10% masa/masa
Fase colonización	Temperatura: 25±1°C Humedad relativa del ambiente: <95% Concentración CO ₂ : aire normal, 20-25% Luminosidad: Penumbra
Fase fructificación	Temperatura: 21±1°C Humedad relativa del ambiente: >95% Riegos: 3-4 veces/día (en piso y paredes) Concentración CO ₂ : <0,6%, ventilación forzada Luminosidad: 150-200 lux (suficiente para leer)



Figura 7. Primordios en bolsa



Figura 8. Primordios en bandeja

4,22 cm que es mayor que en el caso de la cepa de referencia. Se produjeron 155 setas en la cepa de referencia y 148 en la CCEBI 3023, la diferencia no fue significativa. Los resultados de Verdecia, 1999 en la primera oleada con la cepa de referencia CCEBI 3024 obtuvo 347,7 g de setas; esta diferencia entre los resultados de este trabajo y los de Verdecia podría explicarse con la diferencia que existe en las condiciones de cultivo, ya que el utilizó la pulpa de café fresca.

En la segunda oleada, la producción en las dos cepas disminuyó considerablemente, la producción de la CCEBI 3024 fue de 70,6 g, mientras que la de la CCEBI 3023 fue de 103 g. Los cuerpos fructíferos tuvieron un diámetro promedio de 3,59 cm y 3,14 cm en la CCEBI 3024 y CCEBI 3023 respectivamente (tabla 5). El diámetro promedio en la cepa de referencia fue mayor que en la CCEBI 3023 aunque la diferencia no sea significativa. Hubo 61 setas producidas en la CCEBI 3023 y 40 en la CCEBI 3024.

La producción en la tercera oleada aun fue menor; menos que en las oleadas anteriores. La CCEBI 3024 tuvo una producción de 13,9 g que se obtuvieron en solo 3 de las 7 bolsas y la CCEBI 3023 tuvo una producción de 1,3 g de setas en una sola de las 7 bolsas. Este resultado se debe al hecho que el sustrato se haya a este punto agotado de los elementos necesarios al desarrollo de los cuerpos fructíferos. El promedio de las setas obtenidas en la cepa de referencia fue de 2,2 cm y la única seta que se produjo en el caso de la CCEBI 3023 tuvo un diámetro de 2,94 cm. Se produjeron 5 setas con la CCEBI 3023 y 12 con la CCEBI 3024 (tabla 6).

Hubo cuarta oleada solo en la cepa de referencia. La CCEBI 3024 produjo 2 setas con un peso de 2,3 g. El diámetro promedio fue de 1,6 cm y solo una bolsa tuvo producción.

De los resultados anteriores, se demuestra, que para lograr una alta productividad del cultivo, debe de desarrollarse el proceso hasta la tercera oleada para ambas cepas.

Las setas obtenidas en general tuvieron un color blanco grisáceo en las dos cepas y se observó en algunas setas de las últimas oleadas (la 3ra y la 4ta) cosechadas solo de la cepa de referencia la CCEBI 3024, que los sombrerillos de algunas eran de color gris oscuro. Las setas presentaron una textura carnosa, pero las de la CCEBI 3023 fueron más carnosas.

Tabla 4. Parámetros productivos de las cepas cultivadas en bolsas

		Producción (g)								Total (g)
CCEBI 3024	1ra oleada	22	23	24	25	26	27	28	507,2± 20,8	594±9,7
		76,9	61,8	104,4	92,9	71,3	50,5	49,4		
	2da oleada								70,6± 5,1	
		6,8	20	6,7	11,7	7	5,8	12,6		
	3ra oleada	-	7,5	5,4	-	-	1	-	13,9 ± 3,3	
	4ta oleada	-	2,3	-	-	-	-	-	2,3	
CCEBI 3023	1ra oleada	8	9	10	11	12	13	14	497,1± 19,1	601,4±38,0
		44,8	78,5	45,3	88,2	86	86,7	67,6		
	2da oleada								103,0± 12,2	
		5	13,6	11,1	38	6	5,6	23,7		
	3ra oleada	-	-	-	-	1,3	-	-	1,3	

Tabla 5. Características de las setas cultivadas en bolsas

		Diámetro(cm)							promedio
CCEBI 3024	1ra oleada	22	23	24	25	26	27	28	3,27± 0,70
		3,61	2,66	4,28	2,63	4,40	2,76	2,60	
	2da oleada								3,59 ± 1,90
		2,96	7,50	1,62	3,53	2,32	2,82	4,38	
	3ra oleada	-	4,65	2,18	-	-	1,35	-	2,20 ± 1,71
	4ta oleada	-	1,60	-	-	-	-	-	1,60
CCEBI 3023	1ra oleada	8	9	10	11	12	13	14	4,22 ± 1,40
		6,05	3,07	3,77	6,25	4,26	3,10	3,06	
	2da oleada								3,14 ± 1,20
		3,20	2,30	2,69	5,74	2,28	2,90	2,89	
	3ra oleada	-	-	-	-	2,94			2,94

3.2 Cultivo en bandejas.

Debido a la falta de criterios para el escalado de biorreactores de procesos de FES, a nivel comercial se maneja escalas intermedias y fermentadores de bandejas. En los últimos años se han desarrollado modelos que describen la transferencia de calor y masa en fermentadores de lecho empacado, de bandejas y rotatorios que pueden servir como guía para el escalado (Mitchell et al., 1999).

Para decidir sobre el empleo de biorreactores a determinada escala, primero es necesario evaluarlas en condiciones de laboratorio. La producción en las bandejas fue diferente para las dos cepas, valores de eficiencia y rendimiento fueron mayores para la CCEBI 3024, ver tabla 11. La cepa de referencia CCEBI 3024 tuvo una precocidad de 10 días, mientras que la CCEBI 3023 tuvo 29 días de precocidad, lo que evidencia que la CCEBI 3023, no es buena productora en bandeja.

Por otra parte, ninguna de las dos cepas supera las producciones obtenidas en las bolsas. Los resultados muestran que se hace difícil mantener la humedad de las bandejas y al perder la humedad el sustrato, la colonización se hacía más lentamente, afectando entonces la precocidad.

Para mantener la humedad, se movieron los cultivos en las bandejas hacia otro local (laboratorio especializado en la colonización) 15 días después de la siembra, donde las condiciones se optimizaron para las bandejas. En estas condiciones sistemáticamente 2 veces al día, por la mañana y por la tarde; se regaba la superficie de las bandejas para mantener la humedad alrededor de los valores óptimos. El sustrato bien colonizado y bien compacto despegado de las paredes laterales de las bandejas especialmente en el caso de la CCEBI 3023 se colocó a la superficie superior de 3 de las bandejas, unos cubiertos con orificios para el intercambio de aire, para conservar más la humedad y propiciar más oscuridad.

Resultó conveniente la operación que se hizo, porque 29 días después de la inoculación en el sustrato aparecieron los primordios. En la primera oleada, la producción tuvo diferencia significativa, con mayores valores de eficiencia biológica y rendimiento para la CCEBI 3024. Las 92 setas producidas por la CCEBI 3024 tuvieron

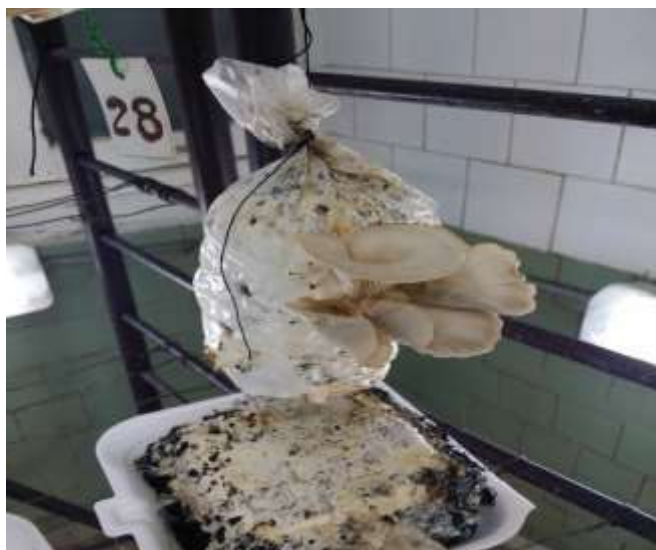


Figura 9. Setas maduras en bolsa



Figura 10. Setas maduras en bandeja

un diámetro promedio de 3,1 cm las 97 de la CCEBI 3023 que tuvieron un diámetro promedio de 3,5 cm, es decir sin diferencias (tablas 7,8 y 9). Los primordios aparecieron principalmente en las partes laterales del sustrato compacto en las bandejas y también en la parte superior; los primordios que aparecieron en la parte inferior de las bandejas se habrían atrofiados por la falta de espacio.

Las setas presentaron un sombrerillo grande, un estípite largo, generalmente más largo en la CCEBI 3023. Los cuerpos fructíferos de las dos cepas tuvieron un color blanco grisáceo como en las bolsas. Las setas de la CCEBI 3023 tuvieron una consistencia más carnosa que las de la cepa de referencia, presentaron en algunos casos específicos y exclusivamente un desprendimiento en las lamelas que se pueden observar en la figura 11.

La producción en la segunda oleada fueron similares en las dos cepas Sin embargo los diámetros fueron diferentes. En cuanto al número de setas obtenidas, 43 para la CCEBI 3024 y 49 para la CCEBI 3023 no hubo diferencia significativa. Resumiendo, las dos cepas tuvieron una respuesta similar en la producción, los diámetros promedios y el número de los cuerpos fructíferos.

En la tercera oleada la CCEBI 3024, todas las bandejas produjeron setas mientras en la CCEBI 3023 dos solamente produjeron. La cepa de referencia fue mucho más productiva con 59,70 g de setas, mientras que en la CCEBI 3023 la producción fue de 26,11 g. Los diámetros promedios fueron de 3,54 cm y de 2,58 cm para la CCEBI 3024 y la CCEBI 3023 con 32 y 19 setas respectivamente.

Solo tuvo producción la cepa de referencia en la cuarta oleada con 32,6 g que pesaron las 19 setas con tuvieron un diámetros promedio de 2,4 cm. Produjeron dos bandejas.

De los resultados estos, se demuestra, que para lograr una alta productividad del cultivo, debe de desarrollarse el proceso hasta la tercera oleada, como sucedió con las bolsas.

El cultivo en bandeja no dio una producción igual que en bolsa 346,8 g para la cepa de referencia CCEBI 3024 y 286,9 g para la CCEBI 3023 contra 594 g y 601,4 g respectivamente en las bolsas, debido a factores como las condiciones normales de

Tabla 7. Parámetros productivos de las cepas cultivadas en bandejas

		Producción (g)								Total
CCEBI 3024	1ra oleada	15	16	17	18	19	20	21	175,6± 8,5	346,8 ± 10,1
		22,3	34,2	34,4	33	18,2	18,5	15		
	2da oleada								78,9± 5,3	
		19,5	9,5	17,4	12	6,2	6,6	7,7		
	3ra oleada	5,9	9,8	7,3	1,7	19,4	9,3	6,3	59,7± 5,5	
	4ta oleada	29,9	2,7	-	-	-	-	-	32,6 ± 19,2	
CCEBI 3023	1ra oleada	1	2	3	4	5	6	7	187,7± 17,8	286,9 ± 16,1
		29,6	21,8	18	66,6	-	24	27,7		
	2da oleada								73,1± 10,6	
		13	5,3	32,5	8,3	-	-	14		
	3ra oleada	21,3	-	-	-	-	-	4,8	26,1± 1,7	

Tabla 8. Características de las setas cultivadas en bandejas

		Diámetro(cm)							promedio
CCEBI 3024	1ra oleada	15	16	17	18	19	20	21	3,10±0,58
		2,10	3,70	3,39	3,07	2,53	3,40	3,53	
	2da oleada								3,00±0,91
		4,34	3,70	3,54	2,38	2,90	2,10	1,88	
	3ra oleada	5,20	5,10	3,40	3,30	3,65	1,63	2,52	3,54±1,30
	4ta oleada	2,04	2,75	-	-	-	-	-	2,40±0,50
CCEBI 3023	1ra oleada	1	2	3	4	5	6	7	3,50± 1,90
		2,75	2,71	7,15	3,86	-	2,30	2,38	
	2da oleada								2,12±0,62
		1,90	1,80	3,40	1,72	-	-	1,80	
	3ra oleada	2,90	-	-	-	-	-	2,26	2,58±0,45



Figura 11. Setas con desprendimiento de lamelas

cultivo .Un factor que afectó la producción es la limitación de la superficie de aparición de primordios y crecimiento de los cuerpos fructíferos; las bandejas según la geometría que poseen necesitan reposar en una superficie para poder estar en equilibrio y ese mismo soporte constituye un área menos para el volumen total disponible para la producción.

Hay que notar que también empleando este tipo de biorreactor permite la preparación de sustrato ya inoculado listo a despechar a los consumidores que podrían hacer el cultivo más fácil por ellos mismos asegurándole obtener las setas frescas a su gusto; un ejemplo típico son los kits para cultivo de hongos setas.(Martínez-Carrera D et al 2000; Reinoso, B. 2015)

3.3. Valoración económica y ambiental

Analizando los resultados experimentales obtenidos por los especialistas de esta rama y luego de un estudio de demanda del producto: setas comestibles y de cuantificación de los subproductos de las industrias cafetalera, se realizó un estudio económico preliminar para valorar la factibilidad de esta tecnología a escala comercial. Se llegaron a estos resultados preliminares. (Guarín 2004; Cortes R, 2011, Sánchez, 2016; Taranto, 2017)

- La industrialización de la tecnología crearía nuevos empleos para la población, además de contribuir al desarrollo económico.
- La ejecución de una planta productora de setas comestibles es una alternativa viable y atractiva pues la inversión se recupera entre 3 y 4 años con una tasa interna de rendimiento del 20 %.
- Estas setas comestibles-medicinales son capaces de satisfacer en gran medida las necesidades nutricionales de la población en los países subdesarrollados. También tienen virtudes medicinales y aplicaciones médicas que tienen y su bajo costo de producción, alto contenido proteico con la presencia de aminoácidos esenciales, vitaminas y bajo contenido de grasas, además de su obtención en grandes cantidades a corto plazo.
- Las setas *Pleurotus* spp. a nivel mundial son de gran aceptación y principalmente en los países emisores de turismo hacia el territorio cubano,

donde los consumos per cápita y producciones se han incrementado vertiginosamente en los últimos años.

- Las ventas de las setas al turismo se estiman entre 4 500 y 7 500 USD la tonelada.
- Anualmente la zona oriental del país genera un total aproximado de 54 545 toneladas de pulpa de café que en términos absolutos, aplicando la tecnología descrita, representaría un volumen de 14 000 toneladas de setas, que constituirían una excelente fuente de alimento humano, representando ingresos en divisas y permitiendo eliminar la contaminación de las zonas donde se cultivan el café y el cacao, generando además un volumen considerable de pleurotina, sustrato enriquecido, con diferentes usos
- El establecimiento de estas plantas son un aporte al desarrollo sostenible

El diseño industrial sería más factible ya que el monitoreo de algunos parámetros no serían necesarios tales como la climatización, que en condiciones controladas es muy importante e que se mantiene durante todo el ciclo productivo lo que constituye un gasto energético considerable.

Teniendo en cuenta la demanda en los varios sectores, pacientes enfermos que requieren de una alimentación sana y a la vez curativa; turismo con la cantidad más elevada cada año hacia el territorio nacional; el sector de la investigación médica, los problemas de contaminación del medio ambiente, la alimentación de ganados; la lombricultura y finalmente la implicación de ese método biotecnológico en el desarrollo sostenible la producción de setas comestibles constituye un proyecto importante.

CONCLUSIONES

1. La productividad de las dos cepas CCEBI 3024 y CCEBI 3023 en las bolsas mostraron que las Eficiencias Biológicas fueron 63,3% y 64,1%, respectivamente y el Rendimiento 17,0% y 17,2%, respectivamente, fueron similares para las dos cepas, solo presentaron diferencias significativas en la Precocidad.
2. La productividad de las dos cepas CCEBI 3024 y CCEBI 3023 en bandejas, mostraron que las Eficiencias Biológicas fueron 37,0% y 30,6%, respectivamente y el Rendimiento fue 10,0% y 8,2%, respectivamente presentaron diferencias significativas, y también diferencias significativas en la Precocidad.
3. El cultivo en los biorreactores de bolsas, al tener mayor productividad, resultan más convenientes para la producción de las setas.
4. Los parámetros morfológicos diámetro y número de setas son mayores en el biorreactor de bolsa.
5. En las cepas estudiadas no hubo diferencias en el color de los cuerpos fructíferos.

RECOMENDACIONES:

1. Se recomienda incluir dentro del proceso productivo de setas comestibles de la Planta de Investigación-Producción del CEBI, la pulpa de café *Coffea canephora* como sustrato de producción y la cepa CCEBI 3023.
2. Continuar mejorando las condiciones en el cultivo en bandeja para obtener mejores parámetros productivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bazán D. et al. 2004 Análisis comparativo del cultivo de cepas de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus eringii* Rev. Per. Quím. Ing. Quím. Vol. 7, No 2, p 24-29
- Bermúdez Savón et al. 2010, "Potencial biotecnológico de la pulpa de café para producir enzimas ligninolíticas por FES.", Tecnología Química, Vol. XXX, No. 2, p 102.
- Bermúdez Savón, Rosa C y García N. 2010 "Cultivo de setas comestibles (*Pleurotus*) en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Cuba". En: D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora (Eds). *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. México: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. Colegio de Posgraduados, p 489-512.
- Bermúdez, R. C. ; García, N. ; Gross, P. ; Serrano, M., 2001 Cultivation of *Pleurotus* on Agricultural Substrates in Cuba", *Micología Aplicada Internacional*, Vol.13 No.1, p 25-29, Berkeley, CA, USA.
- Bonatti M, 2004 Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. *Food Chemistry* Vol.88, p 425–428.
- Bressani R. 1979 Factores antifisiológicos de la pulpa de café. En: Pulpa de café: composición, tecnología y utilización. Braham JB y Bressani R. (eds.) International Development Research Center Ottawa, Canadá., p 143-152.
- Cayetano - Catarino, M y Bernabé-González, T, 2008 " Cultivo de *Pleurotus* sobre residuos de las cosechas de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y plátano (*Musa paradisiaca*)" *Revista Mexicana de Micología*, 26: p 57-60.
- Chang, S. T and P. G. Miles. 2004 *Mushrooms, Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. , Boca Raton: CRC Press , 451 p
- Chang, S. T." 2007 Mushroom cultivation using the "Zeri" principle: potential for application in Brazil". *Micología Aplicada Internacional*, , Vol. 19, No. 2, p 33 – 34.

- Córdova Ordóñez, 2009 " Estudio comparativo del crecimiento micelial del hongo (*Pleurotus ostreatus*) en acícula de pino, bagazo de caña y bagazo de maíz. " trabajo de grado, Escuela de Ingeniería agropecuaria, Cuenca, Ecuador.
- Cortés R Misael, Ph.D, Marilza Ruiz R, M.Sc, Luís Henriquez, Ing. Agrícola. 2011 " Influencia del empaque y envasado sobre las propiedades fisicoquímicas del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*" Rev. MVZ Córdoba Vol.16, No.2, p 2593-2604.
- Durand A. 2003 Bioreactor designs for solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal Vol.13 No. (2-3): p 113-125.
- Dustet JC, Izquierdo E. 2004 Aplicación del balance de masa y energía al proceso de fermentación en estado sólido de bagazo de caña de azúcar con *Aspergillus niger*. Biotecnología Aplicada Vol.21, p 85-91.
- Elisashvili. V et al. 2008 "Lentinusedodes and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in sumerged and solid-state fermentationof lignocellulosics wastes of different composition". Bioresource. Technology, Vol. 99, p 457-462.
- Fan L, et al. 2000 Use of various coffee industry residues for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. Acta Biotecnológica, Vol. 20, No. 1, p 41-52.
- Ferrer G José R. y colaboradores, 2014 "Fermentación en estado sólido: Una alternativa biotecnológica para el aprovechamiento de desechos agroindustriales" Revista Tecnocientífica URU.
- García Oduardo. N y colaboradores 2006" Cultivo de cepas de *Pleurotus* sp. sobre pulpa de café" Revista Mexicana de Micología; Vol.23, p 99-101
- García Oduardo Nora. 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 de, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, ".
- García Oduardo Nora. 2011 Formulaciones de sustratos en la producción de setas comestibles *Pleurotus*, TECNOLOGÍA QUÍMICA Vol. XXXI, No. 3.
- García Torres y colaboradores 2003" Producción de enzimas lignolíticas por Basidiomycetes mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido" Revista Colombiana de Biotecnología, vol. 5, No. 1, p 56-64

- Gamarra Torres, O.A, 2013” Cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* (jacq. Ex fr.) Kumm empleando pulpa de café como sustrato.”, revista científica Pakomuros, vol.1, No.1
- Gayosso Canales Martha: 2001 “Caracterización de los componentes de un extracto de primordios de *Pleurotus ostreatus* que induce su fructificación. ” Tesis en opción a título de Máster en Ciencias Área Biotecnología, Universidad de Colima, México.
- Gross, P. 2001 “Influencia del manganeso y el calcio en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre pulpa de café *Coffea canephora Pierre ex Froehner*”. Tesis de Máster en Biotecnología. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Universidad de Oriente., 52 p.
- Guarín Barrero .J.A et al. 2004 “ Estudio de Factibilidad Técnico-Financiero de un cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus* en Cundinamarca” trabajo de grado para opción al título de Ingeniero Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ingeniería, Departamento de Industrial, Santafé de Bogotá, Colombia.
- Guía técnica de producción de hongos comestibles de la especie *Pleurotus ostreatus*. 2010 Journal of Agriculture and Environment for International Development, Vol. 104 (No.3-4): p 139 – 154/. p 141-142.
- Gutiérrez, I., L. González, M. Klibansky, A.L. González y D. González, 1995. Cultivo de hongos comestibles en diferentes sustratos de desechos. Mem. Conferencia Mundial Sobre Biomasa para la Energía, el Desarrollo y el Medio Ambiente, La Habana.
- Hölker U y Lenz J. 2005 Solid–State fermentation – are there any biotechnological advantages? Current Opinion in Microbiology Vol. 8, p 301-306.
- Itisam, S. et al. 2006 Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans, International Immunopharmacology Volume 6, Issue 8, August, p 1287–1297
- Julián MC y Ramos LB 2007 Fermentación en estado sólido (i). Producción de alimento animal. Tecnología Química XXVII No.3,p 17-22.
- Klibansky, M., M. Mansur, I. Gutiérrez y J. Lois, 1993. Production of *Pleurotus ostreatus* mushrooms on sugar cane agro – wastes. Acta Biotechnol. Vol.13, No.1, p 67 – 76.

- Kwon H y Kim BS. 2005 Capítulo 7 Formas de cultivo. Cultivo en bolsas. En: Manual del cultivador de hongos 1. Cultivo del hongo ostra. Publicado por MushWord, Corea. p150-165.
- Llauradó Maury Gabriel. 2016 'Evaluación de la actividad inmunomoduladora de bioproductos de la seta comestible *Pleurotus* sp. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.
- López-Rodríguez y colaboradores, 2008 Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca, Universitas Scientiarum, Vol. 13 , No. 2 , p 128-137
- Mandeel QA, Al-Laith AA, Mohamed SA. 2005 Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) on various lignocellulosic wastes. World Journal of Microbiology and Biotechnology Vol.21, p 601–607.
- Mata. G, 2011, Inóculo suplementado: evaluación de un método para optimizar la producción de inóculo para el cultivo de *Pleurotus* en pulpa de café, / Revista Mexicana de Micología, Vol.34, p 53-61.
- Martínez-Carrera D et al 2000, Commercial production and marketing of edible mushrooms cultivated on coffee pulp in Mexico. Capítulo 45 En: Coffee Biotechnology and Quality. Sera T, Soccol CR, Pandey A, Roussos S. (eds.) Kluwer Academics Publisher, p 471-488
- Martínez - Carrera, D., Curvetto, N., Sobal, M., Morales, P., Mora, V.M. 2010. Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción – consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el siglo XXI. Cap 27, p 489.
- Martínez Miranda 2014 “ Producción de tres especies de *Pleurotus* spp. utilizando diferentes sustratos” Tesis de grado en opción a título de Ingeniero Agrónomo con énfasis en cultivos tropicales. Universidad Rafael Landívar, Guatemala.
- Mercedes C.O, 2009 “Estudio comparativo del crecimiento micelial del hongo (*Pleurotus ostreatus*) en acícula de pino, bagazo de caña y bagazo de maíz.” Presentado en opción a título de Ingeniería Agropecuaria, Cuenca-Ecuador
- Mitchell. D, et al. 1999 Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation. Process Biochemistry, Vol. 35, No. 1-2, p 167-178.

- Mitchell, D.D. et al. 2006 Solid –State Fermentation Bioreactors, fundamentals of design and operation, Springer- Verlag Berlin Heidelberg, Vol. 2, No.5; p 65-67.
- Morris et al. 2012 Productos inmunocéuticos derivados del hongo comestible-medicinal *Pleurotus* sp. cultivado sobre pulpa de café en Cuba. En: Sánchez JE, Mata G. (Eds.)"Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica. Investigación y desarrollo en un entorno multicultural. p 309-318. El Colegio de la Frontera Sur, ISBN 978-607-7637-73-8 Tapachula Chiapas, México
- Nieto, I. y Chegwin C. 2010. The influence of the substrate used for growing edible fungi on their nutraceutic characteristics. Revista Colombiana de Biotecnología. Bogotá, Colombia. Vol.12, p 169-178.
- Oviedo, J.C y colaboradores, 2016 " Evaluación de Tres Variables de Crecimiento del *Pleurotus pulmonarius* sobre Tusa de Maíz Empleando Procesamiento Digital de Imágenes" Información Tecnológica Vol.27, No.5, p 27-36.
- Pandey A. (2003) Solid-state fermentation. Biochemical Engineering, Vol.13, p 81-84.
- Pani BK y Mohanty AK. 1998 Utilization of water hyacinth as an alternative substrate to paddy straw for oyster mushrooms cultivation. Crop Residuals Vol.8, p 145-296.
- Patra, A. K. y, B. K. Pani. 1995. "Evaluation of banana leaf as a new alternate substrate to paddy straw for oyster mushroom cultivation". Journal of Phytopathology Research, vol. 8, p 145-148.
- Pérez-Guerra N, Torrado-Agrasar A, López-Macias C, Pastrana L. 2003, Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. Electronic Journal of Environmental, Agriculture and Food Chemistry Vol.2 No.3, p 343-350.
- Rahardjo Y, Tramper, Rinzema A. 2006 Modeling conversión and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. Biotechnology Advances Vol.24, p 161-179.
- Reinoso, B. 2015'' Diseño de un fermentador de bandejas a escala piloto para la producción de enzimas con actividad lignolítica y celulolítica a partir del Hongo *Phanerochaete chrysosporium* mediante fermentación en medio solido en aserrín de eucalipto.'' tesis en opción a título de Ingeniero Químico. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Quito, Ecuador.

- Rodríguez Pérez, Suyen. 2006. Decoloración de los residuales de la pasteurización de la pulpa de café y la vinaza por *Pleurotus* spp. Tesis en opción al título de doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de Oriente
- Rodríguez, Valencia Nelson et al, 2005 “Cultivo de hongos comestibles del género *Pleurotus* sobre residuos agrícolas de la zona cafetalera”. Cenícafé. Boletín Técnico No. 27
- Rodríguez-Couto S y Sanromán MA. 2006 Application of solid-state fermentation to food industry—A review. Journal of Food Engineering Vol.76, No.3, p 291-302.
- Rodriguez, G; 2015 “Evaluación de la productividad de dos cepas de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos provenientes de la industrialización de peras y manzanas.” Horticultura argentina ,Vol.34, No.85
- Ruíz-Leza, H. A. y colaboradores, 2007 “Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido”; Revista Mexicana de Ingeniería Química Vol. 6, No.1, p 33-40
- Salas Norma et al, 2004 “Estudio del valor nutricional y propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de *Pleurotus ostreatus*” Rev. Per. Quím. Ing. Quím. Vol. 7, No. 2, p 40
- Sales-Campo Ferreira da Eira, A., Teixeira de Almeida M. y Nogueira de Andrade M.C. 2009 Mineral composition of raw material, substrate and fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* in culture. Interciencia, Vol.34, No. 6, p 432-436
- Salmones D. y colaboradores: 1997 “ Estudios sobre el género *Pleurotus*. Interacción entre crecimiento micelial y productividad” Rev Iberoam Micol; Vol.14, p 173-176.
- Sánchez José E., Daniel Royse 2001. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Edición; México.
- Sánchez Escudero Leyre 2016 “ Identificación y caracterización de hongos de interés para su uso industrial y, en especial en la industria alimentaria mediante el uso de métodos moleculares” Grado en innovación en procesos y productos alimentarios.
- Sasson A. 1993 La alimentación del hombre del mañana. Editorial Reverté, S.A., Barcelona. p 807

- Serrat, M.J., 1998. Potencialidades de las levaduras en el aprovechamiento de los residuales del café. Tesis presentada en opción al título de máster en biotecnología, Mención Biotecnología Industrial.
- Taranto Moreira, 2017 “Producción del *Pleurotus ostreatus* a partir de residuos de hortalizas generados en el mercado central del cantón Quevedo”, Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniero en Gestión Ambiental, Carrera de Ingeniería en Gestión Ambiental, Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad Técnica Estatal de Quevedo.
- Traba, J.A., A. Marañón, R.C. Bermúdez, M. de J. Verdecia, M. de los A. Santana, M. Fernández, 1994. Caracterización de residuales sólidos del café, especie *Coffea arabica* L. Ciencia Vol.45, p 375 – 380.
- Tschierpe, H. J. and K. Hartmann, 1977. A comparison of different growing methods. Mushroom Journal, Vol.60, p 404-416.
- Vega, A. y Franco, H. 2013 “ Productividad y calidad de los cuerpos fructíferos de los hongos comestibles *Pleurotus pulmonarius* RN2 y *P. djamor* RN81 y RN82 cultivados sobre sustratos lignocelulósicos”, Información Tecnológica, Vol. 24, No. 1, p 69-78.
- Verdecia García M.J. 1999 “ Cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* var. Florida sobre pulpa de café en condiciones rurales. ” Tesis en opción a título de Master en Biotecnología. CEBI, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente.
- Wasser SP, Weis AL 1999 Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). International Journal of Medicinal Mushrooms; Vol.1, p 31-62.

ANEXO 1. Cultivo de las dos cepas en bolsa (en blanco penúltima fila el promedio y en gris la desviación estándar)

Produc. Bolsa (g) CCEBI 3024 1ra	Produc. Bolsa (g) CCEBI 3024 2da	Produc. Bolsa(g) CCEBI 3024 3ra	Produc. Bolsa(g) CCEBI 3024 4ta	Produc. Bolsa (g) CCEBI 3023 1ra	Produc. Bol (g) CCEBI 3023 2da	Produc. Bolsa(g) CCEBI 3023 3ra
76,9	6,8			44,8	5	
61,8	20	7,5	2,3	78,5	13,6	
104,4	6,7	5,4		45,3	11,1	
92,9	11,7			88,2	38	
71,3	7			86	6	1,3
50,5	5,8	1		86,7	5,6	
49,4	12,6			67,6	23,7	
72,5	10,1	4,6	2,3	71,0	14,7	1,3
20,7632	5,1213	3,32		19,0703	12,1837	

Diámetro (cm) CCEBI 3024 1ra	Diámetro (cm) CCEBI 3024 2da	Diámetro (cm) CCEBI 3024 3ra	Diámetro CCEBI (cm) 3024 4ta	Diámetro (cm) CCEBI 3023 1ra	Diámetro (cm) CCEBI 3023 2da	Diámetro CCEBI (cm) 3023 3ra
3,6	2,9			6,0	3,2	
2,6	7,5	4,6	1,6	3,0	2,3	
4,3	1,6	2,2		3,8	2,7	
2,6	3,5			6,2	5,7	
4,4	2,3			4,2	2,3	2,9
2,7	2,8	1,3		3,1	2,9	
2,6	4,4			3,0	2,9	
3,3	3,6	2,2	1,6	4,2	3,1	2,9
0,7	1,9322	1,71		1,3902	1,1924	

Número de setas CCEBI 3024 1ra	Número de setas CCEBI 3024 2da	Número de setas CCEBI 3024 3ra	Número de setas CCEBI 3024 4ta	Número de setas CCEBI 3023 1ra	Número de setas CCEBI 3023 2da	Número de setas CCEBI 3023 3ra
23	5			11	1	
18	2	2	2	35	13	
18	8	8		9	14	
34	6			6	7	
13	8			21	5	5
28	4	2		49	3	
21	7			17	18	
22,1	5,7	4	2	21,1	8,7	5
7,0102	2,2147	3,46		15,6251	6,3434	

ANEXO 2 .Cultivo de las dos cepas en bandeja (en blanco penúltima fila el promedio y en gris la desviación estándar)

Produc. Bandeja (g) CCEBI 3024 1ra	Produc. Bandeja (g) CCEBI 3024 2da	Produc. Bandeja (g) CCEBI 3024 3ra	Produc. Bandeja (g) CCEBI 3024 4ta	Produc. Bandeja (g) CCEBI 3023 1ra	Produc. Bandeja (g) CCEBI 3023 2da	Produc. Bandeja (g) CCEBI 3023 3ra
22,3	19,5	5,9	29,9	29,6	13	21,3
34,2	9,5	9,8	2,7	21,8	5,3	
34,4	17,4	7,3		18	32,5	
33	12	1,7		66,6	8,3	
18,2	6,2	19,4		-	-	
18,5	6,6	9,3		24	-	
15	7,7	6,3		27,7	14	4,8
25,1	9,3	8,5	16,3	31,3	14,6	13,0
8,4924	4,7982	5,5	19,2	20,0882	11,2165	1,66

Diámetro (cm) CCEBI 3024 1ra	Diámetro (cm) CCEBI 3024 2da	Diámetro (cm) CCEBI 3024 3ra	Diámetro CCEBI (cm) 3024 4ta	Diámetro (cm) CCEBI 3023 1ra	Diámetro (cm) CCEBI 3023 2da	Diámetro CCEBI (cm) 3023 3ra
2,1	4,3	5,2	2,0	2,7	1,9	2,9
3,7	3,7	5,1	2,7	2,7	1,8	
3,4	3,5	3,4		7,1	3,4	
3,1	2,4	3,3		3,9	1,7	
2,5	2,9	3,6		-	-	
3,4	2,1	1,6		2,3	-	
3,5	1,9	2,5		2,4	1,8	2,2
3,1	3,0	3,5	2,4	3,5	2,1	2,6
0,5838	0,9158	1,3	0,5	2,1595	1,1900	0,45

Número de setas CCEBI 3024 1ra	Número de setas CCEBI 3024 2da	Número de setas CCEBI 3024 3ra	Número de setas CCEBI 3024 4ta	Número de setas CCEBI 3023 1ra	Número de setas CCEBI 3023 2da	Número de setas CCEBI 3023 3ra
13	5	1	17	18	13	14
13	5	2	2	17	8	
19	8	2		2	12	
17	8	1		20	8	
13	4	6		-	-	
8	7	14		19	-	
9	6	6		21	8	5
13,1	6,1	4,6	9,5	16,2	9,8	9,5
3,9340	1,5736	4,68	10,6	8,8962	5,1962	6,36

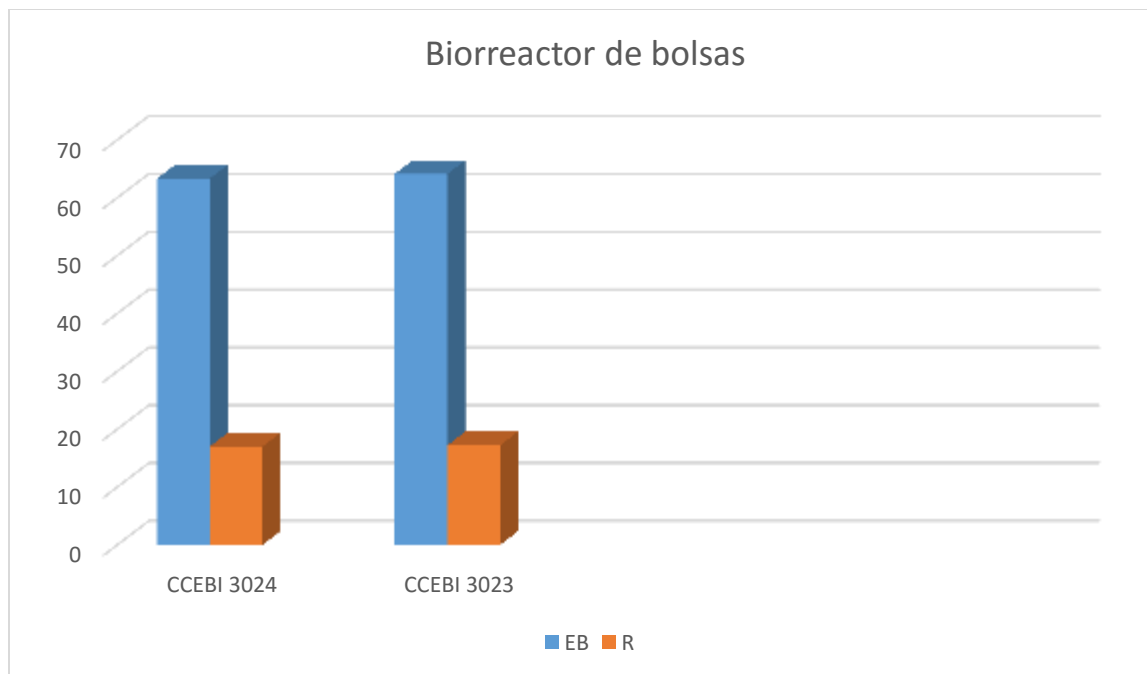


Grafico 1.Parámetros productivos de las dos cepas en el cultivo en bolsa: Eficiencia Biológica y Rendimiento

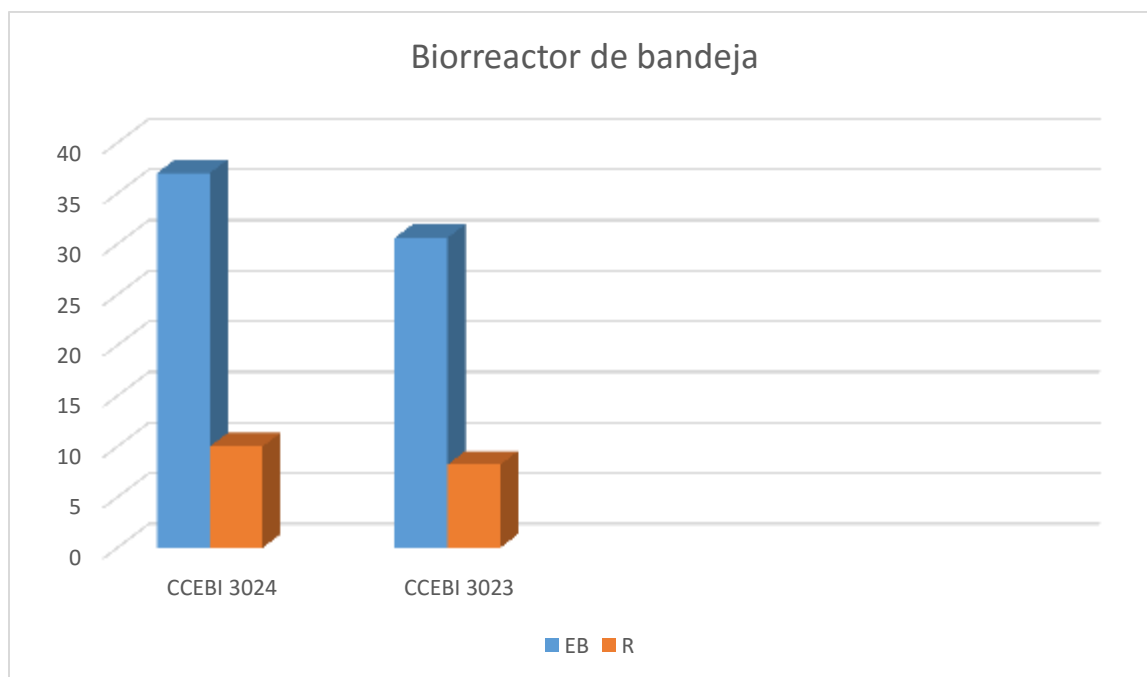


Grafico 2.Parámetros productivos de las dos cepas en el cultivo en bandeja: Eficiencia Biológica y Rendimiento