



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

**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.**

**NORA GARCÍA ODUARDO**

**Santiago de Cuba**

**2008**



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

**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.**

**Autora: Ing. NORA GARCÍA ODUARDO, MSc.**

**Tutores: Prof. Tit., Lic. Rosa Catalina Bermúdez Savón, Dra. C.**

**CR1, Christopher Augur, PhD**

**Santiago de Cuba**

**2008**

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosa Catalina Bermúdez Savón, por su dedicación y entrega total para este trabajo y en mi formación como científica, al Dr. Christopher Augur por su apoyo e interés en la realización de esta investigación, consejos y sugerencias para lograr una tesis con mayor rigor científico.

A los integrantes de la comisión científica del CEBI, los doctores Humberto Joaquín Morris Quevedo, Suyén Rodríguez Pérez, Arelis Ábalos Rodríguez, Manuel de Jesús Serrat Díaz y Rosa María Pérez Silva por ser siempre críticos y exigentes.

Al **colectivo del CEBI** y en especial al Proyecto Biotecnología de Hongos Superiores por asumir las tareas necesarias y suplir mis funciones, permitiéndome una mayor dedicación en esta investigación.

A la Dra. Isabel Gaime-Perraud por enseñarme que primero se camina y luego se corre, mostrarme los secretos de la fermentación en estado sólido y hacer de madre cuando lo necesité. Al Dr. Sevastianos Roussos y su grupo de trabajo en el laboratorio BioTrans del IRD en la Universidad de Marsella, por su apoyo en esta investigación y confianza en mi trabajo.

Al Dr. Rene Viera Bertrán, siempre apoyándome, gracias por sus consejos y sabiduría.

A los doctores Niurka Varela Quiala, Fidel Doménech López y Bernardo Reyes Tur, por sus críticas, valoraciones y sugerencias en aras de mejorar esta memoria y mis conocimientos.

A las técnicas Lic. Migdalia Serrano Alborni y Lic. Isabel Aguilera Rodríguez, por el trabajo en la producción de setas y en los métodos analíticos, respectivamente.

A la Dra. Mónica Contreras Domínguez por su ayuda en el trabajo de laboratorio, al estudiante Roopesh por apoyarme en las técnicas bioquímicas.

Al MSc. Maikel Fernández Boizán por su disposición siempre en las cuestiones de computación.

A Eugenio García por su apoyo y deferencia en los trabajos de encuadernación en las diferentes etapas.

A todos aquellos que de una forma u otra me apoyaron.

**MUCHAS GRACIAS.**

*A mis seres queridos*

*A mis padres, que han hecho más  
transitable el camino.*

## LEYENDA

- ABTS: Acido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato).
- C/N: Relación carbono – nitrógeno.
- CCEBI: Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial.
- CEBI: Centro de Estudios de Biotecnología Industrial.
- CUC: Peso cubano convertible.
- CUP: Peso cubano (moneda nacional)
- EB: Eficiencia biológica (g setas frescas / g sustrato seco).
- ECE: Extracto crudo enzimático.
- ECICC: Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao.
- $\epsilon_0$ : Coeficiente de extinción molar.
- FES: Fermentación en estado sólido.
- FS: Fermentación sumergida.
- HPLC: Cromatografía líquida de alta presión (High Pressure Liquid Chromatographic).
- ICIDCA: Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar.
- NC: Norma cubana.
- ND: No determinado.
- Ø: Diámetro (mm).
- OIC: Organización Internacional del Café.
- P: Precocidad (días).
- R: Rendimiento (g setas frescas / g sustrato húmedo).
- S: Sustrato (gramos).
- SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio.
- TP: Tasa de producción (g setas frescas / g sustrato seco / día).
- X: Biomasa (gramos).

## SÍNTESIS

En la presente investigación se estudió la capacidad biotransformadora de *Pleurotus* spp. en la producción de setas comestibles y enzimas lacasas por medio de la fermentación en estado sólido de la pulpa de café, empleando seis cepas *P. ostreatus* y una *P. sajor-caju*, se evaluó la influencia positiva de la mezcla pulpa de café con la viruta de madera y con las cáscaras de cacao y coco; se estudió el efecto del contenido de nitrógeno del sustrato sobre la producción de setas comestibles y la biotransformación de una molécula modelo de tanino condensado, la procianidina B2, a través de la producción de enzimas lacasas.

Se empleó la fermentación en estado sólido como técnica biotecnológica por ser cada día más utilizada para valorizar subproductos de las agroindustrias, ofrecer ventajas sobre la convencional fermentación sumergida, ser económica y sencilla su aplicación, y por tener menor impacto sobre el medio ambiente. La pulpa de café resultó ser el sustrato que ofrece la mayor eficiencia biológica con 1,68g setas frescas/g sustrato seco, superior al resto de los sustratos puros; éstos mejoraron sus valores de eficiencia biológica cuando se mezclaron con la pulpa de café y se logró eliminar las pérdidas por bolsas contaminadas, haciendo más sanitaria y económica la producción de setas comestibles.

Las mejores cepas productoras de setas comestibles fueron CCEBI 3027 y CCEBI 3021 con 4,5 y 3,4g de setas frescas/g de sustrato seco/día, respectivamente. Para una misma cepa los valores de eficiencia biológica son mayores en el sustrato que posee mayor contenido de nitrógeno (2,9% base seca), que es la pulpa de café.

Se estudió la cinética del *Pleurotus* spp. sobre pulpa de café durante la fase vegetativa usando el sistema Raimbault a diferentes escalas; se detectó actividad lacasa durante el crecimiento, la cepa CCEBI 3023 logró el mayor valor (25Ug<sup>-1</sup>). Las concentraciones de compuestos tóxicos en la pulpa de café decrecieron (con máximos de 24% para cafeína y 53% para fenoles totales); todos los crudos enzimáticos producidos por las cepas estudiadas transforman la procianidina B2 en diferente extensión, la cepa CCEBI 3023 fue la mejor biotransformadora (100%), superior a las referenciadas con *Aspergillus*.

## LISTADO DE TABLAS

1. Historia y desarrollo de la fermentación en estado sólido.
2. Ejemplos de aplicaciones económicas de las fermentaciones en estado sólido.
3. Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido (FES) comparada con fermentación sumergida (FS).
4. Composición química (%) de algunos subproductos empleados en la producción de setas comestibles y/o enzimas ligninolíticas, por FES.
5. Producción de café en los diez primeros países exportadores.
6. Composición química de la pulpa de café y la cáscara de café (% base seca).
7. Compuestos fenólicos presentes en la pulpa de café fresca y fermentada (3 días).
8. Algunos ejemplos de sustratos en la producción de setas comestibles *Pleurotus ostreatus* y su eficiencia biológica.
9. Análisis del valor fertilizante del sustrato remanente obtenido luego de la producción de setas comestibles *Pleurotus* spp. (en %).
10. Valor nutricional de diferentes setas comestibles y alimentos (% peso fresco).
11. Diseño experimental empleado en la producción de setas comestibles y enzimas lacasas.
12. Formulaciones binarias de los sustratos.
13. Parámetros de diseño y trabajo de las columnas a diferentes escalas de fermentación.
14. Producción de setas comestibles de *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa CCEBI 3024, con los subproductos del café y dos tamaños de biorreactor.
15. Producción de setas comestibles de *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa CCEBI 3024, en diversos experimentos (E) de la planta de investigación-producción del CEBI.
16. Producción de setas comestibles de *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa CCEBI 3024, en diversos experimentos (E) de una planta rural.
17. Temperatura y humedad relativa durante la producción de setas en la planta de investigación-producción.
18. Temperatura y humedad relativa durante la producción de setas en la planta rural.
19. Producción de setas comestibles frescas de *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa CCEBI 3024, sobre pulpa de café procedente de *Coffea arabica* y *C. canephora* en la planta rural.
20. Condiciones establecidas para la producción de setas comestibles *Pleurotus* en la planta de investigación-producción.
21. Tiempos (días) para la formación de los primordios a partir de la inoculación cepas de *Pleurotus* spp. sobre pulpa de café *Coffea arabica*.
22. Eficiencia biológica, tasa de producción y diámetro de los cuerpos fructíferos.
23. Características de los cuerpos fructíferos obtenidos con las cepas cultivadas sobre pulpa de café.

24. Actividades enzimáticas lacasa, manganeso peroxidasa y versátil peroxidasa de las cepas de *Pleurotus* spp. luego de 60 días de cultivo sobre pulpa de café.
25. Caracterización química de los subproductos y el trigo para la producción de setas comestibles.
26. Resultados obtenidos del cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa CCEBI 3024, sobre diferentes subproductos agrícolas.
27. Bioconversión (en %) de los sustratos estudiados y su comparación con resultados de Martínez-Carrera y col., 2000\*.
28. Resultados de la producción de setas comestibles sobre las formulaciones de sustratos.
29. Influencia de las mezclas con pulpa de café sobre la eficiencia biológica y la *tasa de producción (en cursiva)* de las cepas.
30. Producción de enzima lacasa por *Pleurotus ostreatus*, cepa CCEBI 3023, sobre pulpa de café al 100% y mezclada luego de 60 días de cultivo.
31. Producción setas *Pleurotus* spp. sobre mezcla pulpa de café: viruta de cedro (1:1).
32. Características de los cuerpos fructíferos obtenidos en la mezcla pulpa de café: viruta de cedro (1:1).
33. Evaluación cualitativa de actividad lacasa extracelular de las cepas de *Pleurotus* spp. sobre los medios de cultivo a los 10 días de incubación a 25°C.
34. Producción de biomasa micelial ( $\text{mg g}^{-1}$  sustrato seco) de las cepas de *Pleurotus* spp. sobre pulpa de café en columnas Raimbault.
35. Máxima actividad lacasa producida por las cepas de *Pleurotus* spp., empleando columnas pequeñas de fermentación en medio sólido.
36. Costos de inversión de una planta productora de setas de  $60 \text{ ton año}^{-1}$ .
37. Costos de los equipos para la inversión de una planta productora de setas de  $60 \text{ ton año}^{-1}$ .
38. Costos de producción total de una planta productora de setas de  $60 \text{ ton año}^{-1}$ .
39. Gastos en salarios del personal de la planta de setas.
40. Costos unitarios de producción.
41. Indicadores de eficiencia económica (en pesos).
42. Flujo económico neto durante siete años de una planta productora de  $60 \text{ ton año}^{-1}$  de setas frescas (en pesos).
43. Comparación entre varios abonos orgánicos y los obtenidos con pulpa de café y pleurotina de café (% base seca).
44. Análisis de los diferentes tipos de humus.
45. Análisis bromatológico de las setas *Pleurotus ostreatus* (Florida) obtenidas a partir de diferentes sustratos de cultivo.



## LISTADO DE FIGURAS

1. Algunos procesos a micro escala que ocurren en la fermentación sólida.
2. Estructura morfológica del *Pleurotus* spp.
3. Metodología de trabajo de la producción de setas *Pleurotus* spp.
4. Elementos de entrada y salida del balance de masa durante la producción de setas comestibles.
5. Columna de fermentación en estado sólido, según diseño de Raimbault.
6. Dispositivo de fermentación aerobia con columnas Raimbault.
7. Columna de 0,75 kg.
8. Tratamiento realizado a las muestras de pulpa de café fermentadas.
9. Colonización del micelio de *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa CCEBI 3024, en semillas de trigo, luego de 15 días de sembrados.
10. Primordios (a) y setas comestibles (b) de *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa CCEBI 3024, sobre pulpa de café.
11. Producción de setas en la planta de investigación-producción.
12. Producción de setas en la planta rural.
13. Distribución porcentual de las cosechas obtenidas por las cepas de *Pleurotus* spp. sobre pulpa de café *Coffea arabica*.
14. Setas comestibles de las cepas cultivadas sobre pulpa de café.
15. Primera cosecha de setas comestibles de *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa CCEBI 3024, sobre cáscaras de coco (a) y cacao (b).
16. Eficiencia biológica (■) y rendimiento (□) de la producción de setas comestibles con tamaños de partícula de la cáscara de cacao.
17. Comportamiento de la eficiencia biológica (□), la tasa de producción (■) y la precocidad (línea) en las diferentes formulaciones.
18. Influencia de las mezclas de sustratos con pulpa de café (1:1) sobre la eficiencia biológica (□) y la tasa de producción (■) en la producción de setas comestibles *Pleurotus ostreatus*, cepa CCEBI 3023.
19. Cuerpos fructíferos de las cepas CCEBI 3021 y CCEBI 3027 cultivadas sobre pulpa de café: viruta de cedro.
20. Actividad lacasa cualitativa sobre micelio de *Pleurotus* spp. crecido sobre extracto de pulpa de café con glucosa, lateral (A) y centro de la placa (B).
21. Fermentación sólida de la pulpa de café en columnas pequeñas a) recién inoculadas (derecha), con 24 horas de incubación (izquierda) b) con micelio de *Pleurotus* spp., luego de 96 horas de incubación.
22. Producción de enzima lacasa por cepas de *Pleurotus* spp. sobre pulpa de café en columnas Raimbault.

23. Zimograma de máxima producción de lacasa de las cepas de *Pleurotus* spp.
24. Fermentación sólida de la pulpa de café en escala media de fermentación, (a) recién montadas y (b) con micelio de *Pleurotus* spp. luego de 96 horas de fermentación.
25. Actividad enzimática lacasa de las cepas CCEBI 3023 (línea azul) y CCEBI 3024 (línea roja) sobre pulpa de café, a escala pequeña (vacío) y media (lleno) de fermentación.
26. Conjunto de fotos de la fermentación sólida de la pulpa de café con las cepas CCEBI 3023 y CCEBI 3024 en columna de 0,75 kg.
27. Disminución del contenido de los fenoles totales durante el crecimiento de las cepas CCEBI 3023 (línea azul) y CCEBI 3024 (línea roja), a escala pequeña (vacío) y media (lleno) de fermentación.
28. Concentración inicial y final de cafeína ( $\text{mg g}^{-1}$  sustrato seco) en la pulpa de café a escala pequeña (vacío) y media (lleno) de fermentación.
29. Cambios en la concentración de fenoles totales (áreas) de la pulpa de café y producción de lacasa (líneas) por *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3023 (línea azul) y *Pleurotus ostreatus* (Florida) CCEBI 3024 (línea roja) en columnas pequeñas (vacío) y en columnas medias (lleno).
30. pH (línea) y actividad lacasa (barras) de las 20 fracciones obtenidas en el isoelectroenfoque del extracto crudo de *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3023, al cuarto día de fermentación.
31. Zimograma de lacasa producida por *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3023 (acrilamida al 10%) de las fracciones con actividad lacasa obtenidas del isoelectroenfoque.
32. Actividad enzimática los extractos crudos de las cepas de *Pleurotus* spp. sobre la procianidina B2.
33. Transformación de la procianidina B2 por los extractos crudos enzimáticos de las cepas de *Pleurotus* spp. luego de tres días de fermentación.
34. Cromatógrama de procianidina B2 comercial (a). Acción del extracto crudo enzimático de *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3023 sobre la procianidina B2 luego de 48 horas de fermentación (b).
35. Tecnología integral desarrollada para la producción de setas comestibles *Pleurotus*.

## TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Problema .....	1
Objeto de investigación. ....	3
Hipótesis. ....	4
Objetivo general. ....	4
Objetivos específicos. ....	4
Novedad científica. ....	5
Aportes .....	5
Importancia teórica. ....	6
Importancia práctica y social. ....	6
Estructura de la tesis. ....	7
<b>CAPITULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	9
1.1. Fermentación en Estado Sólido (FES). ....	9
1.1.1. Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido (FES) comparada con la fermentación sumergida (FS). ....	12
1.2. Biorreactores en la fermentación en estado sólido. ....	13
1.2.1. Bolsas de polietileno. ....	14
1.2.2. Columnas Raimbault. ....	15
1.3. Sustratos en fermentación en estado sólido. ....	16
1.3.1. Pulpa de café. ....	17
1.3.2. Otros subproductos agrícolas. ....	20
1.4. <i>Pleurotus</i> spp. ....	20
1.4.1. Setas comestibles. ....	22

	Pág.
1.4.1.1. Valor nutricional y medicinal de las setas comestibles.-----	25
1.4.2. Hongo ligninolítico.-----	27
1.4.3. Productor de enzimas ligninolíticas lacasas. -----	29
1.4.3.1. Aplicaciones potenciales de las lacasas en biotecnología.-----	32
<b>CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS -----</b>	<b>34</b>
2.1. Diseño experimental. -----	34
2.2. Cepas de <i>Pleurotus</i> spp. -----	35
2.3. Producción de setas comestibles. -----	35
2.3.1. Preparación del inóculo. -----	36
2.3.2. Preparación de sustratos puros y las mezclas. -----	36
2.3.3. Fermentación en bolsas de polietileno. -----	37
2.3.4. Muestreo y control de la producción de setas comestibles. -----	38
2.3.4.1. Precocidad. -----	38
2.3.4.2. Producción. -----	38
2.3.4.3. Eficiencia biológica. -----	39
2.3.4.4. Rendimiento. -----	39
2.3.4.5. Tasa de producción. -----	40
2.3.4.6. Bioconversión. -----	40
2.3.5. Características de las setas comestibles.-----	40
2.3.5.1. Tamaño de los cuerpos fructíferos. -----	41
2.3.5.2. Determinación de proteína bruta. -----	41
2.3.5.3. Determinación de ácidos nucleicos. -----	41
2.3.6. Determinación cuantitativa de la actividad enzimática ligninolítica del sustrato remanente. -----	41
2.4. Producción de enzimas lacasas. -----	42
2.4.1. Estudio sobre diferentes medios de cultivo agarizados. -----	42
2.4.1.1. Evaluación cualitativa de la actividad enzimática lacasa. -----	43
2.4.2. Preparación del inóculo. -----	43
2.4.3. Preparación de la pulpa de café.-----	43

	Pág.
2.4.4. Fermentación en estado sólido en columnas Raimbault. -----	44
2.4.5. Fermentación en estado sólido en columnas de 0,75 kg. -----	44
2.4.6. Muestreo y control de la producción de enzimas lacasas. -----	44
2.5. Determinaciones analíticas. -----	45
2.5.1. Determinación cuantitativa de la actividad enzimática lacasa. -----	45
2.5.2. Determinación del pH. -----	46
2.5.3. Determinación del porcentaje de humedad. -----	46
2.5.4. Determinación del porcentaje de pérdida de peso. -----	46
2.5.5. Determinación de carbohidratos totales solubles. -----	46
2.5.6. Determinación de azúcares reductores. -----	46
2.5.7. Determinación de biomasa micelial. -----	46
2.5.8. Determinación de proteínas solubles. -----	47
2.5.9. Determinación de compuestos tóxicos. -----	47
2.5.9.1. Determinación de fenoles totales. -----	47
2.5.9.2. Determinación de taninos condensados (proantocianidinas totales). -----	47
2.4.9.3. Determinación de cafeína. -----	48
2.6. Técnicas de purificación y caracterización de las lacasas del crudo enzimático. ---	49
2.6.1. Diálisis. -----	49
2.6.2. Isoelectroenfoque. -----	49
2.6.3. Ultrafiltración. -----	50
2.6.4. Zimografía. -----	50
2.7. Aplicación del crudo enzimático sobre procianidina B2 comercial. -----	51
2.8. Tratamiento matemático y estadístico de los resultados. -----	53
2.9. Determinación de los indicadores de eficiencia económica y económico-financiero de una planta productora de setas comestibles.-----	53
<b>CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----</b>	<b>54</b>
3.1. Producción de setas comestibles. -----	54
3.1.1. Establecimiento de las condiciones ambientales. -----	54

	Pág.
3.1.1.1. Evaluación de la producción en la planta de investigación-producción y en una planta rural. -----	56
3.1.2. Evaluación de la producción de setas con cepas <i>Pleurotus</i> spp. sobre sustratos naturales. -----	63
3.1.2.1. Evaluación de la producción sobre pulpa de café. -----	63
3.1.2.2. Evaluación de la producción sobre otros sustratos puros. -----	68
3.1.2.3. Evaluación de la producción sobre mezclas de sustratos. -----	73
3.1.2.3.1. Evaluación de la influencia del contenido de nitrógeno en el sustrato. -	77
3.2. Producción de enzimas lacasas. -----	80
3.2.1. Evaluación de cepas <i>Pleurotus</i> spp. -----	82
3.2.2. Estudio comparativo de enzimas lacasas producidas en columnas Raimbault. -	83
3.2.3. Escalado en las columnas Raimbault. -----	85
3.2.3.1. Fermentación en estado sólido en columnas de 0,75 kg. -----	87
3.2.4. Biotransformación de los contenidos de fenoles totales, taninos condensados y cafeína en la pulpa de café. -----	88
3.3. Características de la enzima lacasa producida por <i>Pleurotus</i> spp. -----	90
3.3.1. Zimografía -----	92
3.3.2. Evaluación del crudo enzimático sobre procianidina B2 comercial. -----	92
3.4. Evaluación técnico económica de una planta productora de setas comestibles.-----	93
 <b>CONCLUSIONES</b> -----	 98
<b>RECOMENDACIONES</b> -----	100
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	101
<b>ANEXOS</b> -----	122
<b>AUTOBIBLIOGRAFÍA</b> -----	142

## **INTRODUCCIÓN**

La protección del medio ambiente se convierte cada vez más en una prioridad a tener en cuenta por el hombre, pues de la calidad del entorno depende su vida y la de los demás organismos.

Desde finales del siglo pasado se ha venido prestando gran interés a la búsqueda de soluciones a los problemas medioambientales y en especial, a evitar la contaminación del entorno provocada por el vertimiento de los subproductos de las industrias. Desde julio de 1997, en Cuba se aprobó en la Asamblea Nacional del Poder Popular, la Ley 81 del Medio Ambiente, la cual ha logrado imponerse gradualmente a favor de la naturaleza y sus recursos.

En este sentido la **fermentación en estado sólido** es cada día más utilizada para valorizar subproductos de las agroindustrias. Como técnica biotecnológica la fermentación en medio sólido ofrece ventajas sobre la convencional fermentación sumergida, por ser económica y sencilla su aplicación y ser la que tiene menor impacto sobre el medio ambiente (Pérez-Guerra y col., 2003).

### **Problema.**

La producción de café es un ejemplo destacado de agroindustria de nuestro país que genera de forma colateral grandes volúmenes de **pulpa de café**, un subproducto lignocelulósico derivado del objetivo central de la actividad cafetalera. Este material, por lo general, tiene poca salida de aprovechamiento y en algunos casos su acumulación

puede llegar a plantear problemas de carácter obstructivo o contaminante. Desde los años ochenta, muchos investigadores han fijado su atención en la pulpa de café como sustrato para el cultivo de **setas comestibles *Pleurotus*** (Guzmán y col., 1993; Martínez-Carreras y col., 2000). El resultado de esos trabajos es la puesta a punto de una serie de técnicas de procesado de este material de gran interés práctico. La pulpa de café fresca tiene una cantidad apreciable de materiales fermentables, susceptibles de contaminaciones bacterianas y fúngicas y de invasión de insectos, así que necesita ser homogenizada y estabilizada para un mejor manejo y aprovechamiento posterior en la fermentación en estado sólido.

El cultivo de setas comestibles en Latinoamérica se inició a finales de los años treinta y su crecimiento ha sido extraordinariamente lento durante los siguientes 50 años debido a varias razones: el hermetismo total por parte de los pocos productores en ese tiempo; la nula información, difusión y desconocimiento total respecto al cultivo de setas comestibles por parte de instituciones agrícolas y como consecuencia de esto; la poca producción y consumo de setas. Estos factores hicieron y continúan haciendo de éste producto un alimento un tanto elitista y dieron lugar a que el crecimiento de las empresas productoras de setas fuera prácticamente unilateral (Fernández, 2004).

También en la década del 80 del siglo pasado se comenzaron a emplear los hongos de pudrición blanca en la descontaminación de residuales, por su capacidad de degradar diversos compuestos de compleja estructura molecular, al tener un sistema enzimático ligninolítico extracelular de baja especificidad (Tien y Kirk, 1984). Este sistema lo componen **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. Dentro de este grupo fisiológico de hongos, es *Phanerochaete chrysosporium* la especie más estudiada (Higson, 1991).

Los basidiomicetos de pudrición blanca son los microorganismos ligninolíticos más eficientes de la naturaleza. Ellos poseen un mecanismo único que permite descomponer la lignina, mediante la producción de enzimas extracelulares. Además de lo anterior, *Pleurotus* ha sido intensamente estudiado por la gran importancia científica y práctica en la producción de setas y enzimas (Leonowicz y col., 2001; Ikehata y col., 2004).

### **Objeto de investigación.**

La producción de setas comestibles *Pleurotus spp.* es apropiada en todas las áreas del mundo que sean ricas en residuos lignocelulósicos como aserrín, pulpa de café, etc. y puede efectuarse en plantas rurales o locales cerrados. Por otra parte, el compostaje -el dificultoso paso preliminar necesario para el cultivo de los champiñones (*Agaricus*) y del hongo de la paja (*Lentinus*)- no es necesario para el cultivo de los hongos ostra (*Pleurotus*).

La producción de enzimas por *Pleurotus spp.* es motivo de investigación por diversos científicos del mundo, por ejemplo se refieren el impacto de los iones  $Mn^{2+}$  en la producción activa de manganeso peroxidasa, las propiedades catalíticas de la lacasa amarilla, la identificación de una nueva ribonucleasa y el incremento de la producción de lacasa y de xilanasas (Morais y col., 2005). Éste y otros estudios (Kachlishvili y col., 2005; Elisashvili y col., 2006; Stajic y col., 2006) señalan la necesidad de explorar no solamente más organismos sino también sustratos lignocelulósicos con diferentes composiciones para expresar y evaluar el potencial real de los hongos de producir

hidrolasas y oxidasas, por lo que la composición del sustrato de siembra debe ser optimizada para cada enzima a producir.

**Hipótesis.**

Es posible con el empleo de la fermentación en medio sólido, aprovechar la capacidad biotransformadora del basidiomiceto de pudrición blanca *Pleurotus* spp. crecido sobre pulpa de café y otros subproductos lignocelulósicos para mejorar la producción de setas comestibles y enzimas lacasas.

**Objetivo general.**

Demostrar la capacidad de *Pleurotus* spp. en la biotransformación de la pulpa de café para la producción de setas comestibles y enzimas lacasas mediante un sistema de fermentación en medio sólido.

**Objetivos específicos.**

1. Determinar las mejores cepas de *Pleurotus* spp. para la producción de setas comestibles sobre pulpa de café.
2. Evaluar la influencia de mezclas de sustratos en la productividad de las setas comestibles.
3. Estudiar la fisiología del género *Pleurotus* a través de su crecimiento vegetativo y fructificación sobre pulpa de café y mezclas de sustratos por fermentación en estado sólido.
4. Establecer un procedimiento tecnológico limpio de producción de setas comestibles *Pleurotus* que permita reducir los niveles de contaminación de pulpa de café sobre el medio ambiente.

5. Seleccionar una cepa de *Pleurotus* spp. productora de enzimas lacasas por fermentación en estado sólido de la pulpa de café.
6. Evaluar la biotransformación de fenoles totales, taninos condensados y cafeína de la pulpa de café por la cepa de *Pleurotus* spp. seleccionada.

La **novedad científica** de los resultados de esta investigación se valora por:

- El estudio que por primera vez se realiza en el mundo de la producción de la enzima lacasa durante la etapa de fructificación del *Pleurotus* spp. crecido sobre mezclas de sustratos lignocelulósicos mediante fermentación en estado sólido, observándose la influencia del contenido de nitrógeno del sustrato en la producción de la enzima.
- El estudio que por primera vez se realiza en el mundo de la fermentación natural de la pulpa de café para la producción de enzimas, sin inductor de ningún tipo, con columnas Raimbault y por basidiomicetos del género *Pleurotus* spp.
- El estudio que por primera vez se realiza en el mundo de la etapa vegetativa del hongo *Pleurotus* spp., empleando columnas Raimbault, relacionando el crecimiento micelial de éste con la producción de enzimas lacasas y la biotransformación de compuestos tóxicos.

Los **aportes** de esta investigación se valora por:

- La contribución al conocimiento de la tecnología de cultivo del llamado hongo ostra, *Pleurotus* spp., al seleccionar nuevas cepas productoras de setas y nuevas combinaciones de mezclas de sustratos lignocelulósicos, que a través de la fermentación natural elevan la productividad de las setas comestibles y disminuyen las pérdidas por contaminación del proceso tecnológico.

- La contribución al conocimiento de la fermentación en estado sólido a través del estudio cinético del crecimiento de *Pleurotus* spp. y de la biotransformación de los compuestos tóxicos presentes en la pulpa de café, aportando a las referencias existentes sobre este aspecto al demostrar la capacidad biotransformadora del género *Pleurotus* spp., sobre la disminución de la concentración de los fenoles totales y la cafeína de la pulpa de café.
- El aporte de nuevas cepas de *Pleurotus* spp. con actividad enzimática ligninolítica lacasa y biotransformadoras de procianidina B2 comercial (molécula modelo de tanino condensado), ya que los estudios anteriores se han desarrollado mayormente con el auxilio de los hongos filamentosos crecidos sobre sustratos inertes con enzimas dioxigenasas.

#### **Importancia teórica.**

Se aporta al desarrollo de la biotecnología ambiental e industrial al plantear el aprovechamiento de residuos agroindustriales con el empleo del basidiomiceto de pudrición blanca *Pleurotus* spp. a través de la fermentación sólida como técnica biotecnológica.

Al estudiar la cinética de producción de enzimas durante la etapa vegetativa se aporta al conocimiento de la fisiología del *Pleurotus* spp. a través de su crecimiento y fructificación sobre la pulpa de café por fermentación sólida.

#### **Importancia práctica y social.**

La implementación del procedimiento tecnológico limpio de producción de setas comestibles que permite la producción de alimento humano de alta calidad por su composición en proteínas, vitaminas y otros, además de producirse alimento animal y

bioabono. Esta tecnología es capaz de propiciar nuevas fuentes de empleo para la población, además de contribuir a su desarrollo económico al crear vías de financiamiento, brindar beneficios económicos, sociales y ambientales a las comunidades serranas y agrícolas de regiones cafetaleras y puede ser explotada en las ciudades por empresas que promuevan el uso y consumo de setas *Pleurotus*. La planta de Investigación-Producción del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente cuenta con permiso de comercialización, licencia sanitaria y marca del producto (Anexo 1). La importancia de estos resultados ha sido reconocida mundialmente, el CEBI pertenece a la Red Mundial de Hongos y a la Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo ([www.hongoscomestibles-latinoamerica.com](http://www.hongoscomestibles-latinoamerica.com)).

Los resultados que reúne la presente investigación se han presentado en más de diez eventos científicos y están incluidos en 15 artículos publicados en revistas nacionales e internacionales (ver Autobiografía). Estos han sido reconocidos como logro científico de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente (2002) y premio provincial (2001) y nacional (1998) del evento ECOJOVEN de las Brigadas Técnicas Juveniles. Recientemente, parte de los resultados aquí presentados se incluyeron dentro de los 50 resultados científicos de la provincia Santiago de Cuba.

### **Estructura de la tesis.**

El trabajo se presenta con la estructura en capítulos y contenido que se describe a continuación:

- Capítulo 1. Revisión bibliográfica de 25 páginas donde se detallan los antecedentes y el estado del arte de la presente investigación.

- Capítulo 2. Materiales y métodos de 20 páginas, se exponen los materiales y métodos empleados en esta investigación que permitieron obtener los resultados obtenidos.
- Capítulo 3. Resultados y discusión de 44 páginas, se muestran los resultados obtenidos en la producción de setas comestibles y enzimas lacasas, estos se discuten con diferentes referencias.

Al término del trabajo se presentan las conclusiones, las recomendaciones, los anexos y la autobibliografía.

## CAPITULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En este capítulo se presenta una panorámica del estado del arte de la investigación realizada, los antecedentes referidos en la literatura científica sobre la fermentación en estado sólido, el aprovechamiento de residuos agroindustriales, el empleo de los basidiomicetos de pudrición blanca para la biodegradación de sustratos lignocelulósicos, la producción de setas y enzimas ligninolíticas lacasas. Esta revisión bibliográfica permitió dirigir la investigación hacia las cuestiones novedosas para mejorar la producción de setas *Pleurotus* y enzimas lacasas.

### 1.1. Fermentación en Estado Sólido (FES).

La Fermentación en Estado Sólido es una tecnología que tuvo sus orígenes como un arte ancestral, los procesos tradicionales de FES fueron desarrollados en diversas partes del mundo desde hace mucho tiempo (Tabla 1). Originalmente, estos procesos consistían en la invasión por hongos de ciertos materiales sólidos que luego eran consumidos por las personas. El Koji y el Tempeh son ejemplos de FES tradicional asiática, los quesos Camembert y Roquefort son su contraparte europea. Actualmente, tanto en Asia como en Europa, los procesos de elaboración de dichos productos son prácticamente los mismos.

La diversidad de alimentos y bebidas preparadas utilizando la FES, en los países orientales, africanos y latinoamericanos aún no es muy bien conocida. En los últimos 25 años, se ha prestado gran interés en dilucidar los principios de esta tecnología y el por

qué se aplican cada vez más las FES en el mundo. Algunas de las respuestas pueden ser: las cepas microbianas usadas invaden rápidamente los sustratos sólidos y poseen la maquinaria metabólica necesaria para transformar moléculas bioquímicas complejas en compuestos nutricionalmente simples; dichas cepas microbianas trabajan en condiciones de bajo contenido de agua, lo que favorece que se inhiba el crecimiento de otros microorganismos tales como bacterias y levaduras.

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, las cuales son utilizadas por el hongo como nutrientes. Durante la fermentación el oxígeno es consumido y se producen  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , calor y productos bioquímicos de interés, lo que trae por consecuencia la aparición de gradientes dentro de la biopelícula, por ejemplo:

-difusión del  $\text{O}_2$  desde la zona gaseosa hasta las regiones más profundas de la biopelícula,

-difusión del  $\text{CO}_2$  desde la biopelícula hasta las regiones profundas hasta la zona gaseosa.

El calor desarrollado (Q) provoca un incremento de la temperatura (T) causando serios problemas durante la fermentación en estado sólido, este calor debe ser eliminado o removido del sustrato, no solo por conducción sino también por evaporación, siendo parte del complejo balance de agua en el sistema, este incluye el agua tomada por el micelio durante su crecimiento, el agua producida por las reacciones de hidrólisis y el

agua producida por la respiración. Otro factor importante es el pH, el cual cambia, debido a la liberación de los ácidos orgánicos y el intercambio de iones amonio. Los productos de interés son liberados dentro de la matriz sólida y deberán ser extraídos al final del proceso para uso posterior. Todos estos y otros fenómenos influyen fuertemente en la fermentación en estado sólido.

El desarrollo tecnológico actual ha permitido un control dinámico de los procesos de fermentación en estado sólido, empleándose el monitoreo por computadora, ayudando a comprender los procesos biológicos y físicos mencionados anteriormente y marcan el camino para la industrialización futura de estos procesos (Hölker y Lenz, 2005; Rahardjo y col., 2006).

En los últimos años, se han desarrollado nuevas aplicaciones de las FES en el control del medio ambiente, la industria y la agroindustria, lo que unido a las aplicaciones ya conocidas (Tabla 2), potencian esta tecnología contribuyendo a elevar nuestro nivel de vida.

### **1.1.1. Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido (FES) comparada con la fermentación sumergida (FS).**

La principal ventaja de la fermentación en estado sólido es permitir la obtención de alimento humano y alimento animal por bioconversión de residuos agrícolas.

Numerosos investigadores han comparado ambas fermentaciones, y casi todos coinciden en que para la producción de diferentes bioproductos, las FES están mejor adaptadas y son más baratas que las fermentaciones sumergidas (Viniegra-González y col., 2003; Pérez-Guerra y col., 2003; Pandey, 2003; Hölker y Lenz, 2005). Los sistemas FES ofrecen ventajas en cuanto a volúmenes, productos y menor generación de efluentes,

más detalles al respecto se muestran en la Tabla 3. Sin embargo, problemas como el diseño de un escalado, el control de variables de operación y de fermentación, la difusión de los productos a través del medio sólido y otros, contribuyen a incrementar las desventajas de las FES.

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

### **1.2. Biorreactores en la fermentación en estado sólido.**

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. 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).

Se abordarán dos biorreactores empleados en FES: a nivel de laboratorio e industrial, las bolsas de polietileno y a nivel de laboratorio, las columnas Raimbault.

### **1.2.1. 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, 2002). 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 (Mandeeel y col, 2005).

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, 2002).

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).

### **1.2.2. Columnas Raimbault.**

Descritas por primera vez por este investigador francés (Raimbault y Alazard, 1980) las columnas de vidrio son utilizadas durante las primeras fases de las investigaciones de FES por la cantidad de información que aportan sobre el proceso que se estudia. Numerosos investigadores han seguido los trabajos de FES con el dispositivo de fermentación aerobia de Raimbault (Roussos, 1985; Oriol y col., 1987; Dufour, 1990; Saucedo-Castañeda, 1991; Soccol, 1992; Trejo-Hernández y col., 1992; Gaime- Perraud, 1995; Brand y col., 2001; Aguilar y col., 2002; Hassouni y col., 2006) con el fin de seleccionar las cepas o sustratos adecuados, la composición del medio de cultivo y estudiar: crecimiento y fisiología de los microorganismos empleados; influencia de parámetros en los mecanismos de crecimiento; cinéticas de los parámetros principales de las FES (pH, temperatura, aireación, actividad del agua, etc.); la respiración del microorganismo y el CO<sub>2</sub> producido.

Estos autores plantean que al utilizar las columnas Rimbault se mantienen las condiciones óptimas de la fermentación sólida: una eficaz aireación y un desarrollo homogéneo del micelio dentro de todo el sustrato, además de ser baratas, sencillas y solo se necesitan condiciones asépticas.

### **1.3. Sustratos en fermentación en estado sólido.**

Retomando la definición de FES conocemos que 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. En esta investigación se fijará la atención en los primeros: sustrato húmedo que participa aportando nutrientes, y dentro estos, los subproductos agrícolas y agroindustriales.

La selección de un sustrato adecuado para la FES tiene dos aristas: una, que al sustrato disponible se le añade un valor, y la otra, producir un valor determinado a partir de un sustrato disponible (Pandey, 2003). Siguiendo este objetivo los sustratos empleados en la FES por lo general son de composición lignocelulósica, como se muestra en la Tabla 4, los residuos de cosechas y subproductos agroindustriales son algunos ejemplos (Soccol y Vandenberghe, 2003).

Dentro de los subproductos lignocelulósicos de origen agroindustrial utilizados como sustratos en la fermentación en estado sólido, con el fin de producir enzimas o biomasa y a la vez valorizar el subproducto se destacan: la pulpa de café (Martínez- Carrera col., 2000; Salmenes y col. 2005); la cáscara de café (Pandey y col., 2000; Fan y col., 2003); el bagazo de caña de azúcar (Klibansky y col., 1993); la paja de arroz (Sánchez y Royse, 2002) y la paja de trigo (Salmenes y col. 2005). Dentro de los pocos estudiados están el

aserrín de madera y las cáscaras de cacao y coco (Poppe, 2005; Rodríguez-Couto y Sanromán, 2005a)

En nuestro país, la caña de azúcar y sus residuos agroindustriales se utilizan en la producción de alimento animal enriquecido en proteína por FES. Se han obtenido alimentos como la Saccharina y el Bagarip, entre los más destacados, por sus aplicaciones como sustitutos parciales de alimentos tradicionales y como suplementos dietéticos en algunos animales (Julián y Ramos, 2007).

Los sustratos empleados en FES son heterogéneos, insolubles en agua y por su naturaleza compleja, ver Tabla 4, deben ser objeto de pretratamientos físicos y químicos, cuya finalidad es mejorar las características relacionadas con la porosidad del sustrato, su capacidad de retención de agua y nutrientes solubles y la capacidad de partículas de mantenerse libres y sin formar grumos, ocurriendo una mayor transferencia de masa a través del sustrato (Pérez-Guerra y col., 2003).

### **1.3.1. Pulpa de café.**

El cultivo del café está muy desarrollado en numerosos países tropicales, en plantaciones cuyo destino es la exportación. El café es uno de los principales productos de origen agrícola comercializados en los mercados internacionales. Es la segunda materia prima más comercializada en el mundo, sólo detrás del petróleo. Se estima que la producción mundial del año de cosecha 2008-2009 será de 127 millones de sacos (OIC, 2008). El mayor productor es, con mucha diferencia, Brasil, seguido por Vietnam (el productor más importante de *robusta*) y Colombia (Tabla 5). *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (*robusta*) son las dos variedades principales del género que se cultivan con fines comerciales.

Tradición y costumbre de consumo del café se respira en toda Cuba, donde la producción de café alcanzó las 8 200 toneladas (136 666 sacos) en la cosecha 2006-2007 y en la presente disminuyó un 46% con relación a la anterior (Menchaca, 2008). El cultivo del café en las zonas montañosas es el 85% del total que se cultiva en Cuba. El beneficio del café se realiza mayoritariamente por vía húmeda para garantizar un grano de mejor calidad; a diferencia nuestra, en Brasil el beneficio del café se realiza por vía seca, generando la cáscara de café (Pandey y col., 2000) que aunque presenta similitud en la composición química con la pulpa, difiere en el contenido de taninos y cafeína (Tabla 6).

Una posible causa de estas diferencias en la composición química de la pulpa y cáscara de café pudiera ser que, la primera pierde la mayoría de los azúcares y gran parte de la cafeína, compuestos fenólicos simples y otros compuestos solubles en agua, durante el beneficiado por vía húmeda (Ramírez-Martínez, 1999). Este va acompañado de la generación de subproductos: pulpa, mucílago, pergamino, jugo, agua de lavados, etc. Se demostró por Bermúdez y colaboradores (1999) que los subproductos que se generan no son utilizados y se vierten al medio sin el consiguiente tratamiento, lo cual provoca contaminación de aguas y suelos deteriorando el medio ambiente.

La pulpa de café representa el 40% del café que se despulpa. Por su composición química rica en azúcares, ella 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 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 (Bressani, 1979; Bermúdez y col., 1999; Roussos y col., 2000; Martínez-Carrera y col., 2000; Chang, 2007).

Pero la pulpa de café también contiene compuestos con efectos antifisiológicos como la cafeína y anti-nutricionales como los taninos y los poli-fenoles (Tabla 6). Estos deben ser eliminados o transformados si queremos aplicar las tecnologías antes mencionadas.

Hongos filamentosos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* producen enzimas capaces de degradar la cafeína de la pulpa de café, usándola como fuente de nitrógeno y energía por FES (Perraud-Gaime y col., 2000).

Ramírez-Coronel y colaboradores (2004) demuestran que el 97% de los fenoles totales de la pulpa de café son de tipo flavan-3-ol o ácidos hidroxycinámicos (Tabla 7) y que estos en la pulpa de café fresca y fermentada (3 días) son similares en su composición. Sin embargo, los taninos condensados son probablemente oxidados con el tiempo y no extraíbles con los métodos químicos utilizados.

Las publicaciones sobre degradación de taninos condensados y catequinas no sobrepasan las veinte, en el período 1980-2007, mientras que, las relacionadas con la degradación de fenoles simples y taninos hidrolizables están entre 130 y 150, para igual período. Se refiere la degradación de la catequina por bacterias (Arunachalam y col., 2003) y por *Penicillium commune* (Ramírez-Coronel, 2004), pero es escasa la información sobre la degradación de procianidinas por basidiomicetos.

Contreras-Domínguez y colaboradores (2006) reportan una cepa *Aspergillus fumigatus* capaz de crecer en medio sólido sobre taninos condensados similares a los presentes en la pulpa de café, un año después se refiere la degradación de las procianidinas B2 y B1

por enzimas dioxigenasas extracelulares producidas por este microorganismo (Contreras-Domínguez, 2007).

Investigadores de Francia, Brasil y México estudian los mecanismos enzimáticos de degradación de estos compuestos tóxicos y antinutricionales (cafeína y polifenoles) de la pulpa y cáscara del café, aprovechando la capacidad de los microorganismos, introduciendo recientemente los basidiomicetos (Brand y col., 2000; Fan y col., 2003; Salmones y col., 2005).

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

### **1.3.2. Otros subproductos agrícolas.**

Al igual que la pulpa de café, subproductos agrícolas como la viruta de madera y las cáscaras de cacao y coco son empleados como sustratos naturales en FES, reportándose fundamentalmente como materias primas para la producción de setas comestibles (Poppe, 2005) por su composición de lignina, celulosa, hemicelulosa y otros.

Actualmente no existe ningún tratamiento con estos subproductos y su disposición final en el terreno de cultivo, trae aparejado una descomposición, hasta que se fermenta espontáneamente. El monto de estos subproductos no se equipara con el de la pulpa de café, pero pudiera ser provechosa su valorización por FES.

### **1.4. *Pleurotus* spp.**

*Pleurotus* spp. es el nombre genérico de toda una gama de hongos saprofitos comestibles en los que se ha logrado imitar sus hábitos ecológicos naturales (troncos de árboles secos, generalmente pobres en nutrientes, ramas muertas, hojarasca, etc.) para

cultivarlos en sustratos lignocelulósicos diversos. Ellos constituyen alrededor de 50 especies, muy conocidas en el mundo entero, diversas tanto por sus colores, (amarillo, blanco, gris, marrón oscuro e inclusive rosado) como por sus formas, sabor o por sus exigencias técnicas (Sobal y col., 2007).

Este basidiomiceto ha sido muy estudiado por ser considerado productor de un alimento y de enzimas, además por ser biotransformador de sustratos lignocelulósicos (Salmones y col. 2005).

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, 2002, Quimio, 2005).

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 2).

El color puede variar desde gris claro a gris oscuro, azulado e incluso color café con leche o pardo, según la variedad y las épocas en que se desarrollen, también los hay de color amarillo (*Pleurotus cournocopiae*) y rosa (*Pleurotus d'jamour*).

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, 2002).

#### **1.4.1. Setas comestibles.**

El cultivo de especies de *Pleurotus* spp. sobre sustratos lignocelulósicos es buena alternativa para producir alimentos. Los hongos comestibles convierten los desechos agrícolas en alimentos por lo que es fuente de proteína barata. En la Tabla 8 se presentan

algunos ejemplos de sustratos que se han utilizado para el cultivo de *Pleurotus* spp. junto con los valores de eficiencia biológica (g setas frescas / g sustrato seco). La mayoría pueden ser producidos en un corto período de tiempo a bajo costo y en áreas reducidas. Además el desarrollo del cultivo de hongos a pequeña escala en países en desarrollo necesita una tecnología sencilla de condiciones poco sofisticadas. Después de cultivar el hongo y cosechar las setas, el sustrato remanente bioconvertido es aprovechable como abono orgánico, por su alto contenido en nitrógeno, fósforo y potasio (Tabla 9) (Sánchez y Royse, 2002; Vega y col., 2005; Rinker y col., 2005; López y col., 2008).

La pared celular de los tejidos vegetales está compuesta de celulosa, hemicelulosas y lignina difíciles de degradar y que solamente los hongos y las bacterias descomponen debido a que poseen enzimas que rompen tales moléculas y liberan a la celulosa y hemicelulosa de la lignina.

La lignina es el segundo polímero más abundante en la naturaleza (Crawford, 1981) constituida principalmente por unidades monoméricas fenilpropanoicas interconectadas por un enlace complejo covalente de carbono-carbono y carbono-oxígeno (Adler, 1997). Dada su compleja estructura polimérica, la lignina es muy estable bajo circunstancias naturales, consecuentemente con esto su biodegradación es una de las etapas limitantes en el ciclo del carbono (Morais y col., 2005).

En muchos países asiáticos y del hemisferio norte, el cultivo y recolección de setas comestibles es una agroindustria de gran desarrollo que no sólo genera divisas considerables sino que también absorben mano de obra durante todo el año. El desarrollo expansivo y tecnológico de este tipo de cultivo, se debe al aumento en el consumo, que sólo en los Estados Unidos y Europa se incrementa en un 12% todos los

años. La producción mundial de setas representa en la actualidad cerca de 3 millones de toneladas/año, dos de ellas corresponden a setas cultivadas (Chang, 2007). El crecimiento del sector es cercano al 5% por año.

En nuestro continente este cultivo sigue siendo poco conocido, su producción comercial es afectada como consecuencia de la falta de información, difusión y promoción, mientras que, en países europeos este cultivo ha llegado a constituir empresas enormes, con avances tecnológicos verdaderamente impresionantes, siendo actualmente España el país vanguardista tanto en la producción como en la transferencia de tecnología a muchos países (Chang, 2007).

En los Estados Unidos, los cultivos de setas comestibles data desde 1880 y en Canadá desde 1912. El cultivo de *Pleurotus* spp. en América Latina se inició en México central en 1933, por medio de una tecnología simple, seguido por Argentina (1941), Colombia (1950), Brasil (1951), Chile (1959), Guatemala (1960), Perú (1960) Ecuador (1967), Venezuela (1968), Costa Rica (1969) y Bolivia (1989).. En nuestro país, se inicia por el Instituto Cubano de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) en 1988 (Klibansky y col., 1993), empleando subproductos de la agroindustria cañera (paja de caña) con resultados altamente positivos. Esta tecnología fue transferida con éxito empleando los subproductos del café (Bermúdez y col., 1994).

Tras varios años de reinar en solitario, al champiñón se le vino a sumar un nuevo hongo cultivado como acompañante: el hongo ostra o setas del género *Pleurotus* spp., también conocido por gírgola en Argentina y oyster mushrooms, en inglés. Esta especie es de una gran versatilidad ya que soporta grandes variaciones térmicas, existen variedades resistentes a plagas y enfermedades y puede ser cultivada prácticamente sobre cualquier

sustrato lignocelulósico; sus propiedades organolépticas la hacen muy superior al champiñón, la calidad de su proteína, presencia de vitaminas, macro y microelementos, por lo que es considerada como un alimento saludable (Tabla 10).

Estas características permiten que esta seta pueda ser cultivada con poca tecnología disminuyendo considerablemente la inversión inicial y los costos operacionales, lo cual se ha traducido en una expansión rápida del cultivo en el mundo. Durante la última década se han realizado varias modificaciones a este cultivo, tendientes a aprovechar construcciones rurales, equipos provenientes de otras agroindustrias, desechos agroforestales más baratos, aumentar las productividades y acortar los tiempos de producción.

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, 2005; Kong, 2005).

Dentro de las ventajas que presenta este producto se pueden destacar que es sencillo de producir, en comparación con el champiñón y aun condiciones adversas siempre se obtienen fructificaciones (Sánchez y Royse, 2002). 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.

#### **1.4.1.1 Valor nutricional y medicinal de las setas comestibles.**

Las setas comestibles han sido tradicionalmente usadas en la alimentación y en la medicina oriental, recientemente se le presta atención por ser fuente de metabolitos de

interés nutriceútico y farmacéutico (por ejemplo: anti-tumorales, agentes inmunomoduladores e hipocolesterolámicos) y alimenticio como saborizantes. Se reporta que la mayoría de las setas contienen polisacáridos activos biológicamente, 660 especies de 182 géneros de setas contienen polisacáridos anti-tumorales e inmunoestimulantes (Chang, 2007).

Cabe mencionar, que existe un gran interés en la producción de este tipo de basidiomiceto ya que su valor nutricional es muy bueno (ver Tabla 10), 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, sobre todo de quitina, un polisacárido con propiedades excepcionales en cuanto a que puede absorber fácilmente las grasas en el tracto digestivo. Muchas empresas de productos naturistas y dietéticos comercializan la quitina y sus derivados como productos muy efectivos para evitar la obesidad ocasionada por la absorción de grasas. Las setas *Pleurotus* spp. también tienen una moderada cantidad de proteína de alta calidad, con todos los aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales, por lo que se podría clasificar las setas junto con las verduras más nutritivas y justo por debajo de las carnes (Quimio, 2005).

El cultivo de hongos reporta grandes ventajas por ser la forma más eficiente de conversión de desechos vegetales en alimento. El alimento obtenido es considerado una comida agradable debido a su textura y sabor, el residuo producido puede ser utilizado de numerosas formas tales como producción de biogás, mejoradores de suelo y lombricultura, representa un papel vital en la ecología del ciclo del carbono en la naturaleza.



#### **1.4.2. Hongo ligninolítico.**

Los hongos ligninolíticos constituyen un diverso grupo ecofisiológico comprendido mayoritariamente por basidiomicetos, capaces de producir una extensa depolimerización y mineralización aerobia de la lignina. Cuando la lignina alcanza una porción elevada en relación al resto de los componentes (alrededor del 20%) la resistencia a la degradación se extiende a la totalidad del material y solo algunos hongos basidiomicetos son capaces de iniciar el ataque. Dentro de estos hongos, Blanchette (1991) estableció varios grupos que se clasifican de acuerdo a su patrón de degradación y al polímero de la madera que degraden. De esta manera se definen:

i) Hongos de pudrición blanca: La degradación de la lignina incluye una serie de cambios oxidativos que conducen a la progresiva depolimerización y liberación de compuestos de bajo peso molecular, que son metabolizados en algunos casos hasta producir CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Reid y Seifert, 1982; Chen y Chang, 1985). Estos hongos atacan generalmente las maderas duras.

ii) Hongos de pudrición parda: Estos alteran la relación porcentual entre la lignina y los polisacáridos, de manera que, sin degradar la lignina producen la hidrólisis de los polisacáridos (Kirk y Farrell, 1987). Descomponen fundamentalmente la celulosa y la hemicelulosa de las maderas, observándose una limitada disminución en el contenido de lignina. La acumulación de esta da lugar a un color pardo, al que se debe su nombre. Estos hongos atacan generalmente las maderas blandas.

Los hongos de pudrición blanca son basidiomicetos y el único grupo de microorganismos capaces de degradar de todos los polímeros básicos de la madera, debido a la capacidad de sintetizar enzimas extracelulares relevantes como: hidrolíticas

(celulasas, hemicelulasas) y oxidativas (ligninolíticas). Ellas son responsables de la degradación de los mayores componentes del sustrato, dígase celulosa, hemicelulosa y lignina, a compuestos de bajo peso molecular, que pueden ser asimilados para la nutrición fúngica (Kachlishvili y col., 2005).

Los hongos de pudrición blanca secretan varias enzimas extracelulares oxidativas esenciales en la mineralización de lignina. El patrón de actividad de estas enzimas es específico del género y la especie del hongo, por lo que se pueden clasificar en tres grandes grupos según la producción de enzimas extracelulares de su sistema ligninolítico (Kerem y Hadar, 1998):

- Grupo productor de lignina peroxidasa–manganeso peroxidasa: En este grupo se ubica el hongo de pudrición blanca más estudiado, *Phanerochaete chrysosporium*, el que resulta un eficiente degradador de la lignina. Se encuentran otros hongos como son *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata* y *Bjerkandera adusta*, entre otros.
- Grupo productor de lignina peroxidasa–lacasa: Sólo dos hongos han sido descritos en este grupo: *Phlebia ochraceofulva* y *Junghuhuia separabilinia*, los cuales degradan pobremente la lignina a CO<sub>2</sub> por la ausencia de la enzima manganeso peroxidasa, aún a altas concentraciones de Mn<sup>2+</sup>.
- Grupo productor de lacasa–manganeso peroxidasa: Muchos de los hongos de pudrición blanca no producen aparentemente lignina peroxidasa, siendo esta la combinación enzimática más encontrada usualmente. Como ejemplos de este grupo tenemos el *Panus tigrinus*, *Lentinus tigrinus* y *Rigidosporus lignosus*, entre otros. Dentro de ellos se encuentran hongos comestibles como *Pleurotus ostreatus* y *Lentinus edodes*, que poseen además un sistema enzimático ligninolítico que

involucra a enzimas proveedoras de peróxido como la aril-alcohol oxidasa, llegando a conformar un grupo especial lacasa- aril-alcohol oxidasa.

Casi todas estas enzimas descritas anteriormente, son excretadas en más de una isoforma por diferentes taxa y condiciones de cultivo. Por lo que se requiere la selección de organismos adecuados para los propósitos que se desean y el estudio, tanto del patrón enzimático excretado por el microorganismo seleccionado como de las condiciones para su cultivo, para lograr aprovechar la maquinaria metabólica en una biotransformación eficiente de los componentes indeseables de un subproducto agroindustrial.

#### **1.4.3. Productor de enzimas ligninolíticas lacasas.**

Varios sustratos lignocelulósicos y hongos de pudrición blanca han sido usados exitosamente en FES para la producción de enzimas lignocelulósicas, demostrándose que el tipo sustrato lignocelulósico y su composición determinan el tipo y la cantidad de enzima producida por el basidiomiceto de pudrición blanca. Varias referencias indican que el método de fermentación del sustrato puede influenciar considerablemente en la producción de enzimas, demostrando que la FES de sustratos lignocelulósicos por algunos hongos, produce diferentes conjuntos de enzimas en comparación con los medios de cultivos sintéticos (Kachlishvili y col., 2005; Stajic y col., 2006).

Los basidiomicetos pueden producir una gran variedad de enzimas extracelulares, las cuales pueden degradar los materiales lignocelulósicos a compuestos solubles de baja masa molecular con un marcado valor nutricional. Los hongos de pudrición blanca son los más eficientes microorganismos ligninolíticos de la naturaleza, pues ellos poseen el único mecanismo que permite descomponer la lignina, mediante la producción de sus enzimas extracelulares que tienen la capacidad de generar radicales oxidativos (Evans y

col., 1994) Este sistema enzimático es no específico y puede descomponer una amplia variedad de compuestos de diferentes estructuras (Field y col. 1993). La descomposición es realizada por un complejo conjunto de enzimas (Kirk y Farrell, 1987): lignina peroxidasa (Kersten y col. 1990), lacasa (Thurston, 1994), xilanasas (Baiely y col., 1992),  $\beta$ -glucosidasa (Morais y col., 2002) y manganeso dependiente e independiente peroxidasa (Sarkar y col., 1997).

Por la gran importancia científica y práctica en la producción de enzimas, *Pleurotus ostreatus* ha sido intensamente estudiado. Se refieren recientemente el impacto de los iones  $Mn^{2+}$  en la producción activa de manganeso peroxidasa (Kamitsuji col., 2005), la propiedades catalíticas de la lacasa amarilla (Pozdnyakova y col., 2004), la identificación de una nueva ribonucleasa (Wang y Nig, 2004) y el incremento de la producción de lacasa (Hou y col., 2004) y de xilanasas (Qinnghe y col., 2004).

La lacasa (*p*-difenoil: dioxígeno: oxido-reductasa, EC 1.10.3.2), es una de las pocas enzimas que es objeto de investigación desde principios del siglo XIX (Ikehata y col., 2004), es una multicobre azul oxidasa que cataliza la oxidación unielectrónica de *orto* y *para* difenoles y aminas aromáticas, por remoción de un electrón y un protón de un grupo hidroxilo para formar un radical libre. Esta puede, además, catalizar la ruptura alquil-fenil y  $C_{\alpha}C_{\beta}$  de dímeros fenólicos de la lignina y la demetoxilación de muchos compuestos modelos de la lignina (Leonowicz y col., 2001; Palmieri y col., 1997).

La lacasa de hongo, como parte del sistema de enzima ligninolítico, es producida por casi todos los basidiomicetos transformadores de maderas y basuras (Leonowicz y col., 2001). Este grupo de oxidasas azules extracelulares N-glicosilada con tamaño de 60-390 kDa; catalizan la oxidación de una cantidad de donadores de hidrógeno aromático, con

una reducción concomitante del oxígeno y del agua a pesar de oxidar ácidos fenólicos y metoxifenólicos. Varios sustratos han sido usados para la determinación de esta enzima, tales como el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS), el guayacol (orto-metoxifenol), dimetoxifenol y la siringaldazina. El sustrato artificial de la lacasa, ABTS, es el más comúnmente empleado para la determinación de la actividad debido a su alta afinidad, pero requiere de un pH ácido (pH=3) para su uso, siendo estable para un rango estrecho del mismo (Palmieri y col., 1997), éste puede actuar como mediador, permitiendo la oxidación de compuestos modelos de la lignina no fenólicos que por su estructura no son sustratos en particular de la lacasa.

Otros trabajos describen ensayos cualitativos usando guayacol, para la clasificación de distintos géneros de hongos de pudrición blanca (Pinzón y Ruiz, 2004); por lo que los resultados obtenidos potencian la utilización de este sustrato para evaluar la capacidad ligninolítica de los hongos de pudrición blanca que pertenecen al grupo lacasa-manganeso peroxidasa.

Se conoce que en los mecanismos ligninolíticos de *Pleurotus* spp., la enzima lacasa juega un papel importante en la biodegradación de compuestos fenólicos y aminas aromáticas (Ikehata y col., 2004).

Los estudios realizados con *Pleurotus* spp. se dirigen hacia la producción de esta enzima extracelular empleando cultivos líquidos (Palmieri y col., 2000) y hacia su purificación y caracterización (Giardina y col. 1999; Marques de Souza y Peralta, 2003) siendo escasos los estudios de la producción de esta enzima por FES.

Se refieren *Pleurotus ostreatus* sobre la mezcla bagazo de caña de azúcar y paja de trigo suplementado con alcohol veratrílico (Sugimoto y col., 2001) y *Pleurotus pulmonarius*

sobre paja de trigo (Marques de Souza y col., 2002) como productores de lacasa por FES. Recientemente están los trabajos de Mata y colaboradores (2005) con *Pleurotus* spp. como productor de lacasa en pulpa de café. También con *Pleurotus spp.*, pero como biodegradador del color del líquido residual de la pasteurización de la pulpa de café mediante lacasa y sus isoformas (Rodríguez, 2006; Rodríguez y col., 2008).

En los hongos de pudrición blanca, las lacasas son típicamente producidas en múltiples isoformas dependiendo de la especie de hongos y las condiciones ambientales. Se conocen en *Pleurotus ostreatus*, tres isoformas, las cuales han sido identificadas, purificadas y caracterizadas (Palmieri y col., 1997; 2000; 2003). Por su parte Marques de Souza y colaboradores (2004) detectaron también, tres isoformas en *P. pulmonarius*, al igual que Muñoz y colaboradores (1997) con *P. eryngii*. Las isoenzimas detectadas manifestaron diferencias en sus eficiencias catalíticas y especificidad de sustratos, lo que puede resultar en un amplio rango de actividad *in vivo* por la lacasa, lo que aún queda sin esclarecer es si esta multiplicidad se corresponde con una diferenciación real de funciones.

#### **1.4.3.1 Aplicaciones potenciales de las lacasas en biotecnología.**

Esta enzima inmovilizada ha sido empleada para la detoxificación de compuestos fenólicos en vinos (Kersten y col., 1990) y para mejorar la producción de etanol de materia prima renovable. También un nuevo método enzimático basado en la lacasa se ha desarrollado para la diferenciación de morfina de la codeína, simultáneamente en muestra de droga, inyectado en un sistema de detección de flujo.

Se tienen antecedentes de la biodegradación de las melanoidinas o polifenoles presentes en residuales líquidos coloreados como la vinaza de destilería y el residual de la

pasteurización de la pulpa de café; por parte de *Pleurotus spp.* en cultivos líquidos, mediado por lacasas (Martirani y col., 1996; Dahiya y col., 2001; Rodríguez, 2006; Rodríguez y col., 2008).

Un biosensor de pasta de carbono con un extracto bruto enzimático modificado de *Pleurotus ostreatus* como fuente de lacasa, esta propuesto para la determinación de catecolamina en formulaciones farmacéuticas. Otra aplicación de la lacasa como biosensor es el electrodo con enzimas inmovilizadas para medir el contenido de fenoles de muestras acuosas (Zouari y col., 1994) y de forma más específica, para la determinación en jugos de frutas, té, y otras bebidas (Cliffé y col., 1994; Yaropolov y col., 1994). Lacasas de plantas han sido usadas como biosensores para medir oxígeno en fase gaseosa, también se ha empleado como un sustituyente de la peroxidasa de rábano (Kersten y col., 1990) en los inmunoensayos enzimáticos, por ser más sensible y simple su uso como marcador, ya que la peroxidasa de rábano exhibe un amplio espectro de tinción y forma ocasionalmente complejos no productivos con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Este capítulo nos permitió conocer la importancia del *Pleurotus spp.* como organismo biológico que produce alimentos y enzimas lacasas, con capacidad de crecer sobre sustratos lignocelulósicos empleando la biotécnica de la fermentación sólida. También se puede concluir que la pulpa de café es un subproducto lignocelulósico con potencialidades para su aprovechamiento mediante la fermentación en estado sólido empleando el basidiomiceto de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus*.

Conociendo estos elementos, se realiza un diseño de la investigación para demostrar la capacidad de *Pleurotus* de producir setas y enzimas lacasas, conllevando además, la de biodegradar la pulpa de café.

## **CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.**

A continuación se detallan los materiales y los métodos empleados en la investigación, las metodologías y tareas realizadas para cumplimentar el objetivo propuesto, así como las técnicas analíticas utilizadas.

La producción de setas comestibles y enzimas depende de tres factores fundamentales: cepa, sustrato y condiciones de producción. El diseño experimental empleado en la obtención de setas incluyó estas variables y en la producción de enzimas se estudió la etapa de crecimiento vegetativa o colonización del sustrato por el *Pleurotus*, por ser la fase crítica que limita la fermentación en estado sólido.

### **2.1. Diseño experimental.**

Para la producción de setas comestibles, la unidad experimental (biorreactor) fue la bolsa de polietileno transparente y las respuestas a obtener fueron: observaciones del crecimiento y la fructificación, producción de setas, rendimiento, eficiencia biológica, tasa de producción, características de las setas, actividad enzimática ligninolítica del sustrato remanente, bioconversión, etc.

Para la producción de enzimas lacasas, la unidad experimental (biorreactor) fue la columna Raimbault y las respuestas a obtener fueron: biomasa micelial, actividad lacasa, biodegradación de compuestos tóxicos: cafeína, fenoles totales y taninos condensados.

El diseño experimental se detalla en la Tabla 11.



## 2.2. Cepas de *Pleurotus* spp.

Nueve cepas de *Pleurotus* spp. fueron estudiadas, ocho pertenecientes a la colección de cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Cuba y una, a la Colección de Recursos Genéticos del Colegio de Posgraduados de Puebla, México. Las cepas fueron conservadas en agar papa dextrosa y se incubaron a 25°C. A continuación se refieren (Índice Fungorum):

<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	CCEBI 3021
<i>Pleurotus ostreatus</i>	CCEBI 3022
<i>Pleurotus ostreatus</i>	CCEBI 3023
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Florida)	CCEBI 3024
<i>Pleurotus ostreatus</i>	CCEBI 3025
<i>Pleurotus ostreatus</i>	CCEBI 3026
<i>Pleurotus sajor-caju</i> (Fr.)Singer	CCEBI 3027
<i>Pleurotus ostreatus</i>	CCEBI 3073
<i>Pleurotus ostreatus</i>	MC50

## 2.3. Producción de setas comestibles.

La producción de setas comestibles se realizó en la planta de investigación-producción del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente, esta planta cuenta con temperatura controlada mediante equipo de climatización, humedad relativa del aire controlada a través de riego por aspersión e iluminación focalizada por luces fluorescentes en el techo y paredes de la planta.

También se realizó la producción de setas comestibles en una planta rural, instalada en una construcción soterrada (refugio) de la Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao (ECICC), ubicada en el macizo montañoso Sierra Maestra, en el municipio III Frente, a unos 450 metros sobre el nivel del mar. Esta planta cuenta con temperatura variable según las horas del día y las estaciones del año, humedad relativa del aire controlada a través de riego por aspersión e iluminación focalizada por luces fluorescentes en el techo y paredes de la planta.

La metodología de trabajo se describe según la figura 3.

### **2.3.1. Preparación del inóculo.**

Los inóculos se prepararon esterilizando granos de trigo (*Triticum aestivum L.*) (50% de humedad) durante 1h a 121°C en frascos de vidrio de boca ancha (omnia); posteriormente se inocularon con las cepas y se incubaron a 30°C durante 15 días (Guzmán y col. 1993).

### **2.3.2. Preparación de sustratos puros y las mezclas.**

Pulpa de café (*Coffea arabica L.*) procedente del centro de beneficio húmedo “El Ramón” en el municipio Santiago de Cuba, secada al sol, molida y tamizada (entre 0,8 y 2 mm).

Pulpa de café (*Coffea canephora* variedad robusta) procedente del centro de beneficio húmedo “La Mandarina” en el municipio III Frente de la provincia de Santiago de Cuba, secada al sol y almacenada hasta su posterior utilización.

Cáscaras de cacao (*Theobroma cacao L.*) procedente del cacaotal de la finca “La Mandarina” en el municipio III Frente de la provincia de Santiago de Cuba, secadas al sol, molidas y tamizadas (fracciones entre 1,25 y 4 mm y mayor 4 mm).

Cáscaras de coco (*Cocos nucifera*, Lin.), procedente de la zona de El Cristo en la provincia Santiago de Cuba, secadas al sol y trituradas (fracción mayor de 3cm).

Viruta de cedro (*Teona ciliata* Roem) o cedro de Himalaya, procedente de la carpintería de la Universidad de Oriente.

Aflecho o residuo seco natural, consiste en una mezcla de pulpa, pergamino y mucílago, procedente del beneficiado seco del grano de café de la región de III Frente.

Los sustratos se hidrataron por inmersión en agua durante 12 horas, se pasteurizaron durante una hora a  $75\pm 5^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se escurrieron hasta alcanzar 70-75% de humedad.

Se realizó el estudio sobre los sustratos puros y sus formulaciones binarias, según se expone en la Tabla 12.

### **2.3.3. Fermentación en bolsas de polietileno.**

Luego de escurridos los sustratos se mezclaron con el inóculo, a razón de 10% con base en el peso húmedo del sustrato, se colocaron en bolsas de polietileno transparentes de tamaño variable según el experimento a seguir y se ubicaron en estantes dentro del cuarto de colonización. Se prepararon tres réplicas por cada cepa y por cada sustrato o formulación estudiada.

Al tercer día de colocadas las bolsas en los estantes, se les realizaron perforaciones 1 cm de diámetro separados por 8 cm cada una.

Una vez colonizado el sustrato y para estimular la aparición de los primordios y luego el desarrollo de los cuerpos fructíferos, las bolsas se trasladaron al cuarto de fructificación bajo las siguientes condiciones:

- Humedad del aire:  $90 \pm 5\%$ , se logró mediante la nebulización con un dispositivo de riego por aspersión.
- Temperatura:  $23 \pm 2^\circ\text{C}$
- Iluminación: Se requiere de más de 400 lux, en fotoperíodos de 12 horas/día, se logró con lámparas fluorescentes colocadas en el techo y paredes del local.
- Ventilación: Es decisivo eliminar el  $\text{CO}_2$  producido durante la respiración del hongo, se logró mediante un extractor de aire, removiendo el aire 2 o 3 veces al día.

Los dos últimos parámetros también fueron aplicados en la planta rural.

#### **2.3.4. Muestreo y control de la producción de setas comestibles.**

Cada bolsa constituye una muestra. Se registraron las observaciones sobre el crecimiento del micelio, las posibles e indeseables apariciones de contaminantes, el tiempo de colonización, el día de aparición de los primordios (precocidad), las cosechas producidas, los tiempos de fructificación y de producción y el peso del sustrato remanente.

Para cada bolsa se llenó un formulario con los datos de la producción, luego se calcularon los siguientes parámetros de control: producción de setas comestibles, eficiencia biológica, rendimiento y tasa de producción.

##### **2.3.4.1. Precocidad.**

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.

##### **2.3.4.2. Producción.**

Los elementos de entrada y salida para el balance de masa, durante la producción de setas en las bolsas de polietileno se presentan en la Figura 4.

Para la fase biótica:  $X_1 + R \cdot S_1 + R \cdot S_2 = X_2$ , en donde (1)

$S_1$  = Sustrato en el inóculo (g)

$S_2$  = Sustrato para fructificación (g)

$X_1$  = Biomasa del inóculo (g)

$X_2$  = Biomasa producida (g)

R = Rendimiento biomasa/sustrato.

$X_2$  es el total de biomasa: micelio ( $X_m$ ) + setas obtenidas ( $X_3$ )

Como  $S_1 \ll S_2$  y  $X_1 \ll X_2$  el rendimiento puede calcularse como:  $R = X_2/S_2$

Para la producción de setas comestibles se estima que  $X_m \ll X_3$

Una vez cosechadas las setas, se eliminaron restos de sustratos y se pesaron en balanza técnica (OWA-LABOR).

Producción promedio por bolsas: Definida como peso total de las setas frescas cosechadas entre el número de bolsas que produjeron.

#### **2.3.4.3. Eficiencia biológica.**

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

$$EB = (\text{peso de las setas frescas} / \text{peso del sustrato seco}) \times 100 \quad (2)$$

#### **2.3.4.4. Rendimiento.**

Rendimiento (R): Definido como la relación en porciento entre el peso fresco de las setas y el peso del sustrato húmedo.

$$R = (\text{peso de las setas frescas} / \text{peso del sustrato húmedo}) \times 100 \quad R = (X_3/S_2) \times 100 \quad (3)$$

Según establece esta tecnología los rendimientos deben ser superiores al 10% y la eficiencia biológica debe alcanzar valores entre 40-50%, lo cual determina que sea

factible económicamente la fermentación en estado sólido (Tschierpe y Hartmann, 1977, Prata y Pani, 1995).

#### **2.3.4.5. Tasa de producción.**

Tasa de producción (TP): Definida como la relación en porcentaje entre la eficiencia biológica y los días transcurridos desde la siembra hasta el último día de producción (Sánchez y Royse, 2002).

$$TP = (EB / \text{tiempo desde la siembra hasta el último día de producción}) \times 100 \quad (4)$$

#### **2.3.4.6. Bioconversión.**

Volviendo a la figura 4 y realizando balance de masa global del sistema se tiene:

Sustrato ( $S_2$ ) + Inóculo ( $S_1, X_1$ ) + Agua +  $O_2$  = Biomasa ( $X_2$ ) + Sustrato remanente ( $S_3$ )  
+  $CO_2$  + Agua residual

Donde se hicieron las siguientes consideraciones (Sánchez y Royse, 2002):

- la cantidad de inóculo ( $S_1, X_1$ ) es el 10% del sustrato ( $S_2$ ),
- la biomasa ( $X_2$ ) son las setas obtenidas,
- el agua y el  $O_2$  de entrada son tomados por el hongo para su crecimiento,
- el  $CO_2$  y el agua residual, son obtenidas por cálculo, al ser difícil su determinación.

La bioconversión se analizó mediante:

$$\text{Sustrato} = \text{Setas obtenidas} + \text{Sustrato remanente } (S_3) + CO_2 + \text{Agua residual.} \quad (5)$$

#### **2.3.5. Características de las setas comestibles.**

Se evaluaron algunas características de las fructificaciones obtenidas por los aspectos morfológicos: color y textura; tamaño de los cuerpos fructíferos, contenido de proteína bruta y ácidos nucleicos.

#### **2.3.5.1. Tamaño de los cuerpos fructíferos.**

Se midió el diámetro de todos los cuerpos fructíferos cosechados y se promediaron.

#### **2.3.5.2. Determinación de proteína bruta.**

Se determinó a partir del nitrógeno total por el método de Kjeldahl (NC: 86-05:1984).

#### **2.3.5.3. Determinación de ácidos nucleicos.**

Se determinó espectrofotométricamente por el procedimiento de Rut (1973) referido por Otero (1985).

#### **2.3.6. Determinación cuantitativa de la actividad enzimática ligninolítica del sustrato remanente.**

El sustrato remanente fue sometido a extracción sobre hielo con tampones para la determinación de las actividades enzimáticas lacasa, manganeso peroxidasa y versátil peroxidasa. La extracción se realizó siguiendo el procedimiento siguiente: a 3 g de muestra se le añadieron 50 mL de: tampón fosfato de sodio (para la determinación de lacasa) o tampón acetato de sodio (para la determinación de manganeso peroxidasa y versátil peroxidasa) se mezcló y se colocó en zaranda a 70 rpm durante una hora, se filtró y el sobrenadante se centrifugó 10 minutos a 4 000 rpm.

Las tres actividades enzimáticas se midieron a 30°C, se emplearon 100 µL de sobrenadantes, para un volumen final de ensayo de un mililitro. La unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 µmol de producto en un minuto.

La actividad lacasa se determinó por la oxidación del guayacol ( $\epsilon_0 = 6\,740\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) a 470nm en una mezcla de reacción que contiene 10 mmol L<sup>-1</sup> de guayacol en 0,1 mol L<sup>-1</sup>

de tampón fosfato de sodio pH 6, para un volumen final de reacción de 1mL (Marques de Souza y Peralta, 2003).

Para medir la actividad manganeso peroxidasa se siguió el método de Pick y Keisare (1980) con algunas modificaciones (Rodríguez, 2006). Se utilizó el *p*-dimetoxifenol, donde los componentes de la mezcla de reacción fueron 0,2 mmol L<sup>-1</sup> de éste, 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>, 0,05 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el tampón malonato de sodio a un valor de pH 4,5. El incremento de absorbancia se midió a 477nm ( $\epsilon_0=14\ 800\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

La actividad versátil peroxidasa, también llamada peroxidasa independiente de manganeso, fue ensayada usando las mismas condiciones que para determinar la actividad manganeso peroxidasa, pero en ausencia de MnSO<sub>4</sub>.

#### **2.4. Producción de enzimas lacasas.**

La producción de enzimas lacasas, se realizó en los laboratorios del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente y en el laboratorio BioTrans de la Facultad de Ciencias y Tecnología Paul Cézanne en la Universidad de Marsella. El sustrato empleado fue pulpa de café (*Coffea arabica L.*).

En ambos laboratorios, los instrumentos y equipos utilizados están certificados por las Oficinas de Normalización correspondientes.

##### **2.4.1. Estudio sobre diferentes medios de cultivo agarizados.**

Se emplearon dos medios de cultivo agarizados convencionales: agar papa dextrosa (SIGMA) y agar extracto de malta (BIOCEN) y dos medios de cultivo agarizados naturales: extracto pulpa de café con glucosa y extracto pulpa café sin glucosa.



Los medios naturales se prepararon por cocción durante 20 minutos de la pulpa de café molida (fracción menor de 0,7mm) ( $200 \text{ g L}^{-1}$ ) en agua destilada, filtrado, centrifugado 20 minutos a 4 000 rpm y completados con agua destilada hasta un litro. Se adicionó agar ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ) y glucosa ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ).

Los medios fueron esterilizados a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

#### **2.4.1.1. Evaluación cualitativa de la actividad enzimática lacasa.**

Se determinó empleando el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS)  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  en tampón fosfato citrato. Se añadieron dos gotas de ABTS sobre el micelio de *Pleurotus* spp. de 7-10 días, una en el centro y otra en el lateral de la placa, el cambio de coloración de la gota a un verde azul intenso cuando transcurren cinco minutos, indicó la presencia de enzima lacasa. El ensayo se realizó a pH 3,  $30^{\circ}\text{C}$  (Velázquez-Cedeño, 2005).

#### **2.4.2. Preparación del inóculo.**

Los inóculos se prepararon esterilizando granos de trigo (*Triticum aestivum* L.) durante una hora a  $121^{\circ}\text{C}$  en placas Petri de 9cm, conteniendo 30g de trigo previamente remojados (50% de humedad), posteriormente se inocularon con las cepas en estudio y se incubaron a  $25^{\circ}\text{C}$  durante diez días (Guzmán y col., 1993).

#### **2.4.3. Preparación de la pulpa de café.**

La pulpa de café luego de molida y tamizada (entre 0,8 y 2 mm) se mezcló con agua hasta lograr 65-67% de humedad, se esterilizó 20 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ . Se colocó en flujo laminar y se inoculó (10% peso/peso) con el micelio de las cepas crecidos en granos de trigo.

#### **2.4.4. Fermentación en estado sólido en columnas Raimbault.**

Los biorreactores consistieron en columnas de vidrio descritas por Raimbault y Alazard (1980) (Figura 5), que contenían la pulpa de café con 67% de humedad, se colocaron sobre los humidificadores y se introdujeron dentro del baño termostatado (Figura 6), bajo las siguientes condiciones: temperatura:  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , flujo de aire para cada columna:  $2\text{mL min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de sustrato seco (Gaime- Perraud, 1995) y 10% (peso/peso) de inóculo. Se trabajó a dos escalas de fermentación: pequeña (30g) y media (150g).

Cada columna funciona independientemente, permitiendo retirar las mismas para tomar las muestras sin desestabilizar el resto del dispositivo. Se llevó la fermentación hasta los siete días en todas las escalas de fermentación.

#### **2.4.5. Fermentación en estado sólido en columnas de 0,75 kg.**

Se utilizó columna de vidrio (Figura 7). Las condiciones fermentación fueron las mismas de las escalas pequeña y media. Los parámetros de diseño y operación de todas las escalas de fermentación se detallan en la Tabla 13. Se midió la temperatura en el centro de la columna y la del local se mantuvo en  $25^\circ\text{C}$ .

#### **2.4.6. Muestreo y control de la producción de enzimas lacasas.**

A diferencia de la fermentación sumergida, la toma de muestras durante una fermentación sólida es complicada. Se definió una columna completa para un tiempo de fermentación dado.

Se estudiaron por cepa, cada 24 horas, durante siete días, los siguientes parámetros: humedad, pérdida de peso, biomasa micelial, pH, carbohidratos totales solubles, azúcares reductores, proteínas solubles, actividad enzimática lacasa, actividad

enzimática degradadora de procianidina B2, cafeína, fenoles totales y taninos condensados. Se realizó el tratamiento descrito en la Figura 8.

Para las escalas de fermentación pequeña y media se tomó todo el contenido de una columna por día, para la columna de 0,75 kg solo se tomó la muestra inicial y la final (después de 7 días de fermentación), (todas por duplicado para cada determinación):

[a] determinación de humedad, pérdida de peso y análisis de cafeína,

[b] determinación de biomasa micelial,

[c] extracción sobre hielo y con agua destilada a 4°C (a los extractos obtenidos se les denominó “crudo enzimático”) para determinación del pH, carbohidratos totales solubles, azúcares reductores, proteínas solubles, determinación cuantitativa de la actividad enzimática lacasa y determinación de la actividad enzimática degradadora de procianidina B2.

[d] liofilización y molido antes de la medición de compuestos tóxicos: fenoles totales y taninos condensados.

## **2.5. Determinaciones analíticas.**

### **2.5.1. Determinación cuantitativa de la actividad enzimática lacasa.**

Se utilizó el mismo sustrato que en la determinación cualitativa de la actividad enzimática lacasa, ABTS (Palmieri y col., 1997). La mezcla de ensayo fue: ABTS 2mmol L<sup>-1</sup> en tampón citrato de sodio 0,1mol L<sup>-1</sup> (pH 3, 30°C). La oxidación del ABTS se siguió a través del incremento de la absorbancia a 420 nm ( $\epsilon_0=36\ 000\ M^{-1}cm^{-1}$ ). La actividad enzimática se expresó en U/gramo de sustrato seco y se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1  $\mu$ mol de ABTS oxidado, en un minuto bajo las condiciones especificadas.

### **2.5.2 Determinación del pH.**

Los valores de pH se determinaron utilizando un pH-metro digital, según lo establecido en el Standard Method (APHA, 1998).

### **2.5.3. Determinación del porcentaje de humedad.**

Para cada columna se tomó aproximadamente el 10% de su contenido (sustrato húmedo) y se llevó al analizador de humedad electrónico SARTORIUS MA45 para conocer: peso seco, humedad y materia seca de las muestras.

### **2.5.4. Determinación del porcentaje de pérdida de peso.**

Se calculó por la diferencia de pesos de las columnas entre el día inicial (tiempo cero) y un día dado (tiempo t).

### **2.5.5. Determinación de carbohidratos totales solubles.**

Se empleó el método del fenol sulfúrico (Dubois y col., 1956) utilizando una solución de glucosa de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  como patrón.

### **2.5.6. Determinación de azúcares reductores.**

Los azúcares reductores se determinaron por el método de Miller (1959) utilizando una solución de glucosa de  $1\text{g L}^{-1}$  como patrón.

### **2.5.7. Determinación de biomasa micelial.**

La biomasa micelial se determinó indirectamente a partir del contenido de proteínas (Bradford, 1976), primeramente las proteínas fueron hidrolizadas con ácido fosfórico  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,5M (Córdova-López y col., 1996). Se realizó curva patrón de biomasa con el micelio de *Pleurotus* spp. crecido sobre medio de cultivo agarizado natural.

### **2.5.8. Determinación de proteínas solubles.**

La cantidad de proteína se determinó utilizando albúmina de suero bovino como patrón (Bradford, 1976). A los crudos enzimáticos se añadió el reactivo de Bradford (Bio-Rad Laboratorios, Hércules, California) se agitó vigorosamente y después de cinco minutos se leyó la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro (UVmini-1240 SHIMADZU).

### **2.5.9. Determinación de compuestos tóxicos.**

#### **2.5.9.1. Determinación de fenoles totales.**

Se determinó con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Barlocher y Graca, 2005). La extracción de los compuestos fenólicos se realizó siguiendo el procedimiento siguiente: a 100mg de muestra liofilizada y molida (fracción menor de 0,5mm) se le añadieron 5mL de acetona al 70%, se dejó reposar durante una hora a 4°C y se centrifugó a 5 000 rpm, 20 minutos.

Se tomó 0,5 mL de sobrenadante y se llevó a 1 mL con agua destilada, se añadió 5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% en NaOH 0,1N y se mezcló, luego de 5 minutos se añadió 0,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y se volvió a mezclar. Se dejó en reposo a la oscuridad durante 120 minutos, posteriormente se leyó la absorbancia a 760 nm. Se determinó la concentración de fenoles totales según curva de calibración de ácido tánico y se expresó en mg/gramo de sustrato seco.

#### **2.5.9.2. Determinación de taninos condensados (Proantocianidinas totales).**

Se obtuvieron por extracción con metanol-agua 50% (v/v) (Gessner y Steiner, 2005). La extracción de los taninos condensados se realizó por el procedimiento siguiente: a 100mg de muestra liofilizada y molida (fracción menor de 0,5mm) se le añadieron 2 mL

de metanol-agua 50% (v/v) se mezcló y se colocó en zaranda 70 rpm durante 30 minutos.

Se tomó 250  $\mu$ L de sobrenadante y se introdujeron en un tubo de vidrio con tapa rosca de 10 mL, se añadió 3,5 mL de la mezcla Butanol-HCl, se tapó y se incubó a 95°C en baño de agua durante una hora, luego el tubo fue enfriado durante 15 minutos a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia a 550 nm. Se determinó la concentración de taninos condensados según curva de calibración del dímero de procianidina B2 comercial [(-)-epicatequina-4 $\beta$ -8]-(-)-epicatequina] (Lyon, Francia) y se expresó en  $\mu$ g / gramo de sustrato seco.

### **2.5.9.3. Determinación de cafeína.**

Se determinó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC, siglas en inglés) (Kreiser y Martin, 1978), luego de extracción con agua caliente, se siguió el procedimiento siguiente: a 100 mg de muestra liofilizada y molida (fracción menor de 0,5mm) se le añadió 1,5 mL de agua destilada caliente (90 $\pm$ 5°C) se homogenizó en rotor durante unos segundos, se colocó en baño de María en ebullición por espacio de 5 minutos, se dejó refrescar y decantar durante 10 minutos, una vez refrescada la muestra se tomó 0,5 mL de sobrenadante y se centrifugó a 14 000 rpm, 5 minutos. Antes de inyectar la muestra en la columna cromatográfica, se filtró usando filtro Millipore 0,45  $\mu$ m.

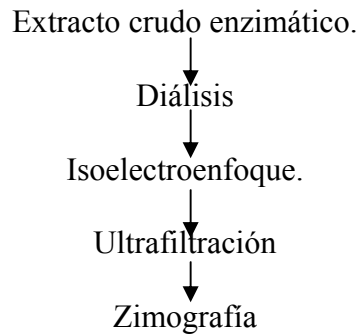
Las condiciones de la cromatografía fueron: columna Zorbax Eclipse XDC-C18 (5  $\mu$ m, 4,6 x 150mm) de fase reversa, como fase móvil se empleó acetonitrilo (SIGMA, grado HPLC) 10% isocrático, con un flujo de 2 mL min<sup>-1</sup>, se inyectó 20  $\mu$ L de muestra y la detección se hizo a 280 nm.

Se realizó una curva estándar de referencia con cafeína anhidra comercial (SIGMA), con la cual se relacionó el área resultante de cafeína y su concentración. El tiempo de retención del pico de cafeína se obtuvo entre 2,7 min y 3,3 min.

La concentración de cafeína se expresó en  $\text{mg g}^{-1}$  de sustrato seco.

## **2.6. Técnicas de purificación y caracterización de las lacasas del crudo enzimático.**

Para la purificación y caracterización parcial del crudo enzimático (aproximadamente 80mL), conteniendo la lacasa extracelular, se siguió la metodología siguiente:



### **2.6.1. Diálisis.**

Se realizó diálisis del extracto enzimático con el fin de eliminar sales procedentes del medio de cultivo, se utilizó una membrana SIGMA con un valor de corte de 12-14000Da. La muestra a dializar se introduce en la membrana y se sumerge en dos litros de agua desionizada a 4°C durante la noche.

### **2.6.2. Isoelectroenfoque.**

El equipo llamado Rotofor cell (Rotofor, Bio-Rad, USA), separa a las proteínas por su punto isoeléctrico, permitiendo determinar el punto isoeléctrico de la proteína de interés. La actividad de las proteínas se mantiene, porque éstas están en solución y conservan su estructura nativa.

El Rotofor-cell tiene incorporada una cámara cilíndrica de 60 mL de capacidad, con un tubo en el interior que enfría la muestra a 4°C y gira de manera continua (la rotación es de una rpm). La cámara se encuentra dividida en 20 compartimentos y cada uno corresponde a una fracción del extracto. Cada fracción es rápidamente colectada en 20 tubos diferentes. La separación es posible, ya que se establece un gradiente de pH, entre el cátodo y el ánodo con anfolitos (electrolitos) en la muestra. Cuando se aplica un voltaje, los anfolitos y las proteínas migran y se detienen cuando alcanzan su punto isoeléctrico (pI).

La muestra consistió en 58 mL del crudo enzimático dializado y 2 mL de anfolitos (Bio-Lytes 3/10, Bio-Rad). Se aplicó una corriente constante de 14 Watts, durante 3 horas. Las proteínas se separaron según su punto isoeléctrico (pI), con ayuda de una bomba de vacío se recolectaron las 20 fracciones en tubos, a las cuales se le realizaron las determinaciones de pH y actividad enzimática lacasa.

### **2.6.3. Ultrafiltración.**

Las fracciones seleccionadas se concentraron mediante un sistema de ultrafiltración (Amicon Millipore, modelo 8400) de membrana Centricon con valor de corte de 10000Da de masa molecular (YM-10), se centrifugó a 4°C, 5 000 rpm, durante 30 minutos. Las fracciones fueron concentradas 10 veces de su volumen original.

### **2.6.4. Zimografía.**

Para identificar el número de isoformas enzimáticas, se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, siglas en inglés). La electroforesis en condiciones desnaturizantes se realizó de acuerdo a la metodología de



Laemmli (1970). Se emplearon concentraciones de acrilamida de 10%, en todos los casos y el gel se corrió a 4°C.

Después de la electroforesis, los geles se lavaron con agua desionizada, usando zaranda orbital a 50rpm durante dos horas, el agua se cambió cada 30min para eliminar el dodecilsulfato de sodio, luego se equilibraron en amortiguador de citrato de sodio 0,1 M (pH 3) por una hora a temperatura del laboratorio.

Finalmente para revelar la actividad lacasa se utilizó la misma solución empleada en la determinación cuantitativa de la actividad lacasa, 2mM ABTS en 0,1M de amortiguador de citrato de sodio (pH 3, 30°C) (Téllez-Téllez y col., 2005).

### **2.7. Aplicación del crudo enzimático sobre procianidina B2 comercial.**

Se estudió la acción del crudo enzimático sobre procianidina B2 comercial mediante la desaparición de la procianidina B2 a 280 nm (Contreras-Domínguez y col., 2006). La mezcla de reacción fue 1 mmol L<sup>-1</sup> de procianidina B2 [(-)-epicatequina-(4β-8)-(-)-epicatequina] (Lyon, Francia) en 0,2 mol L<sup>-1</sup> de tampón fosfato, pH 6. La reacción se llevó a cabo a 30°C durante 30 minutos, se detiene colocando en hielo y añadiendo ácido tricloroacético al 10%.

La desaparición de la procianidina se analizó con un sistema HPLC (sistema de bomba cuaternaria Waters 600E con sistema de control, detector de diferentes longitudes de onda y modulo de datos Waters/46). Se empleó una columna C18 ATLANTIS 5 μm, 4,6x250 mm de longitud (Waters Co.U.S.A.). La velocidad de elución fue de un mL min<sup>-1</sup>. El sistema de los solventes aplicados fue: solvente A (acetonitrilo, grado HPLC) y solvente B (ácido acético-agua, 2.5%, v/v): 0-3 min, 3% A; 3-5 min, 9% A; 5-15 min, 16% A; 15-45 min, 50% A; 45-51 min, 90% A; 51-60 min, 3% A.

La procianidina B2 consumida en el curso de la reacción se calcula de la manera siguiente:

$$\Delta C = (C_i - C_f) * D \quad (6)$$

donde:

$\Delta C$ : procianidina B2 consumida en el curso de la reacción ( $\text{g L}^{-1}$ ).

$C_i$ : Concentración inicial de procianidina B2 en el tiempo cero ( $\text{g L}^{-1}$ ).

$C_f$ : Concentración final de procianidina B2 en el tiempo t ( $\text{g L}^{-1}$ ).

D: Factor de dilución de las muestras.

La actividad enzimática se expresa en  $\text{U g}^{-1}$  de sustrato seco y se define como la cantidad de enzima que es capaz de catalizar la desaparición de 1  $\mu\text{mol}$  de procianidina B2 en un minuto por gramo sustrato seco, a  $30^\circ\text{C}$ .

La actividad enzimática se calcula de la manera siguiente:

Actividad volumétrica

$$(\text{U L}^{-1}) = [(\Delta C) * (V_r)] / [(V_m) * (MM) * (t_r)] \quad (7)$$

donde:

$\Delta C$ : procianidina B2 consumida en el curso de la reacción ( $\text{g L}^{-1}$ ).

$V_r$ : Volumen de reacción (L).

$V_m$ : Volumen de muestra (L).

MM: Masa molecular de la procianidina B2 ( $\text{g mol}^{-1}$ ).

$t_r$ : tiempo de reacción (minutos).

Actividad específica ( $\text{U g}^{-1}$ ) = Actividad volumétrica / p

donde p es la cantidad de proteínas en el volumen de reacción ( $\text{g L}^{-1}$ )

### **2.8. Tratamiento matemático y estadístico de los resultados.**

Para el procesamiento de los parámetros muestrales se utilizaron los estadígrafos media aritmética y desviación estándar. Con la finalidad de determinar si los datos cumplían una distribución normal se realizó la prueba D-máxima Kolmogorov-Smirnov y a continuación, la prueba de Bartlett o la F máxima para determinar la homogeneidad de varianzas. Se realizaron análisis de varianzas (ANOVA), de clasificación simple para comparar los promedios de los grupos de tratamiento. Para las comparaciones de las medias de los tratamientos a posteriori se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan (Zar, 1999). Se utilizó el paquete informático Statgraphics Plus versión 5,1/Abril 2002. Todas las pruebas se realizaron con el criterio que define la significación estadística de tipo 1,  $p < 0,05$ .

### **2.9. Determinación de los indicadores de eficiencia económica y económico-financiero de una planta productora de setas comestibles.**

Se realizó un análisis económico-financiero en forma de flujo económico neto (sin financiamiento externo) en un horizonte de 7 años para una planta productora de setas comestibles de 60 ton de setas frescas anuales. Se determinaron: costo de inversión inicial, costo de operación anual, ventas, ganancia, utilidades netas, rentabilidad, valor actualizado neto, tasa interna de retorno y período de recuperación (ICIDCA, 1998; Brealey y col., 2006).

### **CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos en la producción de setas y enzimas lacasas, se discuten con lo referido en la literatura y se enfatiza en los aportes que brinda la investigación.

#### **3.1. Producción de setas comestibles.**

##### **3.1.1 Establecimiento de las condiciones ambientales.**

La producción de setas comestibles obedece a un conjunto de factores como son: cepas productoras, sustratos, condiciones ambientales y forma de cultivo, entre otros.

Para la evaluación de las mejores condiciones ambientales se trabajó con la cepa *Pleurotus ostreatus* (Florida) CCEBI 3024, híbrido de *Pleurotus ostreatus* x *Pleurotus ostreatus* variedad Florida donado por el Instituto de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), que ha sido evaluada con la paja y el bagazo de la caña de azúcar (Gutiérrez y González, 1998). Conociendo los resultados de este Instituto en la producción de setas comestibles con esta cepa, se toma como cepa de referencia y se adecua la tecnología de producción de setas comestibles a las condiciones de estudio con los subproductos del café.

La preparación del inóculo fue exitosa, ya que en todos los casos el micelio del hongo creció muy bien en los frascos omnia con los granos de trigo remojados y esterilizados, observándose en cada uno de los granos un recubrimiento algodonoso blanco, creciendo de forma descendente y pareja hasta lograr cubrir todo el frasco (Figura 9), y luego

de 15 días, todo el trigo estaba cubierto por masa blanca. Este intervalo de tiempo coincide con los 15 días mencionado en la literatura (Guzmán y col., 1993).

La cepa de referencia, CCEBI 3024, crecida sobre la pulpa de café presentó un buen desarrollo micelial en las fases de colonización y fructificación, observándose que los cuerpos fructíferos crecen en forma de racimos o ramilletes a partir de un tallo o tronco central el cual es corto, 1-2cm. Estos racimos siempre son orientados en busca de la luz; se observó crecimiento micelial en toda el área de la bolsa, lo que obligó a retirar parte de la bolsa de polietileno para que pudieran brotar las setas sin dañarse la forma y textura.

#### **Influencia de la capacidad de las bolsas de polietileno.**

La forma y tamaño del biorreactor a utilizar en la producción de setas comestibles se definió antes de comenzar la misma. Desde el punto de vista del hongo, los criterios técnicos que se observaron para definir el biorreactor (bolsa de polietileno) fueron: la facilidad de ventilación y de intercambio gaseoso, la facilidad de disipación de calor y mantenimiento de la humedad en el sustrato. También se consideraron criterios adicionales desde el punto de vista operacional, como son: la facilidad de manejo y llenado de las bolsas, la facilidad para cosechar las setas, la disponibilidad de materiales y su posible precio, así como el tamaño del local de producción.

Del estudio y selección del sustrato lignocelulósico, procedente de beneficio húmedo del café, más adecuado para la producción de setas comestibles y a su vez la capacidad de sustrato en las bolsas de polietileno; empleando la cepa de referencia, se demuestra que la pulpa de café aventaja considerablemente al aflecho y la variable capacidad de bolsa:

4kg, presentó mayor eficiencia biológica y rendimiento que la variable 2kg (Tabla 14).

También es superior la pulpa de café en cuanto a la precocidad.

El aflecho es un subproducto del beneficio del café que se genera en menor cantidad que la pulpa de café, en algunos centros de beneficio se utiliza como combustible en los secadores del grano de café, debido a que posee menos materiales fermentables, poco susceptible de contaminación con bacterias y hongos, pudiera ser esta la razón por la que muestra los valores más bajos de eficiencia biológica, 40,3% para 2kg y 28,5% para 4kg.

Con estos resultados (Tabla 14), en las condiciones de trabajo estudiadas, se escoge como mejor variante la utilización de pulpa de café en bolsas de polietileno transparentes de 4kg. La variante de 2kg de capacidad del sustrato para la pulpa de café puede ser factible para niveles de laboratorio o investigación, donde los lotes de sustrato a emplear son menores que en un nivel de producción y más fáciles de manipular.

Las bolsas transparentes tienen la ventaja de que facilitan el control del proceso, pues permite la comparación de las bolsas en todas las fases del proceso productivo.

#### **3.1.1.1. Evaluación de la producción en la planta de investigación-producción y en una planta rural.**

La ejecución de la metodología descrita en la figura 3 (ver Capítulo 2) fue realizada con éxito. Al tercer día se observó que existe un crecimiento abundante del micelio en la pulpa de café. A los 25 días existe una colonización del 80%, en la planta de investigación-producción, mientras que, para la planta rural este tiempo es menor, aproximadamente entre 12 y 15 días. Cuando el sustrato colonizado quedó bien compactado y cubierto de micelio blanco, se realizaron aberturas a las bolsas y se comienza a inducir con luz, esto ocurre aproximadamente a los 30 días de inoculado el

micelio en el sustrato para la planta investigación-producción y a los 20 días para la planta rural. Se realizaron períodos de luz cada 12 horas para favorecer la aparición de primordios.

La primera aparición de estos ocurre en las aberturas realizadas a las bolsas a los 30 días de incubación sobre pulpa de café, se caracterizaron por tener un crecimiento protuberante que permiten distinguir las copas del hongo. Los primordios comenzaron a desarrollarse a los dos días de exposición a la luz y crecieron alrededor de las 2/3 partes de su tamaño normal (Figura 10a), la primera cosecha se realizó a los 5 días de haberles expuestos a 12 horas de luz (Figura 10b).

Se lograron realizar de tres a cuatro cosechas en ambas plantas. El tiempo de producción de las setas, con la cepa de referencia sobre pulpa de café fue de 50 a 55 días, otras experiencias con esta misma cepa refieren tiempos más largos; sobre bagazo de caña de azúcar (Klibansky y col., 1993), 74 días y sobre rastrojo de maíz (Acosta-Urdapilleta y col., 1988), 70 días. En general, el tiempo de producción de setas *Pleurotus* spp. es la mitad del tiempo requerido en la producción del champiñón (*Agaricus bisporus*) que es de 120-132 días (Zhanxi y Zhanhua, 1997).

Investigadores del Centro Nacional de Investigaciones del Café en Colombia plantean que la cosecha de *Pleurotus* spp. dura aproximadamente 45 días para *P. pulmonarius*, repartida en dos cosechas separadas 14 días, y para *P. ostreatus* y *P. sajor-caju* es de 50 días, repartida en tres cosechas cada diez días (Rodríguez y Jaramillo, 2005), coincidiendo con nuestros resultados.

Entre los siete y diez días posteriores de la primera cosecha, se realizó la segunda, la cual fue menor. Se siguió cosechando hasta los 20-25 días después de la aparición de los

primeros primordios, luego de este periodo, la producción decreció significativamente y el tamaño de las setas fue menor. Valores obtenidos en experiencias realizadas por Martínez-Carrera y colaboradores (2000) permiten manifestar que nuestros resultados sobre el número de cosechas están dentro de los requeridos para ser comercializados.

La producción de las setas con la cepa de referencia se llevó a cabo en ambas plantas productoras. Los resultados de producción promedio por unidad (bolsa), la eficiencia biológica, y el rendimiento muestran que en ambas plantas productoras es factible desarrollar la tecnología (Tablas 15 y 16).

La eficiencia biológica y el rendimiento son satisfactorios y superiores al 53% de eficiencia biológica obtenido con esta misma cepa sobre agro residuos de caña de azúcar por Klibansky y col., (1993), superiores también al valor de 70% de rendimiento obtenido por *Pleurotus sajor-caju* en pulpa de café colombiana (Rodríguez y Jaramillo, 2005). López y colaboradores, 2005 obtuvieron setas *Pleurotus* con similares índices de producción cuando cultivaron *Pleurotus djamor* sobre otros sustratos lignocelulósicos en condiciones de laboratorio y en una casa rural tropical.

Existe un factor de variabilidad que puede incidir en que no exista correspondencia directa entre el número de bolsas inoculadas y su producción promedio, se trata de la variedad de pulpa de café utilizada. En ambas plantas se observó que a medida que se aumenta el número de unidades de producción (bolsas), disminuye el rendimiento. Las variaciones en el experimento 7 (Tabla 16) deben considerar el empleo de la pulpa de *Coffea canephora*. Por otra parte, económicamente, los resultados obtenidos bajo condiciones rurales son atractivos ya que el gasto de climatización de los locales de cultivo no es necesario.



Es importante señalar que la humedad del sustrato de siembra debe estar entre 70-80%, para que la colonización del micelio sea completa y eficiente, así como la fructificación más precoz. Si se tienen humedades mayores, el micelio tardará más en colonizar el sustrato y el riesgo de contaminación con otros microorganismos es mayor. Durante el proceso de colonización, no fue necesario regar con agua las bolsas y fue imprescindible la ventilación de los estantes para oxigenar el ambiente y evitar el calentamiento del sustrato debido al crecimiento micelial.

En el proceso de fructificación o producción de las setas, para concluir exitosamente el proceso de bioconversión, fue necesario regar diariamente con agua, con la finalidad de mantener la humedad relativa entre 80-90%, lo que permite un normal desarrollo de los cuerpos fructíferos. Durante este periodo, también fue importante mantener la ventilación local, con la finalidad de eliminar el exceso de CO<sub>2</sub> en el ambiente derivado de la respiración del hongo. Las setas llegaron a su madurez a los cinco y seis días de la aparición de los primordios, tanto en la planta investigación-producción como en la rural (Figuras 11 y 12), indicando que la temperatura no influyó significativamente sobre el tamaño de la oreja (cuerpo fructífero). Su cosecha se realizó cuando las orejas estaban completamente planas, con coloración blancuzca o grisácea, y consistencia carnosa típica. En cambio, el factor humedad relativa y la concentración de CO<sub>2</sub> afectan la calidad del producto. Fue necesaria una buena iluminación, 150-200 lux (suficiente para leer) se instalaron las luces necesarias en paredes y techo, logrando así que los cuerpos fructíferos desarrollaran menos tallo y más píleo (estructura de mejor textura y gusto al paladar).

Se realizó un análisis del comportamiento de la temperatura y humedad relativa promedio, tanto en la planta de investigación como en la planta rural (Tablas 17 y 18). En esta última, se observó que los valores de ambos parámetros tuvieron mayor desviación, lo cual pudo deberse a los riegos de agua realizados durante la etapa de fructificación.

### **Evaluación de las dos variedades de café.**

Dado que los resultados obtenidos en la planta rural son atractivos, se estudió el cultivo bajo estas condiciones con las dos variedades de pulpa de café existentes en la zona de III Frente: *Coffea arabica* y *C. canephora* variedad robusta.

*Coffea arabica*, originaria de las altiplanicies de Abisinia y cultivada en tierras altas, sobre todo en la América Central y del Sur, con granos muy aromáticos y mucha cafeína y *Coffea canephora*, variedad robusta, cultivada sobre todo en tierras bajas africanas, con granos menos aromáticos y con poca cafeína (Bressani, 1979; Sasson, 1993). Ambas presentan composición semejante (Gross, 2001) pero no manifestaron el mismo rendimiento cuando se cultivó sobre ellas la cepa de referencia.

El sustrato pasteurizado presentó 67-70% de humedad para la pulpa de café de *Coffea canephora*, mientras que 75-80% para la pulpa de café de *C. arabica*. Para la primera, se obtuvo un peso de sustrato seco de 1,0 kg/bolsa, y para la segunda de 1,2 kg/bolsa debido a su menor porosidad y mayor dureza. La pulpa de *C. arabica* tiene menor capacidad para absorber agua.

Se obtuvo un valor significativamente superior de producción total en la pulpa de café de *C. arabica*, alcanzando una diferencia promedio de 600g de setas frescas con respecto a la pulpa de *C. canephora*. Esto representó un 43% más de producción de setas frescas

en la pulpa de café de *C. arabica*. La eficiencia biológica y los rendimientos obtenidos fueron significativamente superiores, con valores de 138,9% (34,7 %) y 67,1% (20,1%) para la pulpa de café de *C. arabica* y *C. canephora*, respectivamente (Tabla 19).

Los resultados tienen explicación lógica debido a las diferencias en los dos sustratos utilizados. La pulpa de café de *C. arabica* presentó mejores características para el cultivo de *P. ostreatus*, en comparación con aquella de *C. canephora*. Existe la posibilidad de mezclar ambas pulpas, sin esperar que los procesos de bioconversión sean negativos y sin necesidad de clasificarlas antes de los procesos productivos.

El desarrollo experimental en la planta rural transcurrió durante dos años. El tiempo promedio de producción (desde la inoculación hasta la última cosecha de cuerpos fructíferos) fue de 65 días, teniendo el comienzo de la fase de fructificación a los 20 días para la pulpa de café *Coffea arabica* y a los 27 días para la especie *Coffea canephora* (Tabla 19). Estos resultados dependen de las variaciones climáticas que imperen en la planta y según la estación del año en que se desarrolle el cultivo. Menores tiempos fueron requeridos para los experimentos realizados en la planta de investigación-producción, la duración total como promedio alcanzó unos 55 días.

Existe mucha información sobre el cultivo de *Pleurotus* spp. sobre subproductos del café (Bermúdez y col., 1994; Fan y col., 2000; Martínez-Carrera y col., 2000; Rodríguez y Jaramillo, 2005) lo cual nos permite concluir que las eficiencias biológicas obtenidas en ambas plantas productoras se encuentran en un rango de 110-115% y son consideradas superiores a las eficiencias reportadas en otras experiencias, con diferentes sustratos (Sánchez y Royse, 2002)

Diferentes autores han diseñado plantas productoras de setas *Pleurotus* spp. teniendo en cuenta diferentes factores como: la cantidad de setas a producir, la disponibilidad de sustratos y las condiciones climáticas del lugar a ubicar la planta (Martínez-Carrera, 1987; Sánchez y Royse, 2002; Rodríguez y Jaramillo, 2005). En nuestro trabajo la planta rural se ubicó en una construcción en desuso con condiciones para el crecimiento de nuestra cepa de referencia y demostramos que es posible la producción de setas.

La implementación del procedimiento tecnológico genera además de las setas, un sustrato remanente (pleurotina), del cual se conoce su aprovechamiento y utilización como alimento animal y/o fertilizante (Martínez-Carrera y col., 2000; Sánchez y Royse, 2002; Viniegra-González y col., 2003; López y col., 2008) (ver Anexo 2).

Por otra parte, esta tecnología propicia nuevas fuentes de empleo para la población, además de contribuir a su desarrollo económico al crear vías de financiamiento, brindar beneficios económicos, sociales y ambientales a las comunidades serranas y agrícolas de regiones cafetaleras y puede ser explotada en las ciudades por empresas que promuevan el uso y consumo de setas comestibles *Pleurotus*.

Resumiendo, con esta investigación se establecen las condiciones para la producción de setas comestibles *Pleurotus* en la planta de investigación-producción (Tabla 20). Es importante señalar que debe cumplirse la disciplina tecnológica durante todo el ciclo productivo y es fundamental tener presente que se trabaja con un organismo vivo, susceptible a cambios de temperatura, luz, humedad, ventilación y al ataque de contaminantes. Actualmente la planta de investigación-producción del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial aplica la tecnología integral de producción de las setas *Pleurotus*, empleando la pulpa de café como sustrato (ver Anexo 3).

### **3.1.2. Evaluación de la producción de setas con cepas *Pleurotus* spp. sobre sustratos naturales.**

#### **3.1.2.1. Evaluación de la producción sobre pulpa de café.**

Como continuación de los trabajos realizados con diferentes sustratos agrícolas para la producción de setas comestibles (Bermúdez y col., 1994) se evalúa la productividad de siete cepas de *Pleurotus* spp.: CCEBI 3021, CCEBI 3022, CCEBI 3023, CCEBI 3024, CCEBI 3025, CCEBI 3026 y CCEBI 3027 con la finalidad de seleccionar cepas de alta producción de carpóforos con características aceptables para su comercialización, empleando como sustrato la pulpa de café.

En el estudio realizado con todas las cepas de *Pleurotus* spp. de la colección de cultivos se demostró que la cepa CCEBI 3026 fue la de menor crecimiento apical cuando se incubó durante ocho días a 25°C en tres medios agarizados (agar papa dextrosa y extracto de pulpa de café con y sin glucosa), por lo cual no se continuó su evaluación.

Se logró que las cepas colonizaran la totalidad de la pulpa de café a los 18 días de inoculados, lo que es importante para evitar contaminación y por consiguiente la inhibición del micelio, tiempos más prolongados se reportan para la cepa de referencia CCEBI 3024. Los primeros primordios aparecieron entre los 18 y 25 días después de la inoculación (Tabla 21). Se evaluó hasta la cuarta cosecha para las cepas CCEBI 3023 y CCEBI 3024 (referencia) y hasta la tercera para las restantes, excepto la cepa CCEBI 3022 que presentó dos cosechas y alcanzó en la primera el 75% de su producción total, las otras alcanzaron en las primeras dos cosechas entre el 85 y el 88% de su producción total (Figura 13).

El micelio de *Pleurotus* spp. puede crecer entre 7 y 35°C, siendo mejor entre 20 y 25°C,

para el crecimiento de cuerpos fructíferos el rango es entre 10 y 28°C (Zhanxi y Zhanhua, 1997; Sánchez y Royse, 2002). Cumpliendo con lo anterior las cepas estudiadas se sometieron a 25 y 21±1°C durante las fases de crecimiento micelial y fructificación, respectivamente.

Las eficiencias biológicas y tasas de producción más altas fueron obtenidas con las cepas CCEBI 3027 y CCEBI 3021, en diferentes periodos de producción. Para CCEBI 3027, 225,23 y 4,50%, en 50 días y para CCEBI 3021, 204,36 y 3,41%, en 60 días, respectivamente. Estos valores son superiores y diferentes estadísticamente al resto, excepto para la cepa de referencia, la cual alcanzó 195,38% de eficiencia biológica. Sin embargo, la cepa CCEBI 3023 (similar estadísticamente a la cepa CCEBI 3024) es bastante aceptable ya que supera el 100% de eficiencia biológica (Guzmán y col., 1993). Los valores de eficiencia biológica de las cepas CCEBI 3022 y CCEBI 3025 son inferiores y diferentes estadísticamente al resto, por lo que no se consideran cepas buenas productoras para las condiciones estudiadas (ANOVA; F=20,05; p<0,05). La prueba de rangos múltiples de Duncan identificó cuatro y cinco grupos homogéneos para la eficiencia biológica y tasa de producción, respectivamente (Tabla 22).

Se estudiaron referencias de otros trabajos para la discusión de los resultados, se encontró que la especie *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer es sinónimo de *Pleurotus pulmonarius* (Sánchez y Royse, 2002; Kong, 2005) siendo este último tan estudiado como *Pleurotus ostreatus*. Las eficiencias biológicas de *P. sajor-caju* (Fr.) Singer, cepa CCEBI 3027 y *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., cepa CCEBI 3021 son superiores a las obtenidas, con estas mismas especies, por Martínez-Carrera y colaboradores (1985) empleando pulpa de café con cinco días de fermentación, 128,1 y 175,8%,

respectivamente. También son superiores a las obtenidas por Salmones y colaboradores (2005), 80,5 y 86,5%, respectivamente; aunque ellos plantean que solo consideraron las dos primeras cosechas de setas para los cálculos. Pudiera ser esta una razón para explicar las diferencias, pero este trabajo comprueba que del 85 al 88% de las setas se obtienen en la primera y segunda cosecha (Figura 13).

Velázquez-Cedeño y colaboradores (2002) refieren menores valores de eficiencia biológica de estas especies de *Pleurotus* sobre pulpa de café, ellos trabajan con biorreactores (bolsas de polietileno) de dos kilogramos de peso húmedo. Para *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* (*sajor-caju*) refieren 125 y 138% de eficiencia biológica, y 13 y 21 días de precocidad, respectivamente.

La tasa de producción de la cepa CCEBI 3027 (4,50%) supera al valor 3,41% registrado por Bernabé-González y colaboradores (2005).

El mayor diámetro (10,17cm) de los cuerpos fructíferos se obtuvo con la cepa CCEBI 3027 superior estadísticamente a la cepa de referencia (ANOVA;  $F=3,59$ ;  $p=0,0323$ ). La prueba de rangos múltiples de Duncan para los diámetros de los cuerpos fructíferos identificó tres grupos homogéneos (Tabla 22). Los promedios de diámetro del píleo obtenidos coinciden con estudios previos (Salmones y col., 1995 y 1997; Velázquez-Cedeño y col., 2002).

El alto contenido de proteína bruta (Tabla 23) obtenido en las setas, 22-38% puede deberse a que el hongo tiene una mayor capacidad de bioconversión de los compuestos lignocelulósicos y nitrogenados del sustrato (Ortega y col., 1997; Quimio, 2005). Los valores encontrados con respecto al contenido de ácidos nucleicos (Tabla 23) están dentro del rango de 2-6%, y dentro de los límites establecidos por el Protein Advisory

Group de Naciones Unidas, lo cual indicó que pueden consumirse hasta 300g de setas frescas diariamente sin tener consecuencias adversas en la salud. *Pleurotus* es un género de hongos comestibles que resulta interesante desde el punto de vista nutricional (ver Anexo 4) en función de su contenido de proteína, lípidos, niveles tolerables de ácidos nucleicos, y por la presencia, además, de vitaminas, minerales, fibra dietética, beta glucanos y compuestos con actividad antioxidante (Bermúdez y col., 2002; 2003). Lo anterior, junto con el reconocimiento de numerosos modificadores biológicos en las setas comestibles como una alternativa para el tratamiento de varios trastornos fisiológicos humanos, ha hecho que algunos autores las denominen “setas nutricéuticas” (Morris y col., 2003; 2007; Chang, 2007).

Se obtuvieron carpóforos de excelente belleza (Figura 14).

Recordando lo planteado en el primer párrafo de este capítulo *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa de referencia CCEBI 3024, es un híbrido *Pleurotus ostreatus* x *Pleurotus ostreatus* variedad Florida. Al respecto Sánchez y Royse (2002) plantean que con las cepas híbridas se obtienen menores rendimientos que con las cepas subtropicales *P. ostreatus* o *P. pulmonarius* debido a su menor producción de polifenoloxidasas y a su menor crecimiento micelial.

No obstante, la cepa de referencia, presenta valores similares de eficiencias biológicas a las cepas CCEBI 3027 y CCEBI 3021, por lo que continúa siendo atractivo su cultivo por ser la de menor tiempo de producción (45 días).

Los resultados indican la factibilidad de ampliar el número de cepas productoras de setas comestibles empleando la pulpa de café como sustrato, con el aporte a la tecnología



establecida de las cepas CCEBI 3021 y CCEBI 3027 como las más productoras con 4,5 y 3,4g de setas frescas por gramo de sustrato seco en un día, respectivamente.

**Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática ligninolítica del sustrato remanente.**

Conociendo que los hongos de pudrición blanca son el único grupo de microorganismos capaces degradar de todos los polímeros básicos de la madera, debido a la capacidad de sintetizar enzimas extracelulares ligninolíticas, responsables de la degradación de los mayores componentes del sustrato, dígase celulosa, hemicelulosa y lignina, a compuestos de bajo peso molecular, que pueden ser asimilados para la nutrición fúngica (Kachlishvili y col., 2005) se realizó la evaluación cuantitativa de la actividad enzimática ligninolítica del sustrato remanente.

Se observa en todo momento mayor actividad de enzima lacasa que manganeso peroxidasa y versátil peroxidasa (Tabla 24), lo que podría estar dado porque aún cuando la pulpa de café contiene compuestos fenólicos propicios para inducir estas enzimas, para la actividad efectiva de las peroxidases se requiere de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como cofactor; lo que presupone la participación de otras enzimas auxiliares para la producción extra e intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Leonowicz y col., 1997).

Un comportamiento similar se refiere para *Pleurotus ostreatus* cultivado en paja de trigo y en cultivo líquido sintético, planteándose la diferencia entre los mecanismos para la degradación de la lignina por las lacasas y las peroxidases, no estando aún del todo claro el rol de las primeras en la degradación (Leonowicz y col., 2001; Valásková y Baldrian, 2006).

Comparando el comportamiento productivo de las seis cepas estudiadas y su relación con excreción de la enzima lacasa es notorio que las dos cepas que más fructificaciones aportaron, CCEBI 3027 y CCEBI 3021, no fueran las de mayor actividad lacasa (0,0843 y 0,0727 Ug<sup>-1</sup>, respectivamente). Investigadores mexicanos (Salmones y Mata, 2002) explican que la actividad lacasa disminuye drásticamente durante la formación y desarrollo de las fructificaciones, observaron que las cepas con menor actividad lacasa, correspondientes a la especie *Pleurotus djamor*, presentaron las eficiencias biológicas más altas. El holandés In der Wiesche y colaboradores (2000) sugieren que el monitoreo de la enzima lacasa durante la fase de colonización pudiera estimar la cantidad biomasa (setas) en la fructificación.

Todo esto corrobora la alta relación entre la cantidad de biomasa de los hongos y la producción de enzima lacasa y se evalúa la producción de esta durante la fermentación en estado sólido de la pulpa de café en la fase de colonización o vegetativa del *Pleurotus* spp., teniendo presente que es la cepa CCEBI 3023 la que presenta el mayor valor de actividad lacasa (0,1397 Ug<sup>-1</sup>).

### **3.1.2.2. Evaluación de la producción sobre otros sustratos puros.**

Dado el éxito de la tecnología de cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa CCEBI 3024, sobre pulpa de café se estudió el empleo otros sustratos naturales, que representan un alto volumen de residuos en procesos agroindustriales, también se evaluó la influencia de tamaño de partícula en la producción de setas.

La caracterización química de los sustratos naturales estudiados en la producción de setas comestibles se muestra en la Tabla 25, se incluyen los subproductos del café para su comparación.

Los materiales elegibles para ser utilizados como sustratos en la producción de setas comestibles *Pleurotus* deben poseer propiedades como: disponibilidad en cantidad y continuidad, características físico-químicas regulares, localización fácil y cercana, y facilidad para transportarlos y manejarlos (Sánchez y Royse, 2002).

Las características de sustratos naturales como: las cáscaras de coco y cacao, son adecuadas para la propagación del micelio y la fructificación de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp., ya que son sustratos lignocelulósicos de composición de lignina semejante (Tabla 4) y además son propios de la región.

Una de las principales características de las cáscaras de cacao y coco es la poca probabilidad de presencia de microorganismos, es decir, prácticamente no existe una contaminación en éstos, a pesar de exponerlos al medio ambiente durante el proceso de secado. Esto resulta una ventaja para estos sustratos, con respecto a la pulpa de café que se contamina fácilmente dada su composición rica en azúcares.

La primera cosecha de cuerpos fructíferos sobre la cáscara de coco (Figura 15a), se obtuvo a los 11 días y sobre la de cacao a los 16 días (Figura 15b), mientras que, sobre la pulpa de café demoró 25 días. La mayor producción de cuerpos fructíferos fue de 842,5g obtenida sobre pulpa de café, corroborándose lo referido por otros autores (Martínez-Carrera y col., 2000; Bermúdez y col., 1994). Por otra parte la menor producción fue de 270,0g obtenida sobre cáscara de coco (Tabla 26).

Las cáscaras de cacao y de coco generaron menores rendimientos de cuerpos fructíferos con respecto a la pulpa de café (Tabla 26), aunque se debe señalar que el hongo se desarrolló más rápidamente sobre los residuos de coco y de cacao, que sobre la pulpa de café. Esta diferencia en la velocidad de crecimiento se observó desde la fase de

colonización, donde el micelio del hongo mostró una rápida activación sobre estos residuos, lo cual puede estar motivado por la menor presencia de los fenoles totales que facilita el acceso del hongo.

En el caso de las cáscaras de coco influye decisivamente el estado de división del sustrato, al ser mayores las partículas, con gran cantidad de fibras que dificultan la reducción de tamaño y la absorción de la humedad necesaria para el sustrato.

Se demuestra el empleo de este residuo para cultivar setas del género *Pleurotus* spp. con la ventaja de poseer el menor tiempo de colonización y por consiguiente un ciclo productivo más corto. La eficiencia biológica obtenida coincide con el valor (88,6%) referido por González y colaboradores (1993) empleando *Pleurotus ostreatus* (*florida*) sobre fibra de coco no fermentada.

Los resultados obtenidos sobre cáscaras de cacao coinciden con otros autores (Calvo y Sánchez-Vázquez, 1993; Ramos y col., 1999) para este tipo de sustrato y condiciones similares. Este no ha sido muy explotado en la producción de setas *Pleurotus* y con esta investigación queda demostrado que posee características idóneas para ello.

#### **Influencia del tamaño de partícula del sustrato.**

Una posible causa de la poca utilización de las cáscaras de cacao en la producción de setas pudiera estar en el tamaño de partícula adecuado, razón por la cual se evalúa la influencia del tamaño de partícula del sustrato en el cultivo del hongo.

Al comienzo de la preparación del sustrato para la producción de setas *Pleurotus* se requiere por lo general triturar, moler o picar las materias primas. Esta operación resulta más eficaz, y se ejecuta con mayor rapidez con los materiales en seco, razón por la cual los sustratos estudiados son secados al sol durante dos o tres días.

El tamaño de partícula es una decisión primaria que debe tomar el operador, y de cuyo cuidado depende el delicado equilibrio que hay que mantener con las tres fases, sólida líquida y gaseosa, en todo el sustrato. Un tamaño de partículas de 2 a 5cm es lo más citado por ser el que le proporciona la mejor estabilidad entre las tres fases mencionadas. Además del tamaño recomendado, conviene que las partículas queden desgarradas longitudinalmente. Un tamaño mayor de 15cm no facilitaría una buena integración del agua, mientras que, por el contrario, si las partículas son de un tamaño muy fino, se corre el riesgo de compactar de manera excesiva el sustrato (Sánchez y Royse, 2002).

La cáscara de cacao al ser rehidratada por inmersión en agua adquiere una textura viscosa, produciendo un mucílago que compacta los pedazos de cacao, se evidenció que mientras mayor son las partículas de la cáscara de cacao menos compactación y mejor manipulación de la misma.

Los resultados muestran diferencias en los rendimientos y las eficiencias biológicas con diferentes tamaños de partícula de la cáscara de cacao (Figura 16). Tamaños de partícula de la fracción entre 1,25 y 4mm presentaron 11 y 40,8% de rendimiento y de eficiencia biológica, respectivamente, mientras que, para tamaños de la fracción mayor de 4mm las cifras se duplicaron.

Anteriormente se comentó que las cáscaras de cacao y coco poseen pocos azúcares y son menos atractivas a la fermentación por microorganismos, estas características permitieron la producción de setas en todas las bolsas de polietileno que fueron inoculadas, no sucede lo mismo con la pulpa de café; con la cual se han tenido experiencias en las que hasta un 25% de las bolsas de polietileno inoculadas se desechan por contaminarse con mohos y mosquitas.

### **Criterio de biodegradación.**

La pérdida de la materia orgánica es el criterio más simple adoptado para evaluar la extensión de la biodegradación del sustrato (Brock y col., 1994), ya que simultáneamente con el crecimiento y fructificación de las setas sobre subproductos lignocelulósicos, se presenta un decremento en el contenido de materia orgánica. Esto es debido a las pérdidas de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O durante el metabolismo de los hongos y también a la remoción de materiales del sustrato por la formación de cuerpos fructíferos (Figura 4 del Capítulo 2). Estas pérdidas en general son mayores durante la fructificación que durante la colonización, lo que indica la alta tasa de actividad catabólica de los hongos durante la primera fase, asociada con la actividad anabólica de formación de cuerpos fructíferos (Rodríguez y Zuluaga, 1994)

Un balance de masa del sistema permitió obtener la bioconversión de los sustratos estudiados (Tabla 27), notándose la reducción de los mismos; se muestra que por cada tonelada de sustrato fresco: pulpa de café, cáscara de cacao y coco, se obtienen como promedio 272, 206 y 124 kg de setas frescas, respectivamente; superior al referido por Rodríguez y Jaramillo (2005) que plantean que por cada tonelada de sustrato fresco que involucre pulpa de café en un 50% o más, se podrán obtener como promedio 100kg de setas frescas.

Con este resultado se aporta al conocimiento de la tecnología de cultivo del llamado hongo ostra, *Pleurotus* spp., al seleccionar nuevos sustratos lignocelulósicos que a través de la fermentación natural elevan la productividad de las setas comestibles y disminuyen las pérdidas por contaminación del proceso tecnológico. Además se aporta al desarrollo

de la biotecnología ambiental e industrial al plantear el aprovechamiento de residuos agroindustriales.

### **3.1.2.3. Evaluación de la producción sobre mezclas de sustratos.**

La fermentación sólida en medio natural brinda la posibilidad de mejorar los rendimientos de la producción de setas con alta composición nutricional, a la vez que se ahorran recursos al emplearse sustratos que son subproductos disponibles y fáciles de manipular. A diferencia de otros estudios que suplementan los sustratos con sales inorgánicas y/o compuestos nutritivos orgánicos (Zadrazil y Kurtzman, 1989; Gross, 2001, Hatvani y col., 2003) para elevar los rendimientos, en este trabajo se realiza la evaluación de mezclas de sustratos naturales.

La experiencia en el uso de subproductos agrícolas para la producción de setas abarca desde la utilización de los subproductos puros, hasta la mezcla o suplementación de estos. Las mezclas mejoran las condiciones físicas del sustrato; Martínez-Carrera y colaboradores (2000) afirman que la pulpa de café debe ser mezclada o suplementada con otros subproductos agrícolas (pajas de cebada y trigo, bagazo de caña de azúcar y rastrojo de maíz) para favorecer la fermentación aerobia de la misma y elevar los rendimientos. El uso de las mezclas se hace económicamente factible si se emplean subproductos de fácil adquisición y transporte de las materias primas procedentes de la misma zona o cercanas.

De la evaluación realizada con las cepas CCEBI 3024 Y CCEBI 3023 para producir setas sobre los sustratos puros y sus formulaciones binarias (Tabla 28, Figura 17) se destaca que todas las formulaciones son factibles de ser explotadas económicamente

porque cumplen el criterio de Tschierpe y Hartmann, 1977 (rendimiento >10%) y la mayoría cumplen con Prata y Pani, 1995 (eficiencia biológica >50%).

Los sustratos con subproductos puros (las cuatro primeras formulaciones) muestran un decrecimiento de la eficiencia biológica desde la pulpa de café (168%) hasta la viruta de cedro (67%) pasando por las cáscaras de coco (95%) y cacao (84%), sin embargo si el sustrato es una mezcla binaria con pulpa de café mejoran los valores de eficiencia biológica, tal es el caso de las formulaciones 5, 6 y 7, que consisten en diferentes proporciones de cáscaras de coco con pulpa de café, con valores de 114, 110 y 101%, respectivamente. González y colaboradores (1993) cultivaron *Pleurotus florida* sobre las mezclas cáscara de coco: pulpa de café (1:2) y (1:1) obteniendo 152% y 120% de eficiencia biológica, respectivamente, ellos a diferencia de este trabajo, realizaron una pre-fermentación de los subproductos.

Estos resultados demuestran la hipótesis de mezclar la pulpa de café con otros subproductos para mejorar los rendimientos de éstos, resultando más económico y sin incluir etapas en el proceso productivo.

La precocidad de las mezclas (entre 18 y 20 días) es menor con relación a la pulpa de café pura (25 días) (Tabla 28) cuestión que es interesante destacar, por ser la fase de colonización el punto crítico de la producción de setas.

En el cálculo de la tasa de producción (ecuación 4, página 40) interviene el tiempo de cultivo (invasión del micelio sobre el sustrato y fructificación de las setas), el cual es necesario disminuir para reducir los costos de producción. Las tasas de producción de las formulaciones 5, 6 y 7 son similares a la obtenida por la pulpa de café 100%, cuestión que también favorece el uso de las mezclas.



Las formulaciones 10 y 11 consisten en la suplementación de los dos subproductos que posee relación carbono/nitrógeno (C/N) más altas con respecto al resto, la cáscara de coco (C/N=112) y la viruta de cedro (C/N=570) (Tabla 25) con el trigo, los rendimientos, las eficiencias biológicas y las tasas de producción de estas mezclas mejoraron con relación a la viruta de cedro y se mantuvieron similares para la cáscara de coco, lo que confirma que se logra un equilibrio de los nutrientes al mezclar estos subproductos con un material que posee un alto contenido de nitrógeno total (2%) y una relación carbono/nitrógeno baja (C/N=28) como es el caso del trigo.

En cuanto a la precocidad de estas mezclas, por el contrario al resto de parámetros, casi se duplica, no favoreciendo su empleo en la producción de setas.

Esta práctica de suplementación con materiales ricos en nitrógeno no está exenta de riesgo, ya que favorece el desarrollo de microorganismos competidores, así como pudiera ocasionar incrementos peligrosos de temperatura en el sustrato, no siempre fáciles de controlar si no se dispone de medios adecuados (Sánchez y Royse, 2002).

El criterio a favor del uso del trigo es en la preparación de la semilla o inóculo y no en la producción de setas, dado el alto precio de este grano en el mercado y los resultados obtenidos en la suplementación.

Las mezclas binarias donde la pulpa de café esta ausente (formulaciones 12, 13 y 14) presentaron menores resultados en cuanto a rendimiento y eficiencias biológica (Tabla 28, Figura 17); la mezcla cáscara de cacao y viruta de cedro debe tenerse en cuenta al presentar una precocidad de 18 días y favorecer la composición del sustrato de siembra en cuanto a textura y porosidad de la cama de sustrato.

Las cáscaras de cacao, coco y la viruta de cedro mostraron menores pérdidas por bolsas contaminadas, siendo casi nula la cantidad de bolsas desechadas por invasión de mohos y moscas. Aunque se plantea que la pulpa de café no es muy utilizada en el ámbito industrial por la contaminación con *Trichoderma* (Murrieta y col., 2002) y conociendo los resultados superiores de esta en el cultivo de setas comestibles, se amplió la evaluación de las mezclas a todos los sustratos con algunas de las cepas estudiadas.

Se logran mayores setas frescas por sustrato seco con las cepas CCEBI 3027 y CCEBI 3021, ya conocidas por su elevada producción sobre la pulpa de café no mezclada, les siguen en orden descendente la cepa de referencia CCEBI 3024, la cepa CCEBI 3023 y por último la cepa CCEBI 3025 (Tabla 29).

Comparando todos los resultados de la cepa CCEBI 3023 se observa que decrecen los valores de eficiencia biológica (en %), desde la pulpa de café 100% ( $148,2 \pm 25,0$ ) hasta la viruta de cedro 100% ( $9,5 \pm 0,4$ ). (Tabla 29).

Los resultados de mezclar la pulpa de café con los otros sustratos indican la influencia positiva que posee la composición del sustrato de siembra sobre la tasa de producción (Tabla 29). La tasa de producción obtenida en la mezcla pulpa de café: cáscara de cacao (1:1) muestra superioridad estadística (ANOVA;  $F=350,30$ ;  $p<0,05$ ) sobre el primer subproducto solo, pero no ocurre igual en cuanto a la eficiencia biológica, ya que los valores no difieren estadísticamente ( $p<0,05$ ) en las mezclas con la cáscaras de cacao y coco (Figura 18).

#### **Evaluación de la actividad enzimática lacasa del sustrato remanente.**

Al evaluar la presencia de enzima lacasa extracelular en la pulpa de café mezclada y fermentada por la cepa CCEBI 3023, una vez cosechadas las setas (60 días de

fermentación) se evidencia que la composición de la pulpa de café favorece la producción de enzimas lacasas, al ser superiores los valores de producción de esta enzima en la pulpa de café pura que en la mezclada (Tabla 30).

Por primera vez se refiere la producción de la enzima lacasa durante la etapa de fructificación del *Pleurotus* spp. crecido sobre mezclas de sustratos lignocelulósicos y mediante fermentación en estado sólido, se observa la influencia del contenido de nitrógeno del sustrato en la producción de esta enzima.

Comparando los valores obtenidos de enzima lacasa para la pulpa de café pura (0,139 Ug<sup>-1</sup>Tabla 24 y 1,745 Ug<sup>-1</sup> Tabla 30) se observa que existe una diferencia de 1,6 unidades.

La no coincidencia de valores entre estos resultados se debe a que en aquella ocasión la determinación de la actividad enzimática se realizó con guayacol como sustrato y este es un compuesto modelo de derivado lignínico fenólico susceptible al ataque de la lacasa, vía formación de quinonas. Mientras que el ABTS es un sustrato artificial de la lacasa, pues no constituye un derivado fenólico, cuyo ataque por esta enzima es vía formación de radicales (Wolfenden y Willson, 1982).

Varios autores refieren diferencias de actividad lacasa para diferentes sustratos de ensayo (Téllez-Téllez y col., 2005).

#### **3.1.2.3.1. Evaluación de la influencia del contenido de nitrógeno en el sustrato.**

Con el objetivo de estudiar la influencia del contenido de nitrógeno del sustrato en los rendimientos y la productividad del cultivo de cepas de *Pleurotus* spp., para ampliar las potencialidades productivas que propicia esta tecnología, se evalúa la producción y características de las setas comestibles de las cepas CCEBI 3027, CCEBI 3021 y la de

referencia (las mejores, según estudio anterior) en pulpa de café, viruta de cedro y la mezcla de estos sustratos (1:1), teniendo como premisas la diferencia de estos sustratos en la relación carbono/nitrógeno y la importancia este último en la producción de biomasa, reportada por diferentes autores (Rajarithman y Bano, 1987; Sánchez y Royse, 2002; Kachlishvili y col., 2005). En la literatura hay evidencias contradictorias sobre los efectos de la naturaleza y concentración de la fuente de nitrógeno sobre la producción de enzimas ligninolíticas, especialmente de la presencia del sustrato lignocelulósico (Tekere y col., 2001; Rodríguez-Couto y col., 2004; Kapich y col., 2004; Stajic y col., 2006, Alarcón-Gutiérrez y col., 2008).

Realizando una valoración de la composición de los sustratos utilizados en la planta de investigación-producción del CEBI, para el cultivo de setas comestibles, se observa que la pulpa de café y la viruta de cedro, poseen los valores extremos (superior e inferior) de nitrógeno (2,9 y 0,1% base seca, respectivamente) y relación carbono/nitrógeno (31 y 570, respectivamente) (Tabla 25). La pobreza de nitrógeno en la viruta de cedro, puede ser la causante de los bajos valores de fructificación obtenidos sobre este sustrato.

El género *Pleurotus* spp. no exige un sustrato con selectividad química, ya que puede crecer en medios nutritivos con una relación carbono/nitrógeno comprendida entre 30 y 600; en cambio si necesita selectividad biológica y por tanto la flora acompañante debe ser protectora y no competidora (Sánchez y Royse, 2002; Poppe, 2005).

Manú-Tawaiah y Martín (1988) determinaron que la relación para el crecimiento en medio líquido de *P. ostreatus* era de 40:1, Hong (1978) encontró que para la misma especie, una relación de 15,23 permitía una rápida formación de cuerpos fructíferos con bajos rendimientos, que una relación de 11,42 incrementaba los rendimientos pero

disminuía la formación de cuerpos fructíferos y que tomando en cuenta los dos aspectos (rendimiento y velocidad de formación), la relación óptima debía ser de 30,46. Por su parte, Rajarathnam y colaboradores (1986) encontraron que una alta relación carbono/nitrógeno es necesaria para el crecimiento micelial de *P. djamor* mientras que una baja favorece el desarrollo de cuerpos fructíferos.

El promedio de setas obtenidas, fluctuó entre 91 y 971g (Tabla 31), mostrándose dos grupos homogéneos, diferentes estadísticamente ( $p < 0,05$ ), en la mezcla los resultados fueron menores a los obtenidos con la pulpa de café pura, esto corrobora al sustrato pulpa de café como el más adecuado para obtener las mayores cantidades de setas (Bermúdez y col., 1994; Martínez-Carrera y col., 2000).

Los rendimientos obtenidos no mostraron diferencias significativas ( $p = 0,0004$ ) entre la cepa de referencia en pulpa de café y la cepa CCEBI 3027 en la mezcla pulpa de café: viruta de cedro.

Las eficiencias biológicas muestran un comportamiento similar a la producción de setas, diferenciándose en que las cepas CCEBI 3021 y CCEBI 3027 son estadísticamente diferentes ( $p = 0,0002$ ) cuando se siembran en las mezclas.

La cantidad de setas producidas en un día (tasa de producción) de la cepa CCEBI 3027 sobre la mezcla pulpa de café: viruta de cedro es similar estadísticamente ( $p = 0,0002$ ) a la cantidad de setas producidas en un día por la cepa de referencia CCEBI 3024 sobre pulpa de café.

Estos resultados sugieren la utilización de la cepa CCEBI 3027 con la mezcla pulpa: viruta para la producción de setas en el menor tiempo de cultivo y calificarla como la mejor productora en nuestras condiciones.

Otro aspecto interesante en la mezcla fue que se obtuvieron fructificaciones convexas cuando maduraron, de color café claro con el centro blanco, estípites largo pubescente, de color blanco (Tabla 32, Figura 19). Los carpoforos presentaron entre 5 y 6 cm de diámetro del píelo, superiores a los obtenidos sobre la viruta de cedro pura, pero inferiores a los obtenidos sobre pulpa de café pura.

Los valores de proteína bruta (% base seca) de los cuerpos fructíferos obtenidos para las cepas CCEBI 3021 y CCEBI 3027 sobre la mezcla fueron intermedios (27 y 34%, respectivamente) a los obtenidos por los sustratos puros (30 y 38%, sobre pulpa de café y 21 y 22%, sobre viruta de cedro).

Los resultados indican que la mezcla pulpa de café: viruta de cedro (1:1) puede ser utilizada como sustrato en la producción de setas comestibles *Pleurotus* con buenos índices de producción, obteniéndose mayores producciones con la cepa CEBI 3027, además, con esta mezcla se eliminan las pérdidas por contaminación.

### **3.2. Producción de enzimas lacasas.**

Se han realizado numerosos trabajos donde se evalúan las potencialidades de los hongos de pudrición blanca para la producción de enzimas lacasas (EC 1.10.3.2) (Giardina y col., 2000; Kahraman y Gurdal, 2002; Rodríguez-Couto y col., 2004; Jaouani y col., 2005; Rodríguez-Couto y Sanromán, 2005; Mata y col., 2005; De Souza y col., 2006).

Varios sustratos lignocelulósicos y hongos de pudrición blanca han sido usados exitosamente en fermentación sólida y sumergida para la producción de enzimas lignocelulósicas. Los datos obtenidos demuestran que el tipo y la composición de los sustratos lignocelulósicos parecen determinar el tipo y cantidad de enzima producida por el basidiomiceto de pudrición blanca (Tsiklauri y col., 1999; Howard y col., 2003;

Kapich y col., 2004; Moldes y col., 2004; Stajic y col., 2006; Elisashvili y col., 2001; 2006). Varios reportes indican que el método de fermentación aplicado a los sustratos lignocelulósicos puede influenciar considerablemente en la producción de enzimas (Elisashvili y col., 2001; 2006). Ha sido demostrado que la fermentación en estado sólido de sustratos lignocelulósicos por algunos hongos produce diferentes conjuntos de enzimas comparada con los medios de cultivos sintéticos (Vares y col., 1995). Por lo que el estudio de la producción de enzimas lacasas por un sustrato natural, presenta gran interés, aun más, si se obtiene biomasa (setas) de alto valor nutritivo además de enzimas lacasas.

Anteriormente se demostró que es posible el cultivo de *Pleurotus* spp. sobre pulpa de café, empleando bolsas plásticas como biorreactor, con la finalidad de comercializar las setas, ahora se requiere intensificar el estudio de los mecanismos utilizados por *Pleurotus* spp., durante su crecimiento vegetativo para lograr una transformación más efectiva de la pulpa de café, a través de su complejo enzimático, pudiendo ser además ésta una posible fuente de obtención de enzimas lacasas.

El interés en cultivar *Pleurotus* spp. sobre residuos agroindustriales se basa, no sólo en sus propiedades organolépticas y nutricionales, sino además, en su reconocida capacidad biodegradativa. El género *Pleurotus* secreta diversas enzimas oxidasas y fenoloxidasas lo que les permiten crecer en sustratos que contienen lignina y compuestos fenólicos. Entre las enzimas más ampliamente estudiadas se encuentra la lacasa, la cual ha mostrado participar activamente en la descomposición de la lignocelulosa, así como en la detoxificación del sustrato. Esta enzima está asociada con una rápida adaptación del hongo a un nuevo sustrato, así como en la producción de

metabolitos que impiden y/o disminuyen la competencia de mohos antagonistas (Mata y col., 2005). La secreción de lacasa se ha visto incrementada en los cultivos contaminados con el moho *Trichoderma*, formando una línea oscura donde ocurre una mayor actividad de la enzima, y consecuentemente, se logra inhibir el crecimiento del contaminante. Por lo tanto, se considera que la inducción de la lacasa favorece la rápida adaptación a un nuevo sustrato y una mejor competitividad a otros microorganismos (Salmones y Mata, 2007).

El objetivo de esta investigación es evaluar la producción de lacasa por cepas de *Pleurotus* spp. durante la etapa vegetativa sobre pulpa de café, empleando columnas de fermentación en estado sólido descritas por Raimbault y Alazard (1980).

### **3.2.1. Evaluación de cepas *Pleurotus* spp.**

Se continua el estudio del género *Pleurotus* teniendo en cuenta las experiencias en nuestro país con el cultivo de *Pleurotus* spp. para la producción de setas comestibles, empleando como sustrato residuos agroindustriales de naturaleza lignocelulósica o polimérica como residuos cañeros y del café (Bermúdez y col., 1994; Ortega, 1999; Ortega y Otero, 2001); así como los trabajos realizados con este hongo como biodegradador de residuales líquidos contaminantes como el extracto líquido obtenido de la pasteurización de la pulpa de café (Rodríguez, 2006).

Con el fin de seleccionar entre las cepas de *Pleurotus* spp. las mejores productoras de enzimas lacasas sobre pulpa de café, se evaluó cualitativamente la actividad enzimática, sobre los medios de cultivo agarizados. Las pruebas en placas Petri con medios sólidos naturales suplementados con o sin glucosa son ensayos simples, rápidos y de gran



utilidad para valorar de manera cualitativa la capacidad de producir enzimas extracelulares.

A partir de los resultados de la producción de carpóforos en pulpa de café se seleccionaron cuatro cepas de *Pleurotus* spp.: CCEBI 3021, 3024 y 3027 buenas productoras y la 3023 de producción más baja, para conocer su capacidad de excretar enzima lacasa durante su crecimiento micelial en placas Petri y en columnas Raimbault. Se obtuvo crecimiento micelial en las placas Petri y una vez cubierta se procedió a realizar el ensayo con la gota de sustrato, la coloración es más intensa y aparece con mayor rapidez cuando se añade la gota de ABTS en el centro de la placa, donde existe el micelio más envejecido (Figura 20).

Se detectó escasa o nula coloración en el medio extracto pulpa café sin glucosa, lo cual pudiera estar asociado con el pobre crecimiento micelial de las cepas en este medio carente de glucosa como fuente carbonada (Tabla 33). Rodríguez (2006) resalta la importancia de la glucosa en la producción de lacasas por *Pleurotus* spp. en sus investigaciones con residuales coloreados.

En los restantes medios de cultivos o la evaluación de la actividad lacasa fue similar para las cuatro cepas, destacándose la cepa de referencia y la cepa CCEBI 3023 (Tabla 33). También es notorio que en el medio sintético y en el natural se presente similitud de comportamiento de la enzima, aún cuando difieren en su composición.

### **3.2.2. Estudio comparativo de enzimas lacasas producidas en columnas Raimbault.**

Se llevó a cabo la fermentación sólida con las cepas de *Pleurotus* spp. sobre pulpa de café en columnas Raimbault (Figura 21). Todas las cepas estudiadas desarrollaron micelio y mostraron máximos valores de biomasa micelial (17-25 mg g<sup>-1</sup> sustrato seco)

entre el segundo y tercer día de fermentación, luego decrece ( $1,19 \text{ mg g}^{-1}$  sustrato seco) para la cepa CCEBI 3024 o se mantiene constante en un rango de valores ( $7,25\text{--}9,04 \text{ mg g}^{-1}$  sustrato seco) como sucede con las cepas CCEBI 3021 y CCEBI 3023 hasta los siete días de fermentación (Tabla 34).

Todas las cepas expresaron actividad lacasa durante los siete días de fermentación, siendo máximos los valores de actividad entre el segundo y el cuarto día de fermentación. La cepa CCEBI 3023 presentó el mayor valor,  $25 \text{ Ug}^{-1}$ , al cuarto día. El comportamiento cinético de las cuatro cepas fue muy similar, prácticamente todas expresan máxima actividad y luego tienden a decrecer a partir del tercero o cuarto día (Figura 22), lo mismo sucede en fermentación sumergida (Rodríguez, 2006).

La cepa CCEBI 3023 vuelve a destacarse por mostrar menores valores de biomasa micelial y mayores de actividad lacasa, (recodar que en bolsas de polietileno como biorreactores se había constatado similar comportamiento).

La cepa de referencia ha sido estudiada para decolorar los efluentes vinaza de destilería y el extracto líquido obtenido de la pasteurización de la pulpa de café, reportándose valores de actividad lacasa de  $8,53\pm 0,73 \text{ UmL}^{-1}$ , a los nueve días de cultivo en este último residual (Rodríguez, 2006).

La producción de la enzima lacasa está asociada con la morfogénesis de las cepas de *Pleurotus* spp. debido a que su nivel se incrementa con el crecimiento vegetativo (Leonowicz y col., 2001). Salmones y Mata (2002) bajo condiciones similares a esta investigación observaron actividad lacasa desde el cuarto día de incubación, máxima a los 12 días ( $33 \text{ Ug}^{-1}$ ) y una disminución rápida en la fase de formación y desarrollo de los cuerpos fructíferos.

A los crudos enzimáticos de cada cepa con máxima actividad lacasa extracelular, se les realizó el zimograma (Figura 23), observándose que todas las cepas muestran una banda al mismo nivel, excepto la cepa de referencia CCEBI 3024 que muestra dos bandas, lo que indica la presencia de dos isoformas de enzima lacasa, similar comportamiento se observó cuando se cultivó en residuales líquidos coloreados (Rodríguez, 2006).

Téllez-Téllez y colaboradores (2005) realizaron un estudio con diez cepas de *Pleurotus* spp. para conocer la acción de la enzima lacasa intracelular, empleando tres sustratos en la determinación y en el revelado del gel, ellos observaron igual patrón de zimografía con bandas al mismo nivel, por lo que sugieren que la misma isoforma de lacasa es capaz de oxidar todos los sustratos ensayados, aunque no todas las cepas mostraron similitud en las actividades enzimáticas.

Las cepas CCEBI 3073 y MC 50 son cepas patrones, la primera *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida), fue donada por el Laboratorio de Biología Molecular y Ambiental de la Universidad “Federico II” (Nápoles, Italia) y la segunda es *Pleurotus ostreatus*, procede de la Colección de Recursos Genéticos del Colegio de Posgraduados de Puebla, México. Las cepas analizadas presentaron bandas similares a los patrones (Figura 23).

Como puede observarse, la presencia de isoformas de lacasa requiere de un estudio más profundo, será objeto de atención en trabajos posteriores.

### **3.2.3. Escalado en las columnas Raimbault.**

Conociendo los resultados obtenidos en los medios agarizados y las cepas que presentan mayor actividad enzimática lacasa, se escogen las cepas CCEBI 3023 y CCEBI 3024 para continuar los estudios a otras escalas.

Se llevó a cabo la fermentación sólida con las dos cepas seleccionadas sobre pulpa de café en columnas medianas (Figura 24). Estas desarrollaron micelio y mostraron un crecimiento similar al obtenido con las columnas pequeñas.

Al estudiar la actividad lacasa en las diferentes escalas de fermentación, la cepa CCEBI 3023 expresa valores mayores que la cepa de referencia CCEBI 3024, volviendo ambas a mostrar decrecimiento al final de la fermentación. Los máximos valores de actividad se lograron entre el cuarto y quinto día de fermentación (Figura 25). La igualdad de los resultados pudiera deberse a que se trabaja con similitud gravimétrica, se mantiene el mismo flujo de aire por columna y por gramo de sustrato seco, la densidad aparente del sustrato es similar en ambas escalas de fermentación y existe igualdad de parámetros de operación y de tasa de inoculación.

Estudios sobre actividad lacasa de *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa de referencia 3024, en bolsas de polietileno con 250g de pulpa de café al 70% de humedad y evaluando cada siete días el comportamiento de la enzima, se obtuvo un máximo de 2,41  $Ug^{-1}$  a los 14 días de cultivo (Kourouma, 2007).

La diferencia entre la pulpa de café que se emplea en los biorreactores de bolsas de polietileno y la pulpa de café en las columnas Raimbault esta en el método de tratamiento utilizado, la primera es pasteurizada (inmersión en agua caliente durante una hora) y pierde muchos compuestos solubles; la segunda es esterilizada 121°C durante 20 minutos y se mantienen en mayor concentración los compuestos que aporta la pulpa de café.

### 3.2.3.1. Fermentación en estado sólido en columnas de 0,75 kg.

Se realizó la fermentación sólida de la pulpa de café en columnas de vidrio con 0,75 kg de capacidad de sustrato húmedo, bajo las mismas condiciones de las columnas Raimbault con el objetivo de evaluar el crecimiento del hongo hasta la fase de fructificación. Se continuó trabajando con la cepa CCEBI 3023 y la cepa de referencia.

La actividad lacasa de una muestra de pulpa fermentada, tomada a los siete días de fermentación resultó ser de  $3,62 \text{ Ug}^{-1}$  para CCEBI 3023 y  $12,64 \text{ Ug}^{-1}$  para la cepa de referencia.

Se logró el desarrollo del micelio y la fructificación de las setas (Figura 26), para la cepa CCEBI 3023 a los 12 días de fermentación había colonizado toda la pulpa de café por lo que se sacó de la columna para que fructificara, a partir de los 20 días se obtuvo una cosecha de 12 carpóforos de 6cm de diámetro promedio, la eficiencia biológica fue de 85,7% y la tasa de producción, de 2,86% para 30 días de cultivo. También llamativo la inversión de estos resultados con los obtenidos anteriormente, la cepa de referencia produjo menos setas, a partir de los 27 días se obtuvo una cosecha de 30 carpóforos de 5cm de diámetro promedio, la eficiencia biológica fue de 37,5% y la tasa de producción, de 1,25% para 30 días de cultivo.

La producción de las setas también puede ser en pomos o columnas pero se limita el área de fructificación de las setas, al separar el contenido de columna se corre el riesgo de dañar el micelio y que el sustrato pierda la compactación.

La cepa de *Pleurotus* spp. que reporta los valores de actividad lacasa más altos no es la que más produce biomasa (micelio) y por supuesto setas. Las referencias bibliográficas

con relación a este aspecto son contradictorias, se plantea que depende de las cepas, los sustratos lignocelulósicos y las condiciones de fermentación.

#### **3.2.4. Biotransformación de los contenidos de fenoles totales, taninos condensados y cafeína en la pulpa de café.**

Se continúa con las cepas CCEBI 3023 y 3024 para los estudios de biotransformación de los contenidos de fenoles totales, taninos condensados y cafeína en la pulpa de café en ambas escalas de fermentación.

Existe una disminución del contenido de fenoles totales del sustrato por las dos cepas estudiadas, en ambas escalas de fermentación (Figura 27), siendo evidente desde las primeras 24 horas la disminución de la concentración estos compuestos tóxicos y luego durante el resto de los días de la fermentación un nivel casi constante de la concentración. La cepa CCEBI 3024 presentó mayores niveles de biotransformación (53,07% de fenoles totales transformados a las 24 horas) que la cepa CCEBI 3023 (45,51%, a las 48 horas).

La composición química de la pulpa de café procedente del beneficio húmedo pierde la mayoría de los compuestos fenólicos y otros compuestos solubles en agua, esto puede ser la causa de la poca presencia de taninos condensados en la pulpa de café ( $0,4-0,5 \mu\text{g g}^{-1}$  sustrato seco) y en la pulpa de café fermentada ( $0,5-0,6 \mu\text{g g}^{-1}$  sustrato seco). Se confirma la contradicción entre la presencia o no de estos compuestos en la pulpa de café (Ramírez-Martínez, 1999). Otra causa de estos valores tan pobres se debe a que los taninos condensados son probablemente oxidados con el tiempo y no extraíbles con los métodos químicos utilizados (Ramírez-Coronel y col., 2004).

Según estos resultados, no se asegura que las cepas de *Pleurotus* spp. estudiadas no tuvieran acción transformadora sobre los taninos condensados de la pulpa de café, por lo que será interesante conocer si el crudo enzimático obtenido por fermentación sólida de la pulpa de café con este basidiomiceto es capaz de transformar una molécula modelo de tanino condensado comercial, teniendo como antecedente la biodegradación de los taninos condensados por hongos filamentosos (Conteras-Domínguez y col., 2006).

La disminución máxima de concentración de cafeína se observó al séptimo (último) día estudiado, los valores de remoción de cafeína, independientemente de la escala de fermentación, oscilaron entre 15-24% (Figura 28). La concentración de cafeína en la pulpa de café antes de la fermentación fue de 0,5-0,6 mg g<sup>-1</sup> sustrato seco, inferior al referido en la literatura (Bressani, 1979; Elías, 1979; Porres y col., 1993; Ulloa y col., 2003), este valor tan bajo se debe a que la pulpa procede de un beneficio del café por vía húmeda, donde se lixivian parte de la cafeína y otros compuestos solubles.

El crecimiento del micelio de *Pleurotus* spp. en las columnas no se inhibe con esta concentración de cafeína y el hongo logra disminuirla discretamente. Job (2004) cultivó *Pleurotus ostreatus* sobre borra de café y concluye que en el análisis de la cafeína efectuado en el sustrato es degradada hasta un 59% por el micelio y que ésta no es incorporada en las fructificaciones recogidas lo que indica su degradación por el micelio.

En la planta de investigación-producción de setas comestibles del CEBI se refieren bajos valores de cafeína en las setas (0,035 mg g<sup>-1</sup> sustrato seco) (ver Anexo 4).

Las setas obtenidas en las columnas de 0,75 kg no presentaron valores de cafeína, contradiciendo lo afirmado por varios autores al plantear que *Pleurotus* spp. no es capaz

de degradar la cafeína sino de transferirla a los carpóforos (Leifa y col., 2000; Fan y col., 2003; Salmenes y col. 2005; Nieto y col., 2007).

Salmenes y colaboradores (2005) obtuvieron mayor degradación de cafeína en la fase de fructificación, la pérdida de este componente en la pulpa de café fermentada fue más del 50% al final de la primera cosecha.

La disminución de la concentración de los fenoles totales y de la cafeína de la pulpa de café pudiera estar asociada con la producción de la enzima lacasa (Figura 29), la cual puede ser responsable de esta transformación (Mata y col., 2005; Salmenes y col., 2005), junto a otras enzimas, que se expresan en menor actividad.

Murrieta y colaboradores (2002) plantean que existe correlación negativa entre cantidad de lacasa producida por *Pleurotus* y cantidad de fenoles en el sustrato.

La disminución del contenido de fenoles del sustrato durante el ciclo de cultivo de *Pleurotus*, es un aspecto importante en la adaptación de la cepa a este, lo cual pudiera acelerar la colonización y como consecuencia decrece el riesgo de contaminación con mohos.

Conociendo la composición de la pulpa de café (Tablas 4 y 25) por el contenido de lignina y compuestos aromáticos con estructura química semejante a esta, se puede inferir que estos pueden ser inductores de enzimas lacasas (Ikehata y col., 2004).

### **3.3. Características de la enzima lacasa producida por *Pleurotus* spp.**

Se realizó un análisis de la producción de la enzima lacasa en las cepas seleccionadas (Tabla 35). La mayor producción de la enzima lacasa la muestra la cepa CCEBI 3023 al cuarto día de fermentación, siendo superior al valor obtenido por las cepas patrones *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida) CCEBI 3073 y *Pleurotus*



*ostreatus* MC 50. A partir de este criterio se escoge el extracto crudo enzimático de la cepa CCEBI 3023 al cuarto día de fermentación para los ensayos de purificación, pudiéndose valorar el extracto crudo enzimático de la cepa CCEBI 3021 al tercer día de fermentación para futuras investigaciones.

Los estudios sobre las lacasas de *Pleurotus* spp. se dirigen fundamentalmente hacia su producción extracelular en cultivos desarrollados en medio líquido (Palmieri y col., 2000) primando los estudios de purificación y caracterización de estas enzimas (Giardina y col., 1999; Marques de Souza y Peralta, 2003; Rodríguez, 2006). Sin embargo, la actividad de enzimas lacasa en micelios de cepas de *Pleurotus* spp. crecidos en medios agarizados o en sustratos sólidos mediante fermentación natural, es poco estudiada, se analiza el extracto crudo enzimático mediante isoelectroenfoque y electroforesis de enzimas (zimografía).

Estas son técnicas modernas para la evaluación cualitativa de las preparaciones enzimáticas. La electroforesis ha ganado importancia ya que cuando las isoenzimas son difíciles de distinguir por su función catalítica es necesario emplear propiedades físicas como la carga eléctrica. El isoelectroenfoque o focalización isoelectrónica consiste en separar las proteínas de acuerdo a su punto isoelectrónico y es una de las técnicas muy usadas (Morais y col., 2002; Aehle, 2004).

Los resultados del isoelectroenfoque muestran (Figura 30) dos picos de actividad lacasa bien definidos en las 20 fracciones obtenidas, el primer pico, y máximo, lo tienen las tres primeras fracciones de pH entre 2,35 y 4,00; con valores de 8,5; 11,7 y 8,7 U L<sup>-1</sup>, respectivamente, el segundo pico se observa en la parábola de las fracciones desde la 12 a la 15, de pH entre 7,20 y 8,07; con valores entre 4,7 y 5,0 U L<sup>-1</sup>.

Las fracciones 1, 2, 3, 12, 13, 14 y 15 se concentraron 10 veces mediante un sistema de ultrafiltración antes de realizar la electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) para identificar el número de isoformas enzimáticas.

### **3.3.1. Zimografía.**

En el zimograma de las fracciones seleccionadas y del extracto crudo enzimático (ECE) se nota la ausencia de bandas en las fracciones 1 y 2, las cuales poseían actividad lacasa similar y superior al resto de las fracciones (Figura 31), se corrobora que no siempre existe correspondencia entre la actividad lacasa medida con la visualización de esta (o sus isoformas) en el zimograma. También se confirma la posible existencia de isoformas de lacasa (Téllez-Téllez y col., 2005; Mata y col., 2005), pero esta definición requiere de futuros estudios.

Rodríguez (2006) encuentra unas isoformas de lacasas cuando hace revelado con ABTS y otras cuando lo realiza con guayacol, significando que estas dependen de las condiciones de las técnicas electroforéticas y de la afinidad por el sustrato de ensayo.

### **3.3.2. Evaluación del crudo enzimático sobre procianidina B2 comercial.**

Las procianidinas también conocidas como taninos condensados son compuestos fenólicos, están ampliamente distribuidas en el reino de las plantas. Son de importancia económica para el ganado porque reducen la hinchazón en los animales rumiantes, pero al mismo tiempo tienen potencial de producir rechazo al alimento y de disminuir la absorción de los nutrientes por el organismo (Osman y Wong, 2007).

Con el fin de incrementar el valor nutricional de las procianidinas presentes en diferentes subproductos, se han realizados trabajos para degradarlas a través de la catálisis

enzimática, aunque las procianidinas han mostrado resistencia a la degradación y han tenido efectos tóxicos. Varios microorganismos, principalmente bacterias pueden ser tolerantes y degradar taninos condensados (Bhat y col., 1998), el primer intento para dilucidar el mecanismo de degradación de la procianidina por hongos filamentosos fue reportado por Contreras-Domínguez y colaboradores (2006).

Todos los crudos enzimáticos de las cepas de *Pleurotus* spp. fueron evaluados frente a la procianidina B2 comercial, mostrando la transformación de ésta en los tres primeros días de fermentación la cual se mantiene hasta el final de la fermentación (Figura 32).

Todas las cepas biotransforman la procianidina B2 en más de un 80% a las 72 horas de fermentación (Figura 33) siendo este valor superior al reportado por Contreras-Domínguez y colaboradores (2006) que cultivan *Aspergillus* spp. sobre procianidina B2 como fuente de carbono y obtienen un degradación del 30% a las 72 horas de cultivo.

Realizando una valoración de la cepa CCEBI 3023, la de mayor actividad enzimática, en el comportamiento de los cromatogramas (Figuras 34a y b) se observa la desaparición del pico de procianidina B2 desde las 48 horas de fermentación, lo que indica la mayor biotransformación de esta enzima sobre este tanino condensado.

Con estos resultados se incorpora al esquema de la tecnología integral la producción de enzimas, dando mayor valor a la pulpa de café.

#### **3.4. Evaluación técnico económica de una planta productora de setas comestibles.**

Finalmente partiendo de los resultados experimentales obtenidos y evaluando la capacidad biotransformadora de *Pleurotus* spp. se realizó una evaluación técnico económica de una planta productora de setas comestibles.

Para la producción de setas comestibles *Pleurotus* sobre pulpa de café se requiere de la proyección de una planta tecnológica que responda a: una demanda determinada, una política ambiental adecuada, una calidad en la producción terminada y un grado de flexibilidad que le permita absorber, sin variar su efectividad, cambios en las condiciones y factores que originalmente se planificaron (Portuondo, 1985; Brizuela, 1987).

La tarea de proyección contiene básicamente los siguientes aspectos:

- Capacidad de la planta: 60 ton año<sup>-1</sup>
- Calidad del producto terminado: Setas NORA'S con certificado de calidad de producto alimenticio según norma elaborada al efecto.
- Ubicación de la planta: Se valoran dos variantes:  
A: Planta rural, cercana a las materias primas.  
B: Planta ubicada en zona urbana, cercana al mercado.
- Características de las materias primas a emplear: Pulpa de café (*Coffea arábica*, *C. canephora*), secada al sol.
- Características del agua y la energía eléctrica a emplear: Agua potable y energía del sistema electroenergético nacional.
- Informaciones sobre las condiciones climáticas: Son preferibles lugares sombreados, frescos y en donde no varíen mucho la temperatura de aire entre el día y la noche. Puede ser aprovechada una zona arbolada.
- Vinculación con otros centros industriales cercanos:

Variante A: Cercana al centro de beneficio húmedo donde se genera la pulpa de café y a la planta de biogás.

Variante B: Cercana al centro de elaboración de alimentos.

- Viales y acceso a la planta En ambas variantes se requieren de acceso directo por terraplén o carretera. Para la variante A se requiere de transporte típico de la montaña.
  - Métodos para la recepción de materia prima y entrega de productos terminados:

Variante A: Recibirá la pulpa de café fresca y entregará las setas frescas para su transportación refrigerada hasta el lugar de consumo.

Variante B: Recibirá la pulpa de café transportada en sacos y entregará setas frescas listas para su empaque o procesamiento en el centro de elaboración de alimentos.

- Otros requerimientos: No olvidar que se trabaja con un ser vivo y necesita ciertos requerimientos de asepsia y saneamiento, con el fin de eliminar contaminaciones. El producto terminado es un alimento y requiere requisitos especiales de manipulación.

Luego de confeccionada la tarea de proyección, se procede al diseño de la planta.

#### **Costo de inversión estimado.**

La planta que se diseñe en cada caso deberá contar con las siguientes áreas: tratamiento del sustrato, laboratorio, producción y conservación y empaque del producto.

La variante A se aprovechará la infraestructura del centro de beneficio húmedo del café, lo cual reduce el costo de inversión (Tabla 36).

El equipamiento solo representa el 8% del costo de inversión y en él se consideran los equipos tecnológicos, de laboratorio y transporte, además de la estantería para la producción (Tabla 37).

En el componente “otros gastos” se incluye lo estimado para el proyecto técnico ejecutivo, facilidades temporales de los constructores, etc.

**Costo de producción estimado.**

El cálculo del costo de producción se realiza con datos aportados por la planta de investigación-producción del CEBI (Tabla 38).

Régimen de producción: Fase productiva (290 días), limpieza y mantenimiento (30 días), reserva tecnológica (45 días) (se considera el tiempo de preparación del inóculo).

Colonización: 12 días  $\text{mes}^{-1}$ ; producción: 8 ciclos al año de tres cosechas cada uno; rendimiento: 20 % y eficiencia biológica: 100 %.

La pulpa de café se valoró a \$ 22.00/ton de acuerdo al valor ofrecido por los administrativos de las despulpadoras.

La plantilla propuesta es de 13 trabajadores, se trabajará en 2 turnos diarios. Los niveles salariales por categoría fueron tomados según lo establecido por el Comité Estatal del Trabajo y Seguridad Social (Tabla 39) y se asume 10 años como vida útil económica de inversión.

El costo de distribución asumido representa el 15% del precio de las setas (\$ 6 000 CUC/ton) de acuerdo a valoraciones similares realizadas en otros países para productos de la Industria Alimenticia.

El combustible (gas oíl) se valora como \$ 273,43 CUC/ton.

El trigo se valora en \$ 413.03CUP/ton, según Departamento de Comercialización y Ventas de la Empresa Molinera Santiago.

El precio las bolsas de polietileno y papel aluminio fueron tomados de catálogos.

El valor asumido para el cálculo de las prestaciones sociales fue de 25% sobre salarios.

Los costos unitarios por tonelada de setas (Tabla 40) muestran que:

El costo de la mano de obra total (salarios directos, seguridad social y prestaciones), de la comercialización y la depreciación representan un 79% del costo de producción.

Los insumos materiales son el 16% del costo total, lo cual resulta beneficioso para la economía de la planta y el territorio. Los consumos de agua, electricidad y combustible representan el 3% del costo.

Los gastos en CUC representan un 9% del costo de producción estimado, lo cual indica que las setas deben venderse en ambas monedas.

**Valoración de indicadores de eficiencia económica y económico-financiero.**

En la Tabla 41 se pueden observar algunos de los indicadores de eficiencia económica generalmente usados para demostrar la viabilidad económica de un proceso tecnológico.

El proceso tecnológico resulta atractivo y podrán lograrse mejores resultados si se eleva la capacidad hasta 100ton año<sup>-1</sup>, lo cual es viable y no requiere de una elevación proporcional de los costos.

La tasa de rentabilidad sobre la inversión inicial (45%) es superior a los índices comunes para la agroindustria en general (ICIDCA, 1998).

Los resultados del análisis económico financiero en forma de flujo económico neto (sin financiamiento externo) en un horizonte de siete años (Tabla 42) muestran un valor actualizado neto de \$ 230 526 y una tasa de interna de retorno de 16,2%, lo que significa que se sufraga la inversión y se obtienen ganancias. Al cuarto año de explotación de la planta, se recupera la inversión.

## CONCLUSIONES

1. Se incorpora a la tecnología establecida las cepas CCEBI 3021 y CCEBI 3027 como las más productoras de setas comestibles *Pleurotus* con 4,5 y 3,4 g de setas frescas por gramo de sustrato seco en un día, respectivamente, bajo las condiciones estudiadas.
2. Se logró una influencia positiva en la producción de setas al mezclar la pulpa de café con otros sustratos lignocelulósicos, al disminuir el número de bolsas contaminadas y aumentar la cantidad de setas por unidad de sustrato y tiempo.
3. Para una misma cepa los valores de eficiencia biológica son mayores en el sustrato que posee mayor contenido de nitrógeno, que es la pulpa de café con 2,9% base seca.
4. Se logró con el empleo de la fermentación sólida en medio natural establecer el procedimiento tecnológico de producción de setas comestibles, ampliando la variedad de subproductos lignocelulósicos a utilizar y las técnicas para su procesamiento, ofreciendo una vía de valorización de estos subproductos.
5. Se logró emplear las columnas Raimbault como biorreactor de FES para el estudio de la fase vegetativa de *Pleurotus* spp. a través de la producción de biomasa y enzimas lacasas, durante siete días de fermentación sobre pulpa de café con las siguientes condiciones: temperatura:  $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , flujo de aire para cada columna:  $2\text{mL min}^{-1}\text{ g}^{-1}$  de sustrato seco y 10% (peso/peso) de inóculo.



6. Se seleccionó la cepa *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3023 como la mejor productora de enzimas lacasas, al mostrar los valores más altos de actividad lacasa 25,25 Ug<sup>-1</sup>en columnas de 30g (pequeñas); 23,70 Ug<sup>-1</sup>en columnas de 150g (medias) y 1,74 U g<sup>-1</sup>en nivel productivo con bolsas polietileno.
7. Las cepas de *Pleurotus* spp. estudiadas disminuyeron las concentraciones de los compuestos tóxicos de la pulpa de café, con máximos de 53% para los fenoles totales y 24% para la cafeína. Todos los crudos enzimáticos producidos por estas transformaron al tanino condensado procianidina B2 en diferente extensión; la cepa *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3023 fue la mejor biotransformadora (100%), superior a la referida con hongos filamentosos del género *Aspergillus*.

## **RECOMENDACIONES**

1. Continuar estudiando la influencia del contenido de nitrógeno en el sustrato de siembra durante la etapa de fructificación del *Pleurotus* spp.
2. Continuar estudiando en la producción de enzimas lacasas por fermentación sólida de la pulpa de café, la presencia de isoenzimas y su caracterización bioquímica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- A**costa–Urdapilleta L, Bustos–Sagal G, Portugal D. (1988) Aislamiento y caracterización de cepas de *Pleurotus ostreatus* y su cultivo en residuos agroindustriales en el Estado de Morelos. *Revista Mexicana de Micología* 4:13–20.
- Adler E. (1997) Lignin chemistry. Past, present and future. *Wood Science and Technology* 11:169-218.
- Aehle W. (2004) *Enzymes in Industry*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. ISBN: 3-527-29592-5.
- Aguilar CN, Favela-Torres E, Viniegra-González G, Augur C. (2002) Culture conditions dictate protease and tannase production in submerged and solid-state cultures of *Aspergillus niger* Aa-20. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 102:407-414.
- Alarcón-Gutierrez E, Bruno C, Augur C, Virgile C, Steven C. (2008) Effects of nitrogen availability on microbial activities, densities and functional diversities involved in the degradation of a Mediterranean evergreen oak litter (*Quercus ilex* L.) *Soil Biology and Biochemistry* 40:1654-1661.
- APHA. (1998) *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20<sup>th</sup> Edition, Washington D.C, USA.
- Arunachalam MN, Mohan N, Sugadev R, Chellappaan P, Mahadevan A. (2003) Degradation of (+)-catechin by *Acinetobacter calcoaceticus* MTC 127. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1621(3):261-265.
- B**ailey MJ, Biely P, Poutanen K. (1992) Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* 23:257–270.

- Barlocher F y Graca MSA. (2005) Total phenolic. Capítulo 14. *En: Methods to study litter decomposition: A practical guide.* MSA Graca, F Barlocher, MO Gessner (eds.) Springer. Printed in the Netherlands. pp:97-100.
- Bermúdez RC, Cárdenas JR, Serrat M, García N, Gross P, Orberá T. (1999) Caracterización técnica socio económica y ambiental de las despulpadoras de café de la provincia Santiago de Cuba. Informe Técnico de Proyecto Nacional de Ciencia y Técnica “Valorización de los residuales del café”. Centro Estudios Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente. 120pp.
- Bermúdez RC, Donoso C, Martínez CE, Ramos EI, Morris HJ. (2002) Efecto de la luz en la concentración de micosteroides de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición* 16:13-18.
- Bermúdez RC, Morris HJ, Donoso C, Martínez CE, Ramos EI. (2003) Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 22: 226-231.
- Bermúdez RC, Traba JA, Verdecía M, Gross P. (1994) Producción de *Pleurotus sp.* cfr. *florida* sobre los residuales de la agroindustria cafetalera en Cuba. *Micología Neotropical Aplicada* 7:47-50.
- Bernabé-González T, Cayetano-Catarino M, Adán-Díaz A, Torres-Pastana MA. (2005) Cultivo de *Pleurotus pulmonarius* sobre diversos subproductos agrícolas de Guerrero, México. *Revista Mexicana Micología* 18:77-80.
- Bhat TK, Singh B, Sharma OP. (1998) Microbial degradation of tannins e a current perspectiva. *Biodegradation* 9 (5):343-357.
- Blanchette RA. (1991) Delignification by wood-decay fungi. *Annual Review of Phytopathology* 29: 381-398.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the pinciple of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brand D, Pandey A, Rodríguez-León J, Roussos S, Brand I, Soccol CR. (2001) Packed bed column fermenter and kinetic modeling for upgrading the nutritional quality of coffee husk in solid-state fermentation. *Biotechnology Progress* 17(6):1065-1070.

- Brand D, Pandey A, Roussos S, Soccol CR. (2000) Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enzyme and Microbial Technology* 27(1-2):127-133.
- Brealey RA, Myers SC, Allen F. (2006) Principios de finanzas corporativas. Octava edición. McGraw-Hill Companies, Inc., España. pp.1138.
- 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. pp: 143-152.
- Brizuela E. (1987) Aspectos fundamentales en el diseño de plantas industriales. Editorial ISPJAE. La Habana. Cuba. pp: 773.
- Brock T, Madigan M, Martinko J, Parker J. (1994) *Biology of microorganisms*. Seventh edition. Prentice-Hall International, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- Calvo L y Sánchez-Vázquez J. (1993) Producción de hongos comestibles en condiciones rústicas bajo un cacaotal y utilizando cáscara de coco como sustrato. *En: Proceeding of 11<sup>th</sup> Internacional Cocoa Research Conference 18-24 July*. Cocoa Producers Alliance, Yamoussoukro, Ivory Coast.
- Cliffe S, Fawer MS, Takara G, Ritter G. (1994) Enzyme assays for the phenolic content of natural juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42:1824-1828.
- Contreras-Domínguez M, Guyot S, Marnet N, Le Petit J, Perraud-Gaime I, Roussos S, Augur C. (2006) Degradation of procyanidins by *Aspergillus fumigatus*: Identification of a novel aromatic ring cleavage product. *Biochimie*, 88:1899-1906.
- Contreras-Domínguez M. (2007) Dégradation de tanins condensés par des champignons filamenteux: analyse structurelle et enzymatique. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias y Tecnología Paul Cezanne, Universidad de Marsella, Francia, 160p.
- Córdova-López J, Gutiérrez-Rojas M, Huerta S, Saucedo-Castañeda G, Favela-Torres E. (1996) Biomass estimation of *Aspergillus niger* growing on real and model supports in solid state fermentation. *Biotechnology Techniques* 10:1-6.

- Crawford RL. (1981) Lignin biodegradation and transformation, Wiley Interscience, New York.
- Chang ST. (2005) Mushroom biology the impact on mushroom production and mushroom products *En: 5th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, Shanghai, RP China.
- Chang ST. (2007) Mushroom cultivation using the “ZERI” principle: potential for application in Brazil. *Micología Aplicada Internacional*, 19(2):33-34.
- Chen CL y Chang HM. (1985) Chemistry of lignin biodegradation. *En: Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*. Editorial Higuchi T. pp:535-555.
- D**ahiya J, Singh D, Nigam P. (2001) Decolourisation of synthetic and spentwash melanoidins using the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* JAG-40. *Bioresource Technology* 78:95-98.
- De Souza DF, Tychanowicz GK, Marques de Souza CG, Peralta RM. (2006) Co-production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state cultures. *Journal of Basic Microbiology* 46(2):126-134.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356.
- Dufour D. (1990). Contribution à l'étude de la physiologie des champignons pectolytiques, cultivés en milieu solide, en relation avec la respiration et la synthèse de pectinases. Tesis Doctoral. Universidad Tecnológica de Compiègne, Francia, 263p.
- Durand A. (2003) Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13(2-3):113-125.
- Dustet JC y 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* 21:85-91.

- E**lías LG (1979) Composición química de la pulpa de café y otros subproductos. *En: Pulpa de café: composición, tecnología y utilización*. Braham JB y Bressani R. (eds.) International Development Research Center Ottawa, Canadá. pp:19-29.
- Elisashvili V, Parlar H, Kachlishvili E, Chichua D, Bakradze M, Kokhreidze N, Kvesitadze G. (2001) Ligninolytic activity of basidiomycetes grown under submerged and solid-state fermentation on plant raw material (sawdust of grapevine cuttings). *Advances in Food Sciences* 23(3):117-123.
- Elisashvili V, Penninckx M, Kachlishvili E, Asatiani M, Kvesitadze G. (2006) Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme and Microbial Technology* 38:998-1004.
- Evans CS, Dutton MV, Guillen F, Veness RG. (1994) Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiology Reviews* 13:235-240.
- F**an L, Pandey A, Mohan R, Soccol CR. (2000) Use of various coffee industry residues for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. *Acta Biotechnologica* 20(1):41-52.
- Fan LA, Soccol T, Pandey A, Soccol CR. (2003) Cultivation of *Pleurotus* mushrooms on Brazilian coffee husk and effects of caffeine and tannic acid. *Micología Aplicada Internacional* 15(1):15-21.
- Fernández F. (2004) Guía práctica de producción de setas (*Pleurotus spp.*) Fungitec Asesorías, Guadalajara, Jalisco, México. 54p.
- Field JA, de Jong E, Feijoo-Costa G, de Bont JAM. (1993) Screening for lignolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends in Biotechnology* 11:44-49.
- G**aime-Perraud I. (1995) Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. Tesis Doctoral, Universidad de Montpellier, Francia, 228p.

- García N, Bermúdez RC (tutora). (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.
- Gessner M y Steiner D. (2005) Acid butanol assay for proanthocyanidins (condensed tannins). Chapter 16. *En: Methods to study litter decomposition: A practical guide.* MSA Graca, F Barlocher, MO Gessner (eds.) Springer. Printed in the Netherlands. pp:107-113.
- Giardina P, Palmieri G, Fontanella B, Riviaccio V, Sannia G. (2000) Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 376(1):171-179.
- Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Faraco V, Cennamo G, Sannia G. (1999) Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal* 34:655-663.
- González TB, Domínguez MS, Bautista S. (1993) Cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* var. *Florida* sobre fibra de coco y pulpa de café. *Revista Mexicana de Micología* 9:13-18.
- 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 Master en Biotecnología. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Universidad de Oriente. 52 pp.
- Gutiérrez I y González AL. (1998) Caracterización de residuos del cultivo de hongos comestibles para alimento animal. *Revista ICIDCA XXXII(1):84-91.*
- Guzmán G, Mata G, Salmones D, Soto-Velasco C, Guzmán-Dávalos L. (1993) El cultivo de los hongos comestibles con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales. Edición IPN. México D.F.
- Hashimoto K y Takahashi Z. (1974) Studies on the growth of *Pleurotus ostreatus*. *Mushroom Science* 9 (Part I):31-36.



- Hassouni H, Ismaili-Alaoui M, Gaime-Perraud I, Augur C, Roussos S. (2006) Effect of culture media and fermentation parameters on phytase production by the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* in solid state fermentation. *Micología Aplicada Internacional* 18(2):29-36.
- Hatvani N, Kesserú P, Mécs I. (2003) Effects of different inorganic salts and organic nutrient components on the growth of *Lentinula edodes* (Shiitake) mycelium on solid medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83:1439-1444.
- Higson FK. (1991) Degradation of xenobiotics by white rot fungi. *En: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Ware GW (ed). Springer Verlag, New York, Berlín.
- Hölker U y Lenz J. (2005) Solid–State fermentation – are there any biotechnological advantages?. *Current Opinión in Microbiology* 8:301-306.
- Hong JS. (1978) Studies on the physicochemical properties and the cultivation of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Journal of Korean Agricultural Chemical Society* 21(3):150-184.
- Hou H, Zhou J, Wang J, Du C, Yan B. (2004) Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry* 39:1415-1419.
- Howard R, Abotsi E, Jansen E, Howard S. (2003) Review. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* 2(12):602-619.
- Hunsigi, G. (1989) Agricultural fibers for paper pulp. *Outlook on agriculture*. Pergamon Press, vol. 18 (3):96-103.
- ICIDCA**. 1998. Producción de setas comestibles del género *Pleurotus* spp. Instituto Cubano de los Derivados de la Caña de Azúcar, Ministerio del Azúcar, La Habana, Cuba. pp:42.
- Ikehata K, Buchanan I, Smith D. (2004) Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidase and laccases for waste treatment. *Journal Environmental Engineering and Science* 3:1-19.

In der Wiesche C, Molter M, Zadrazil S, Aksu S. (2000) Activities of ligninolytic enzymes as a means for monitoring the colonization of straw substrate pretreated at different temperatures by *Pleurotus ostreatus*. *Mushroom Science* 15:391–398.

Índice Fungorum. [www.indexfungorum.org/Names/Names.asp](http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp). revisado el 20 de octubre del 2008.

Jaouani A, Guillén F, Penninckx M, Martínez AT, Martínez AT. (2005) Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme and Microbial Technology* 36(4):478-486.

Job D. (2004) La utilización de la borra del café como substrato de base para el cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer. *Revista Iberoamericana de Micología* 21:195-197.

Julián MC y Ramos LB (2007) Fermentación en estado sólido (i). Producción de alimento animal. *Tecnología Química XXVII* (3):17-22.

Kachlishvili E, Penninckx MJ, Tsiklauri N, Elisashvili V. (2005) Effect of nitrogen source on lignocellulosic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.

Kahraman S y Gurdal I. (2002) Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. *Bioresource Technology* 82:215-217.

Kamitsuji H, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M. (2005) Mn<sup>2+</sup> is dispensable for the production of active MnP2 by *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 327:871-876.

Kapich AN, Prior BA, Botha A, Galkin S, Lundell T, Hatakka A. (2004) Effect of lignocellulose-containing substrate on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochate chrysosporium* ME-446. *Enzyme and Microbial Technology* 34:187-189.

Kerem Z y Hadar Y. (1998) Lignin-Degrading Fungi: mechanisms and utilization. *Agricultural Biotechnology* 27:351-365.

- Kersten PJ, Kalyanaraman B, Hammel KE, Reinhammar B, Kirk TK. (1990) Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Biochemical Journal* 268:475-480.
- Kirk TK y Farrell RL. (1987) Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41:465-505.
- Klibansky M, Mansur M, Gutiérrez I. (1993) Productions of *Pleurotus ostreatus* mushrooms on sugar cane agrowastes. *Acta Biotechnology*. 13(1):71-78.
- Kong WS. (2005) Capítulo 4 Inóculo (Semilla o Spawn). *En: Manual del cultivador de hongos 1. Cultivo del hongo ostra*. Publicado por MushWord, Corea. pp:60-68.
- Kourouma A. (2007) Obtención de lacasas de *Pleurotus sp.* en residuales del café. Tesis de Master en Biotecnología. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Universidad de Oriente. 42p.
- Kreiser WR y Martin RA Jr. (1978) High pressure liquid chromatographic determination of theobromine and caffeine in cocoa and chocolate products. *Journal of AOAC International* 61(6):1424-1427.
- 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. pp:150-165.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Leifa F, Pandey A, Soccol CR. (2000) Solid state cultivation-an efficient method to use toxic agro-industrial residues. *Journal of Basic Microbiology* 40(3):187-197.
- Leonowicz A, Cho N, Wasilewska M, Rogalski J, Luterek J. (1997) Enzymes of white-rot fungi cooperate in biodeterioration of lignin barrier. *Journal Korean Wood Science Technology* 25:1-20.
- Leonowicz A, Cho NS, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenberg D. (2001) Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal of Basic Microbiology* 41:185-227.

- López EH, Ancona L, Medina S. (2005) Cultivo de *Pleurotus djamor* en condiciones de laboratorio y en una casa rural tropical. *Revista Mexicana de Micología* 21:93-97.
- López RI, Delmastro S, Curvetto NR. (2008) Spent oyster mushroom substrate in a mix with organic soil for plant pot cultivation. *Micología Aplicada International* 20(1):17-26.
- Mandeeel QA, Al-Laith AA, Mohamed SA. (2005) Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*) on various lignocellulosic wastes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21:601–607.
- Manu-Tawiah W y Martín AM. (1988) Nitrogen sources and the growth response of *Pleurotus ostreatus* mushrooms mycelium. *Canadian Institute Food Science and Technology Journal* 21(2):194-199.
- Marques de Souza CG y Peralta R. (2003) Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *Journal of Basic Microbiology* 43 (4):278-286.
- Marques de Souza CG, Tychanowicz G, Farani D, Peralta RM. (2004) Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *Journal of Basic Microbiology* 44:129-136.
- Marques de Souza CG, Zilly A, Peralta RM. (2002) Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *Journal of Basic Microbiology* 42(2):83-90.
- Martínez-Carrera D, Aguilar A, Martínez W, Bonilla M, Morales P, Sobal M. (2000) Commercial production and marketing of edible mushrooms cultivated on coffee pulp in Mexico. Capítulo 45 *En: Coffee Biotechnology and Quality*. Sera T, Soccol CR, Pandey A, Roussos S. (eds.) Kluwer Academic Publisher. pp: 471-488.
- Martínez-Carrera D, Soto C, Guzmán G. (1985) Cultivation of *Pleurotus ostreatus* on coffee pulp with straw as substrate. *Revista Mexicana de Micología* 1:101-108.
- Martínez-Carrera D. (1987) Design of a mushroom farm for growing *Pleurotus* on coffee pulp. *Mushrooms Journal Tropics* 7:13-23.

- Martínez–Carrera D. (1989) Simple technology to cultivate *Pleurotus* on coffee pulp in the tropics. *Mushroom Science* 12 (II):169–178.
- Martirani L, Giardina P, Mrzullo L, Sannia G. (1996) Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* 30:1914-1918.
- Mata G, Murrieta-Hernández DM, Iglesias-Andreu LG. (2005) Changes in lignocellulolytic enzyme activities in six *Pleurotus spp.* strains cultivated on coffee pulp in confrontation with *Trichoderma spp.* *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21:143–150.
- Menchaca, R. (2008) El café nuestro de cada día. <http://cubahora.co.cu>
- Miller GL. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* 31:426-428.
- Mitchell D, Pandey A, Sangsurasak P, Krieger N. (1999) Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 35(1-2):167-178.
- Moldes D, Lorenzo M, Sanromán MA. (2004) Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. *Biotechnology Letters* 26:327-330.
- Morais H, Forgács E, Cserhádi T. (2005) Enzyme production of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* in shaken cultures completed with agro-industrial wastes. *Engineering Life Science* 5 (2):152-157.
- Morais H, Ramos C, Matos N, Forgacs E, Cserhati T, Almeida V, Oliveira J, Darwish Y, Illes Z. (2002) Liquid chromatographic and electrophoretic characterisation of extracellular b-glucosidase of *Pleurotus ostreatus* grown in organic waste. *Journal of Chromatography B*, 770:111–119.
- Morris HJ, Marcos J, Llauradó G, Fontaine R, Tamayo V, García N, Bermúdez RC. (2003) Immunomodulating effects of hot-water extract from *Pleurotus ostreatus* mycelium on cyclophosphamide treated mice. *Micología Aplicada International* 15:7-13.

- Morris HJ, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, Llauro G, Marcos J. (2007) A note on the in vitro macrophage stimulating activity of water soluble extracts from mycelium of *Pleurotus* spp. *Food and Agricultural Immunology* 18:31-37.
- Muñoz C, Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ. (1997) Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn<sup>2+</sup> oxidation. *Applied Environmental Microbiology* 63:2166-2174.
- Murrieta DM, Mata G, Iglesias L. (2002) Cambios en la producción de lacasa por el hongo *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. cultivado en pulpa de café en confrontación con *Trichoderma viride* Pers., un moho contaminante. *Foresta Veracruzana* 4(1):47-52.
- Nieto IJ, Chegwin C, Osorio H. (2007) Incorporación de cafeína en el hongo *Pleurotus sajor-caju* cultivado sobre pulpa de café. *Revista Iberoamericana de Micología* 24:72-74.
- Normas Cubanas NC:86-05:1984. (1984) Determinación de proteína. Comité Estatal de Normalización, nivel central. La Habana, Cuba.
- OIC, Organización Internacional del Café. (2008) Carta del Director Ejecutivo, Informe sobre el mercado del café, Mayo 2008. <http://www.ico.org/documents/>
- Oriol E, Contreras R, Raimbault M. (1987) Use of microcalorimetry for monitoring the solid state culture of *Aspergillus niger*. *Biotechnology Techniques* 1(2):79-84.
- Ortega G y Otero M. (2001) Cinética de degradación de residuos cañeros por *P. ostreatus-pulmonarius*. *Revista ICIDCA XXXV* (2-3):35-41.
- Ortega G, Martínez E, Otero M, González AL, Torres E, Álvarez I. (1997) Caracterización química y residual del sustrato residual y cuerpos fructíferos en la producción de hongos comestibles. *Revista ICIDCA XXXI* (3):42-54.
- Ortega G. (1999) Biodegradación de residuos de la cosecha cañera con hongos del género *Pleurotus*. Tesis para optar por el título de Maestro en Microbiología. Universidad de la Habana. 81p.

- Osman AM y Wong KKY. (2007) Laccase (EC 1.10.3.2) catalyses the conversion of procyanidin B-2 (epicatechin dimmer) to type A-2. *Tetrahedron Letters* 48:1163-1167.
- Otero M. (1985) Proteína unicelular para el consumo humano. Editorial Científico Técnica, La Habana, Cuba, 118p.
- Palmieri G, Cennamo G, Faraco V, Amoresano A, Sannia G, Giardina P. (2003)** Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbiology Technology* 33:220-230.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B, Sannia G. (2000) Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:920-924.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A, Sannia G. (1997) A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry* 272:31301-31307.
- Pandey A, (1998). *Advances in Biotechnology*, Educational Publishers & distributors. Trivandrum, India, 514p.
- Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Brand D, Mohan R, Roussos S. (2000) Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 6(2):153-162.
- Pandey A. (2003) Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering*, 13:81-84.
- Pani BK y Mohanty AK. (1998) Utilization of water hyacinth as an alternative substrate to paddy straw for oyster mushrooms cultivation. *Crop Residuals* 8:145-296.
- Patra AK y Pani BK. (1995) Evaluation of banana leaf as a new alternate substrate to paddy strow for oyster mushroom cultivation. *Journal of Phytopathology Research* 8:145-148.
- 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* 2(3):343-350.

- Perraud-Gaime I, Saucedo-Castaneda G, Augur C, Roussos S. (2000) Adding value to coffee solid by-products through biotechnology. *En: Coffee Biotechnology and Quality*. Sera T, Soccol CR, Pandey A, Roussos S. (eds.) Kluwer Academic Publisher. pp:437-445.
- Pick E y Keisare YA. (1980) Simple colorimetric method for a measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunology Methods* 38:161-170.
- Pinzón LM y Ruiz ME (2004) Comprobación del tipo de pudrición y selectividad del sustrato de 15 hongos poliporoides xilófagos de los Tuxtlas, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Micología* 18:47-59.
- Poppe J. (2005) Capítulo 5 Sustrato. *En: Manual del cultivador de hongos 1. Cultivo del hongo ostra*. Publicado por MushWord, Corea. pp:83-93.
- Porres CD, Álvarez D, Calzada J. (1993) Caffeine reduction in coffee pulp through silage. *Biotechnology Advances* 11(3):519-523.
- Portuondo F. (1985) Economía de las empresas industriales. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. Cuba. pp: 734.
- Pozdnyakova N, Rodakiewicz J, Turkovskaya OV. (2004) Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 30:19-24.
- Qinnghe C, Xiaoyu Y, Tiangui N, Cheng J, Qiugang M. (2004) The screening of culture conditions and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemistry* 39:1561-1566.
- Quimio TC. (2005) Capítulo 1 Introducción a los hongos. *En: Manual del cultivador de hongos 1. Cultivo del hongo ostra*. Publicado por MushWord, Corea. pp:5-14.
- Rahardjo Y, Tramper , Rinzema A. (2006) Modeling conversión and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnology Advances* 24:161-179.



- Raimbault M y Alazard D. (1980) Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 99–209.
- Rajarithman S y Bano Z. (1987) *Pleurotus* mushrooms. Part I. Morphology, life cycle, taxonomy, breeding, and cultivation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 26 (2):157-223.
- Rajarithman S, Bano Z, Patwardhan PV. (1986) Nutrition of the mushroom *Pleurotus flabellatus* during its growth on paddy straw substrate. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 61:223-232.
- Ramírez-Coronel A, Marnet N, Kumar-Kolli VS, Roussos S, Guyot S, Augur C. (2004) Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by thiolysis-high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(5):1344-1349.
- Ramirez-Coronel A. (2004) Les tanins condensés de la pulpe de café: études structurales et dégradation enzymatique. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias y Tecnología Paul Cezanne, Universidad de Marsella, Francia, 166p.
- Ramírez-Martínez JR. (1999) Pulpa de café ensilada. Producción, caracterización y utilización en la alimentación animal. San Cristóbal, Estado Táchira, Venezuela, Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET).157p.
- Ramos I, Bermúdez RC, Donoso C, Martínez CE, García N. (1999) Utilización de los residuales del cacao como sustrato para el cultivo de *Pleurotus spp.* En: Libro de resúmenes del III Congreso Latinoamericano de Micología. Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.
- Ramos I. (1999) producción de *Pleurotus ostreatus* var. Florida sobre residuales del cacao. Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad del Chimborazo, Ecuador. 95p.
- Reid ID y Seifert KA. (1982) Effect of an atmosphere of oxygen on growth, respiration and lignin degradation by white-rot fungi. *Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne de Botanique* 60:252-269.

- Rinker DL, ZERI, Woo S. (2005) Capítulo 9 Manejo post-cosecha. Reciclado del sustrato gastado (residual) de hongo ostra. *En: Manual del cultivador de hongos 1. Cultivo del hongo ostra. Publicado por MushWord, Corea :202-207.*
- Rodríguez N y Jaramillo V. (2005) Cultivo de hongos comestibles del género *Pleurotus* sobre residuos agrícolas de la zona cafetera. Boletín Técnico No.27. Centro Nacional de Investigaciones del Café. CENICAFE, Chinchiná-Caldas-Colombia. 56p.
- Rodríguez N y Zuluaga J. (1994) Cultivo de *Pleurotus pulmonarius* en pulpa de café. *Cenicafé* 45(3):81-92.
- Rodríguez S, García N, Bermúdez RC, Fernández M, Augur C. (2008) Decolourisation of mushroom farm wastewater by *Pleurotus ostreatus*. *Biodegradation* 19:519-526.
- Rodríguez S. (2006) Decoloración de los residuales de la pasteurización de la pulpa de café y la vinaza por *Pleurotus sp.* Tesis doctoral. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente. 107p.
- Rodríguez-Couto S y Sanromán MA. (2005) Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal* 22(3):211-219.
- Rodríguez-Couto S y Sanromán MA. (2005)a Coconut flesh: a novel raw material for laccase production by *Trametes hirsuta* under solid-state conditions: Application to Lissamine Green B decolourization. *Journal of Food Engineering* 71(2):208-213.
- Rodríguez-Couto S y Sanromán MA. (2006) Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering* 76(3):291-302.
- Rodríguez-Couto S, Rosales E, Gundín M, Sanromán MA. (2004) Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* species. *Journal of Food Engineering* 64(4):423-428.
- Roussos S, Augur C, Perraud-Gaime I, Pyle DL, Saucedo-Castañeda G, Soccol CR. (2000) Development of bioprocesses for the conservation, detoxification and value-addition of coffee pulp and coffee husk. *En: Coffee Biotechnoly and*

- Quality. Sera T, Soccol CR, Pandey A, Roussos S. (eds.) Kluwer Academic Publisher. pp: 377-392.
- Roussos S. (1985) Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: physiologie, sporulation et production de cellulases. Tesis doctoral. Universidad de Provence, Francia, 163p.
- Salmones D y Mata G. (2002) Detection of extracellular enzymes produced by *Pleurotus spp.* grown on coffee pulp. *En: Proceedings of the Fourth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products.* Sánchez y col. (eds.) UAEM. ISBN 968-878-105-3. pp:213-219.
- Salmones D y Mata G. (2007) Determinación de la variabilidad de respuesta de micelios de *Pleurotus* vs. *Trichoderma* en medios de cultivo con derivados solubles de lignina y pulpa de café. *Revista Mexicana de Micología* 25:77-81.
- Salmones D, Mata G, Guzmán G, Juárez M, Montoya L. (1995) Estudios sobre el género *Pleurotus*, V. Producción a nivel de planta piloto de ocho cepas adscriptas a cinco taxa. *Revista Iberoamericana de Micología* 12:108-110.
- Salmones D, Mata G, Waliszewski K. (2005) Comparative culturing of *Pleurotus spp.* on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource Technology* 96:537-544.
- Salmones D, Pérez R, Gaitán-Hernández R, Guzmán G. (1997) Estudios sobre el género *Pleurotus*, VIII. Interacción entre crecimiento micelial y productividad. *Revista Iberoamericana de Micología* 14:173-176.
- Sánchez JE y Royse D. (2002) La biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* Editorial ECOSUR /LIMUSA, México.
- Sarkar S, Martínez AT, Martínez MJ. (1997) Biochemical and molecular characterization of manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical and Biophysical Acta* 1339:23-30.
- Sasson A. (1993) La alimentación del hombre del mañana. Editorial Reverté, S.A., Barcelona.807p.

- Saucedo-Castañeda G. (1991) Contrôle du métabolisme de *Schwanniomyces castellii* cultivé sur support solide. Tesis doctoral Universidad de Montpellier, Francia, 212p.
- Serrat M. (1998) Potencialidades de las levaduras en el aprovechamiento de los residuales del café. Tesis de Master en Biotecnología. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Universidad de Oriente. 65p.
- Sobal M, Martínez-Carreras M, Morales P, Roussos S. (2007) Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of México. *Micología Aplicada Internacional* 19(1):15-23.
- Socol CR y Vandenberghe L. (2003) Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal* 13:205–218.
- Socol CR. (1992) Physiologie et métabolisme de *Rhizopus* en culture solide et submergée en relation avec la dégradation d'amidon cru et la production d'acide L(+) Lactique. Tesis Doctoral. Universidad Tecnológica de Compiègne, Francia, 218p.
- Stajic M, Persky L, Friesem D, Hadar Y, Wasser SP, Nevo E, Vukojevic J. (2006) Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology* 38:65-73.
- Suguimoto HH, Barbosa AM, Dekker RFH, Castro-Gomez RJH. (2001) Veratryl alcohol stimulates fruiting body formation in the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters* 194(2):235-238.
- Tekere M, Zvauya R, Read JS. (2001) Ligninolytic enzyme production in selected sub-tropical white-rot fungi under different culture conditions. *Journal of Basic Microbiology* 41:115-129.
- Téllez-Téllez M, Sánchez C, Loera O, Díaz-Godínez G. (2005) Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase of *Pleurotus* species. *Biotechnology Letters* 27:1391–1394.

- Thurston C. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140:19-26.
- Tien M y Kirk TK. (1984) Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology* 161:238-249.
- Traba JA, Marañón A, Bermúdez RC, Verdecía M, Santana M, Fernández M. (1994) Caracterización de residuales sólidos del café, especie *Coffea arabica* L. *Ciencia* 45:375–380.
- Trejo-Hernández M, Raimbault M, Roussos S, Losane B. (1992) Potential of solid-state fermentation for production of ergot alkaloids. *Letters in Applied Microbiology* 15(4):156-159.
- Tschierpe HJ y Hartmann K. (1977) A comparison of different growing methods. *Mushroom Journal* 60:404-416.
- Tsiklauri DN, Khardziani ShT, Kachlishvili TE, Elisashvili IV. (1999) Cellulase and xylanase activities of higher Basidiomycetes during bioconversión of plant raw material depending on the carbon source in the nutrient medium. *Applied Biochemistry and Microbiology* 35(3):291–295.
- Ulloa JB, Verte J, Amato S, Huisman EA. (2003) Biological treatments affect the chemical composition of coffee pulp. *Bioresource Technology* 89:267–274.
- Valásková V y Baldrian P. (2006) Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. *Research in Microbiology* 157:119-124.
- Vares T, Kalsi M, Hatakka A. (1995) Lignin peroxidases, manganese peroxidases, and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. *Applied and Environmental Microbiology* 61:3515-3520.

- Vega A, Caballero RE, García JR, Mori N. (2005) Bioconversión de residuos agroindustriales a través del cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Revista Mexicana de Micología 20:33-38.
- Velázquez-Cedeño MA, Mata G, Savoie J. (2002) Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. World Journal of Microbiology and Biotechnology 18(3):201-207.
- Vélazquez-Cedeño MA. (2005) Compétition entre *Pleurotus ostreatus* et *Trichoderma sp.* en culture sur paille de blé: role des communautés bactériennes du substrate et des laccases de *Pleurotus*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias y Tecnología Paul Cezanne, Universidad de Marsella, Francia, 165p.
- Villa Cruz V, Huerta G, Sánchez JE. (1999) Solid fermentation of a corn cob-coffee pulp mixture for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. Micología Neotropical Aplicada 11:67-74.
- Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar CN, Romero-Gómez S, Díaz-Godínez G, Augur C. (2003) Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. Biochemical Engineering Journal 13:157–167.
- W**ang HX y Nig TB. (2004) A new ribonuclease from the black oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. Peptides 25:685-687.
- Wolfenden ES y Wilson RL. (1982) Radical-cations as referente chromogens in the kinetics studies of one-electron transfer reactions. Journal of the Chemical Society of Pakistan 2:805-812.
- [www.hongoscomestibles-latinoamerica.com](http://www.hongoscomestibles-latinoamerica.com). revisado el 17 julio 2008.
- Y**aropolov A, Skorobogatko O, Vartanov S, Varfolomeyev S, Varfolomeyev S. (1994) Laccase-properties, catalytic mechanism and applicability. Applied Biochemical and Biotechnology 49:257-280.

- Zadrazil F y Kurtzman RH. (1989) Physiological and taxonomic considerations for cultivation of *Pleurotus* mushroom. *En: Tropical mushrooms, biological nature and cultivation methods*. Chang ST y Quimio TH (eds.) The Chinese University Press. pp:299-348.
- Zar JH. (1999) Bioestatistical analysis. Prentice Hall. Upper Saddle River. New Jersey, EUA. 289p.
- Zhanxi L, y Zhanhua L. (1997) Jun-cao thechnology. Asia-Pacific Edible Fungi Training Center, Fuzhou, China. 129p.
- Zouari N, Romette JL, Thomas D. (1994) Laccase electrode for the continuous-flow determination of phenolic compounds. *Biotechnology Techniques* 8:503-508.

## ANEXOS

No.1. Primera licencia sanitaria obtenida para la producción de setas comestibles No. 001/97.

Última licencia sanitaria obtenida para la producción de setas comestibles, marca NORA'S, No. 050/06 vigente hasta mayo 2009.

Certificado de renovación de la marca NORA'S, vigente hasta octubre 2015.

No.2. Tabla 43. Comparación entre varios abonos orgánicos y los obtenidos con pulpa de café y pleurotina de café (% base seca).

Tabla 44. Análisis de los diferentes tipos de humus.


No.3. Figura 35. Tecnología integral desarrollada para la producción de setas comestibles *Pleurotus*.

No.4. Tabla 45. Análisis bromatológico de las setas *Pleurotus ostreatus* (Florida) obtenidas a partir de diferentes sustratos de cultivo.

No.5. Análisis estadísticos.



Anexo No. 1



Mod. 79 - 02  
 REPUBLICA DE CUBA  
 MINISTERIO DE SALUD PUBLICA  
 HIGIENE

UNIDAD: C.P.H.E.M. Stgo MUNICIPAL: Stgo PROVINCIAL: Stgo

LICENCIA SANITARIA No. 001-97

**POR LA PRESENTE SE CONCEDE AUTORIZACION SANITARIA AL ESTABLECIMIENTO, LOCAL O TRANSPORTE**


NOMBRE - RAZON SOCIAL O NUMERO <u>Centro de Biotecnología Ind (CEBI) Biotecnología Industrial</u>		GIRO Y/O ACTIVIDAD	
TIPOS DE PRODUCTOS QUE MANIPULA <u>Hongos Comestibles genero Pleurotus</u>			
DIRECCION - CALLE, CARRETERA O FINCA <u>Campana Quebrada</u>	No. o Km. <u>3ra</u>	LOCALIDAD <u>Universidad Ota</u>	MUNICIPIO <u>Stgo</u>
ADMINISTRADOR - 1er. APELLIDO: <u>Bermudes</u>	2do. APELLIDO: <u>Savon</u>	NOMBRE: <u>Rosa Catalina</u>	No. o Km. <u>Edif. 19 Apto 1 Era B Uivers 2</u>
ENTRE <u>Stgo</u>	LOCALIDAD <u>Apto Abel SAvoná</u>	MUNICIPIO <u>Stgo</u>	PROVINCIA <u>Stgo</u>

EXPEDIDA EN

DIA <u>12</u>	MES <u>03</u>	AÑO <u>97</u>
------------------	------------------	------------------

OBSERVACIONES:

- 1 Esta Licencia deberá fijarse en lugar visible y mostrarse cuantas veces lo solicita un funcionario actuante del Ministerio de Salud Pública
- 2 Su validez es exclusiva para el Local, Establecimiento o Transporte que ampara esta Licencia y deberá renovarse si se cambia de giro, tipo de producto o Local.
- 3 Esta Licencia ampara las condiciones Sanitarias de este Local, Establecimiento o Transporte, existentes en la fecha de su expedición y podrá retirarse cuando las autoridades sanitarias estimaren que se están incumpliendo las disposiciones sanitarias vigentes.
- 4 Esta Licencia es puramente sanitaria y no exime del cumplimiento de las obligaciones complementarias.



DIRECTOR DE LA UNIDAD

B. I. G. Minisap 39 000 4 - 84



**INSTITUTO DE NUTRICION  
E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS**  
Centro Colaborador de la OMS



Calzada de Infanta 1158, La Habana 10300, Cuba  
Telefax: (537) 8708947, Tel: (537) 8794165, E-mail: inha@infomed.sld.cu

EL DIRECTOR DEL INSTITUTO DE NUTRICIÓN E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS DEL MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA DE LA REPÚBLICA DE CUBA, EN USO DE LAS FACULTADES QUE LE ESTAN CONFERIDAS:

## CERTIFICA

Que el producto SETAS COMESTIBLES (PLEUROTUS ENCURTIDO)  
Marca: NORA'S, cuyo productor suministrador  
es CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL  
procedente de SANTIAGO DE CUBA, ha sido sometido a análisis y evaluación  
del REGISTRO NACIONAL de acuerdo a lo establecido en la legislación vigente,  
encontrándose el mismo APTO para el uso consumo humano y por lo tanto se  
aprueba y autoriza por período de 3 AÑOS a partir del día de hoy con la Licencia  
Sanitaria No. 050/06.

Observaciones: \_\_\_\_\_

**UNIVERSIDAD DE ORIENTE**

Dado en la Ciudad de La Habana, 25 días del mes de Mayo del 2006.

Tomo: XLIV

Folio: 050

Dr. \_\_\_\_\_

Director







REPÚBLICA DE CUBA

El Director de la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial,  
en uso de sus facultades y de acuerdo con lo establecido  
en las disposiciones legales vigentes,  
otorga el presente:



## Certificado de Renovación de Marca.

**A favor de:** CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y ESTACION  
CENTRAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ Y CACAO

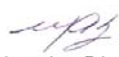
**Con domicilio en:** avenida Patricio Lumumba sin número, Finca la Mandarina,  
Cruce de los Baños, Santiago de Cuba, Santiago de Cuba, República de Cuba.

**CERTIFICADO NÚMERO:** 123375

**Válido por diez años y vigente hasta el:** 4 de octubre de 2015.  
**Consistente en:** la denominación **NORA'S** con grafismo especial y en  
caracteres gruesos.

**Para distinguir productos** solicitados en la clase 29  
de la Clasificación Internacional de Productos y Servicios para el Registro de las Marcas.

**Dado en La Habana, a 12 de abril de 2006.**

  
Ing. María de los Angeles Sánchez Torres  
Directora General  
Oficina Cubana de la Propiedad Industrial

## Anexo No. 2

Tabla 43. Comparación entre varios abonos orgánicos y los obtenidos con pulpa de café y pleurotina de café. (% base seca)

Parámetros	Materia orgánica	Nitrógeno	Fósforo	Potasio	Sodio
Pulpa de café	89,50	3,60	0,17	2,51	0,70
Pleurotina de café	96,60	3,44	0,04	0,90	1,14
Subproducto cacao	90,92	1,09	0,32	ND	0,20
Pleurotina de cacao	94,21	ND	0,28	1,34	0,11
Estiércol vacuno	56,52	2,23	0,51	0,32	0,11
Estiércol porcino	52,56	2,58	1,80	0,16	0,06
Estiércol de ave	ND	1,60	1,50	0,80	ND
Cachaza	54,60	1,52	1,53	0,14	0,06
Compost de finca	15,60	1,20	0,83	0,98	ND

Fuente: García, 1999.

Tabla 44. Análisis de los diferentes tipos de humus.

Parámetros	Humus de:		
	Estiércol vacuno	Pulpa de café	Pleurotina de café
Materia orgánica (%)	68,03	84,81	74,04
Cenizas (%)	31,97	15,19	26,31
pH	7,4	7,4	7,4
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	1 716,66	16 863,66	11 713,68
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	< 0,0005	< 0,0005	3,12
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	0,09	0,14	0,165
Sodio (mg L <sup>-1</sup> )	15,61	13,38	13,38
Fósforo (mg L <sup>-1</sup> )	19,60	19,60	9,78
Potasio (mg L <sup>-1</sup> )	104,14	142,24	83,82

Fuente: García, 1999.

## Anexo No. 3.

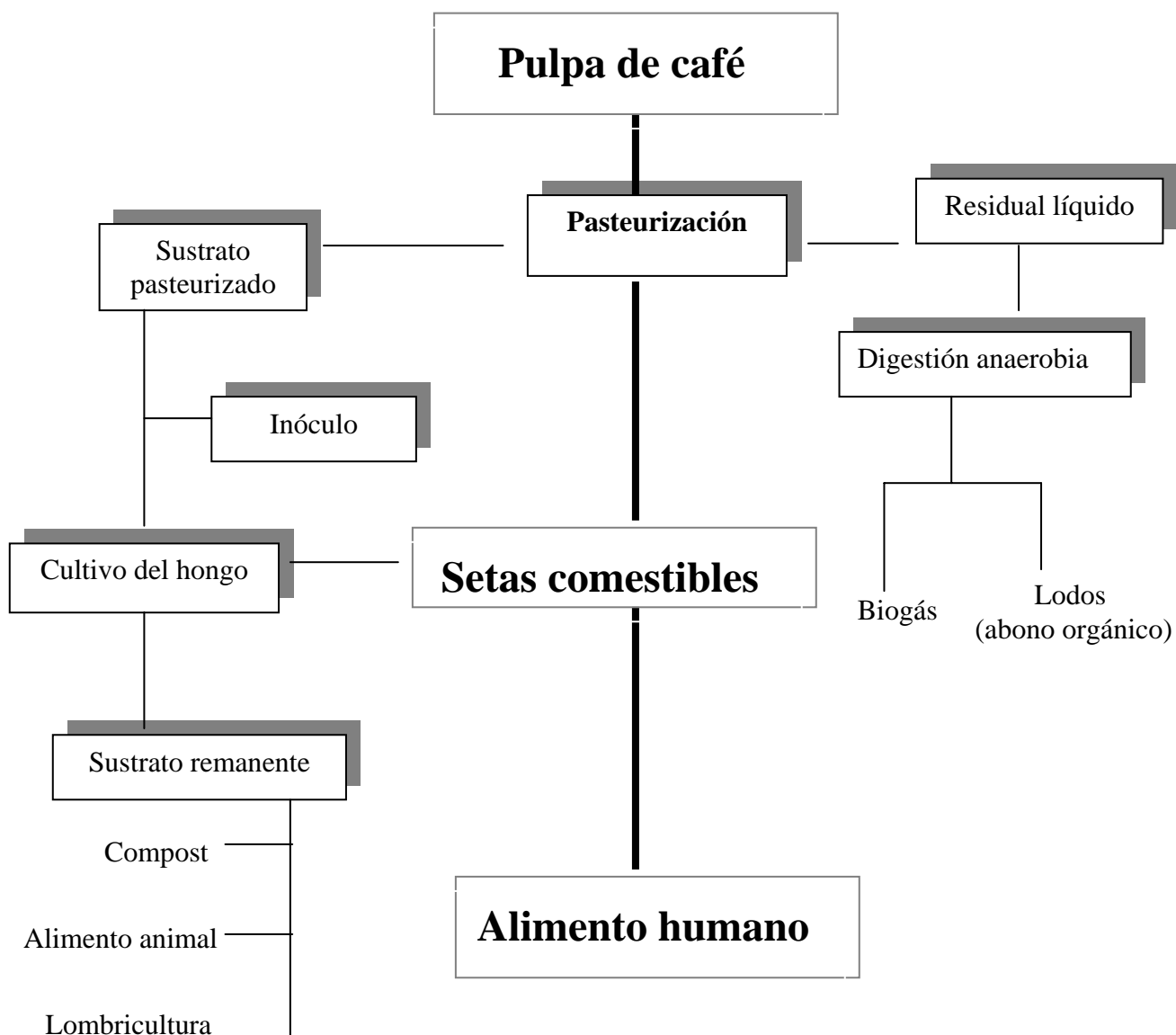


Figura 35. Tecnología integral desarrollada para la producción de setas comestibles (*Pleurotus*) a partir de los subproductos de la agroindustria del café en Cuba, incluyendo el aprovechamiento de los subproductos derivados de su aplicación.

**Anexo No. 4.**

Tabla 45. Análisis bromatológico de las setas *Pleurotus ostreatus* (Florida) obtenidas a partir de diferentes sustratos de cultivo (% , base seca).

Componente	Pulpa de café	Cáscara de cacao
Humedad	91,18	93,57
Materia seca	8,45	6,43
Proteína bruta	27,45	28,88
Fibra	7,51	20,73
Grasa	7,16	4,26
Carbohidratos	50,30	42,87
Cenizas	7,57	7,55
Ácidos nucleicos	5,53	6,09
Cafeína	0,0035	ND

Fuente: García, 1999; Gross, 2001.

**Anexo No. 5**

Análisis estadístico de eficiencia biológica de las cepas (Tabla 22).

Tabla ANOVA

## Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	81943,9	5	16388,8	20,05	0,0000
Intra grupos	9809,47	12	817,456		
Total (Corr.)	91753,4	17			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 20,0485, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 6 variables a un nivel de confianza del 95,0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, seleccione los Tests de Rangos Múltiples en la lista de Opciones Tabulares.

## Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje LSD			
	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Col_2	3	33,1702	X
Col_5	3	95,3353	X
Col_3	3	148,222	X
Col_4	3	195,387	XX
Col_1	3	204,356	X
Col_6	3	225,233	X
Contraste	Diferencias		+/- Límites
Col_1 - Col_2	*171,186		50,8636
Col_1 - Col_3	*56,1342		50,8636
Col_1 - Col_4	8,9691		50,8636
Col_1 - Col_5	*109,021		50,8636
Col_1 - Col_6	-20,8763		50,8636
Col_2 - Col_3	*-115,052		50,8636
Col_2 - Col_4	*-162,217		50,8636
Col_2 - Col_5	*-62,1651		50,8636
Col_2 - Col_6	*-192,062		50,8636
Col_3 - Col_4	-47,1651		50,8636
Col_3 - Col_5	*52,8867		50,8636
Col_3 - Col_6	*-77,0105		50,8636
Col_4 - Col_5	*100,052		50,8636
Col_4 - Col_6	-29,8454		50,8636
Col_5 - Col_6	*-129,897		50,8636

\* indica una diferencia significativa.

Análisis estadístico de tasa de producción de las cepas (Tabla 22).  
Tabla ANOVA

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	35,4917	5	7,09834	13,76	0,0001
Intra grupos	6,19253	12	0,516044		
Total (Corr.)	41,6842	17			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 13,7553, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 6 variables a un nivel de confianza del 95,0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, seleccione los Tests de Rangos Múltiples en la lista de Opciones Tabulares.

Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Col_2	3	0,621353	X
Col_5	3	1,87311	X
Col_3	3	2,74536	XX
Col_1	3	3,40976	XX
Col_4	3	4,35854	XX
Col_6	3	4,4758	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Col_1 - Col_2	*2,7184	1,27796
Col_1 - Col_3	0,564394	1,27796
Col_1 - Col_4	-0,748786	1,27796
Col_1 - Col_5	*1,61665	1,27796
Col_1 - Col_6	*-1,46604	1,27796
Col_2 - Col_3	*-2,15401	1,27796
Col_2 - Col_4	*-3,46719	1,27796
Col_2 - Col_5	-1,10176	1,27796
Col_2 - Col_6	*-4,18444	1,27796
Col_3 - Col_4	*-1,31318	1,27796
Col_3 - Col_5	1,05225	1,27796
Col_3 - Col_6	*-2,03043	1,27796
Col_4 - Col_5	*2,36543	1,27796
Col_4 - Col_6	-0,717254	1,27796
Col_5 - Col_6	*-3,08269	1,27796

\* indica una diferencia significativa.



Análisis estadístico de diámetro de los cuerpos fructíferos (Tabla 22).

Tabla ANOVA

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	35,9084	5	7,18169	3,59	0,0323
Intra grupos	24,0054	12	2,00045		
Total (Corr.)	59,9138	17			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 3,59004, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 6 variables a un nivel de confianza del 95,0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, seleccione los Tests de Rangos Múltiples en la lista de Opciones Tabulares.

Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Col_5	3	6,17	X
Col_2	3	6,9	XX
Col_4	3	8,5	XXX
Col_1	3	9,26	XX
Col_3	3	9,33	XX
Col_6	3	10,17	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Col_1 - Col_2	2,36	2,51617
Col_1 - Col_3	-0,07	2,51617
Col_1 - Col_4	0,76	2,51617
Col_1 - Col_5	*3,09	2,51617
Col_1 - Col_6	-0,91	2,51617
Col_2 - Col_3	-2,43	2,51617
Col_2 - Col_4	-1,6	2,51617
Col_2 - Col_5	0,73	2,51617
Col_2 - Col_6	*-3,27	2,51617
Col_3 - Col_4	0,83	2,51617
Col_3 - Col_5	*3,16	2,51617
Col_3 - Col_6	-0,84	2,51617
Col_4 - Col_5	2,33	2,51617
Col_4 - Col_6	-1,67	2,51617
Col_5 - Col_6	*-4,0	2,51617

\* indica una diferencia significativa.

Análisis estadístico de la actividad enzimática manganeso peroxidasa (Tabla 24).

Tabla ANOVA

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,00798529	5	0,00159706	48,32	0,0000
Intra grupos	0,000396651	12	0,0000330542		
Total (Corr.)	0,00838194	17			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 48,3163, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 6 variables a un nivel de confianza del 95,0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, seleccione los Tests de Rangos Múltiples en la lista de Opciones Tabulares.

Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Col_4	3	0,00250667	X
Col_1	3	0,0286467	X
Col_2	3	0,0358033	X
Col_5	3	0,03645	X
Col_3	3	0,0589467	X
Col_6	3	0,06748	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Col_1 - Col_2	-0,00715667	0,010228
Col_1 - Col_3	*-0,0303	0,010228
Col_1 - Col_4	*0,02614	0,010228
Col_1 - Col_5	-0,00780333	0,010228
Col_1 - Col_6	*-0,0388333	0,010228
Col_2 - Col_3	*-0,0231433	0,010228
Col_2 - Col_4	*0,0332967	0,010228
Col_2 - Col_5	-0,000646667	0,010228
Col_2 - Col_6	*-0,0316767	0,010228
Col_3 - Col_4	*0,05644	0,010228
Col_3 - Col_5	*0,0224967	0,010228
Col_3 - Col_6	-0,00853333	0,010228
Col_4 - Col_5	*-0,0339433	0,010228
Col_4 - Col_6	*-0,0649733	0,010228
Col_5 - Col_6	*-0,03103	0,010228

\* indica una diferencia significativa.

Análisis estadístico de la actividad enzimática versátil peroxidasa (Tabla 24).

Tabla ANOVA

## Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,00453407	5	0,000906814	1358,34	0,0000
Intra grupos	0,00000801107	12	6,67589E-7		
Total (Corr.)	0,00454208	17			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 1358,34, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 6 variables a un nivel de confianza del 95,0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, seleccione los Tests de Rangos Múltiples en la lista de Opciones Tabulares.

Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Col_1	3	0,0477267	X
Col_5	3	0,0510267	X
Col_4	3	0,05604	X
Col_6	3	0,06584	X
Col_2	3	0,0864967	X
Col_3	3	0,0868467	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Col_1 - Col_2	*-0,03877	0,00145355
Col_1 - Col_3	*-0,03912	0,00145355
Col_1 - Col_4	*-0,00831333	0,00145355
Col_1 - Col_5	*-0,0033	0,00145355
Col_1 - Col_6	*-0,0181133	0,00145355
Col_2 - Col_3	-0,00035	0,00145355
Col_2 - Col_4	*0,0304567	0,00145355
Col_2 - Col_5	*0,03547	0,00145355
Col_2 - Col_6	*0,0206567	0,00145355
Col_3 - Col_4	*0,0308067	0,00145355
Col_3 - Col_5	*0,03582	0,00145355
Col_3 - Col_6	*0,0210067	0,00145355
Col_4 - Col_5	*0,00501333	0,00145355
Col_4 - Col_6	*-0,0098	0,00145355
Col_5 - Col_6	*-0,0148133	0,00145355

\* indica una diferencia significativa.

Análisis estadístico de la actividad enzimática lacasa (Tabla 24).

Tabla ANOVA

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,00981815	5	0,00196363	478,83	0,0000
Intra grupos	0,0000492103	120	0,0000410086		
Total (Corr.)	0,00986736	17			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 478,834, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 6 variables a un nivel de confianza del 95,0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, seleccione los Tests de Rangos Múltiples en la lista de Opciones Tabulares.

Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Col_1	3	0,0727433	X
Col_4	3	0,0747333	X
Col_5	3	0,0756733	X
Col_6	3	0,08435	X
Col_2	3	0,0960267	X
Col_3	3	0,1397	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Col_1 - Col_2	*-0,0232833	0,00360257
Col_1 - Col_3	*-0,0669567	0,00360257
Col_1 - Col_4	-0,00199	0,00360257
Col_1 - Col_5	-0,00293	0,00360257
Col_1 - Col_6	*-0,0116067	0,00360257
Col_2 - Col_3	*-0,0436733	0,00360257
Col_2 - Col_4	*0,0212933	0,00360257
Col_2 - Col_5	*0,0203533	0,00360257
Col_2 - Col_6	*0,0116767	0,00360257
Col_3 - Col_4	*0,0649667	0,00360257
Col_3 - Col_5	*0,0640267	0,00360257
Col_3 - Col_6	*0,05535	0,00360257
Col_4 - Col_5	-0,00094	0,00360257
Col_4 - Col_6	*-0,00961667	0,00360257
Col_5 - Col_6	*-0,00867667	0,00360257

\* indica una diferencia significativa.

Análisis estadístico de eficiencia biológica de cepa 3023 en pulpa de café pura y mezclada (Figura 18).

Tabla ANOVA

## Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	32580,9	4	8145,21	63,16	0,0000
Intra grupos	1289,63	10	128,963		
Total (Corr.)	33870,5	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 63,1595, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 5 variables a un nivel de confianza del 95,0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, seleccione los Tests de Rangos Múltiples en la lista de Opciones Tabulares.

## Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Col_5	3	9,5	X
Col_4	3	42,5667	X
Col_3	3	47,7	X
Col_2	3	51,3	X
Col_1	3	148,2	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Col_1 - Col_2	*96,9	20,66
Col_1 - Col_3	*100,5	20,66
Col_1 - Col_4	*105,633	20,66
Col_1 - Col_5	*138,7	20,66
Col_2 - Col_3	3,6	20,66
Col_2 - Col_4	8,73333	20,66
Col_2 - Col_5	*41,8	20,66
Col_3 - Col_4	5,13333	20,66
Col_3 - Col_5	*38,2	20,66
Col_4 - Col_5	*33,0667	20,66

\* indica una diferencia significativa.

Análisis estadístico de tasa de producción de cepa 3023 en pulpa de café pura y mezclada (Figura 18).

#### Tabla ANOVA

##### Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2,69033	4	0,672583	350,30	0,0000
Intra grupos	0,0192	10	0,00192		
Total (Corr.)	2,70953	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 350,304, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 5 variables a un nivel de confianza del 95,0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, seleccione los Tests de Rangos Múltiples en la lista de Opciones Tabulares.

#### Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Col_5	3	0,156667	X
Col_4	3	0,676667	X
Col_3	3	0,92	X
Col_1	3	1,21333	X
Col_2	3	1,35	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Col_1 - Col_2	*-0,136667	0,0797165
Col_1 - Col_3	*0,293333	0,0797165
Col_1 - Col_4	*0,536667	0,0797165
Col_1 - Col_5	*1,05667	0,0797165
Col_2 - Col_3	*0,43	0,0797165
Col_2 - Col_4	*0,673333	0,0797165
Col_2 - Col_5	*1,19333	0,0797165
Col_3 - Col_4	*0,243333	0,0797165
Col_3 - Col_5	*0,763333	0,0797165
Col_4 - Col_5	*0,52	0,0797165

\* indica una diferencia significativa.

Análisis estadístico de la actividad enzimática lacasa de cepa 3023 en pulpa de café pura y mezclada (Tabla 30).

Tabla ANOVA

## Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2,75515	3	0,918384	2111,84	0,0000
Intra grupos	0,0017395	4	0,000434875		
Total (Corr.)	2,75689	7			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 2111,84, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables a un nivel de confianza del 95,0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, seleccione los Tests de Rangos Múltiples en la lista de Opciones Tabulares.

Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
Col_2	2	0,3075	X
Col_4	2	0,4465	X
Col_3	2	1,2335	X
Col_1	2	1,745	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Col_1 - Col_2	*1,4375	0,0578992
Col_1 - Col_3	*0,5115	0,0578992
Col_1 - Col_4	*1,2985	0,0578992
Col_2 - Col_3	*-0,926	0,0578992
Col_2 - Col_4	*-0,139	0,0578992
Col_3 - Col_4	*0,787	0,0578992

\* indica una diferencia significativa.

Análisis estadístico de setas obtenidas sobre mezcla pulpa de café: viruta de cedro (Tabla 31).  
Tabla ANOVA

## Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2,01032E6	4	502580,0	70,41	0,0000
Intra grupos	71374,0	10	7137,4		
Total (Corr.)	2,08169E6	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 70,4149, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 5 variables a un nivel de confianza del 95,0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, seleccione los Tests de Rangos Múltiples en la lista de Opciones Tabulares.

Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Col_2	3	112,0	X
Col_4	3	204,0	X
Col_5	3	842,0	X
Col_1	3	881,0	X
Col_3	3	971,0	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Col_1 - Col_2	*769,0	153,698
Col_1 - Col_3	-90,0	153,698
Col_1 - Col_4	*677,0	153,698
Col_1 - Col_5	39,0	153,698
Col_2 - Col_3	*-859,0	153,698
Col_2 - Col_4	-92,0	153,698
Col_2 - Col_5	*-730,0	153,698
Col_3 - Col_4	*767,0	153,698
Col_3 - Col_5	129,0	153,698
Col_4 - Col_5	*-638,0	153,698

\* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares, indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 2 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5,0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.



Análisis estadístico del rendimiento sobre mezcla pulpa de café: viruta de cedro (Tabla 31).  
Tabla ANOVA

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	3328,84	4	832,209	14,49	0,0004
Intra grupos	574,2	10	57,42		
Total (Corr.)	3903,04	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 14,4934, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 5 variables a un nivel de confianza del 95,0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, seleccione los Tests de Rangos Múltiples en la lista de Opciones Tabulares.

Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Col_2	3	22,4	X
Col_4	3	40,9	X
Col_5	3	42,0	X
Col_1	3	58,7	X
Col_3	3	64,7	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Col_1 - Col_2	*36,3	13,7857
Col_1 - Col_3	-6,0	13,7857
Col_1 - Col_4	*17,8	13,7857
Col_1 - Col_5	*16,7	13,7857
Col_2 - Col_3	*-42,3	13,7857
Col_2 - Col_4	*-18,5	13,7857
Col_2 - Col_5	*-19,6	13,7857
Col_3 - Col_4	*23,8	13,7857
Col_3 - Col_5	*22,7	13,7857
Col_4 - Col_5	-1,1	13,7857

\* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 8 pares, indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 3 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5,0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

Análisis estadístico de la eficiencia biológica sobre mezcla pulpa de café: viruta de cedro (Tabla 31).

Tabla ANOVA

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	44885,5	4	11221,4	16,21	0,0002
Intra grupos	6922,8	10	692,28		
Total (Corr.)	51808,3	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 16,2093, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 5 variables a un nivel de confianza del 95,0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, seleccione los Tests de Rangos Múltiples en la lista de Opciones Tabulares.

Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Col_2	3	75,0	X
Col_4	3	136,9	X
Col_5	3	195,4	X
Col_1	3	204,4	X
Col_3	3	225,2	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Col_1 - Col_2	*129,4	47,8673
Col_1 - Col_3	-20,8	47,8673
Col_1 - Col_4	*67,5	47,8673
Col_1 - Col_5	9,0	47,8673
Col_2 - Col_3	*-150,2	47,8673
Col_2 - Col_4	*-61,9	47,8673
Col_2 - Col_5	*-120,4	47,8673
Col_3 - Col_4	*88,3	47,8673
Col_3 - Col_5	29,8	47,8673
Col_4 - Col_5	*-58,5	47,8673

\* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 7 pares, indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 3 grupos homogéneos según la alineación de signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5,0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

Análisis estadístico de la tasa de producción sobre mezcla pulpa de café: viruta de cedro (Tabla 31).

Tabla ANOVA

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	17,1332	4	4,28331	15,90	0,0002
Intra grupos	2,6934	10	0,26934		
Total (Corr.)	19,8266	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 15,903, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos.

Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 5 variables aun nivel de confianza del 95,0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, seleccione los Tests de Rangos Múltiples en la lista de Opciones Tabulares.

Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Col_2	3	1,31	X
Col_4	3	2,32	X
Col_5	3	2,7	XX
Col_1	3	3,41	X
Col_3	3	4,5	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Col_1 - Col_2	*2,1	0,944165
Col_1 - Col_3	*-1,09	0,944165
Col_1 - Col_4	*1,09	0,944165
Col_1 - Col_5	0,71	0,944165
Col_2 - Col_3	*-3,19	0,944165
Col_2 - Col_4	*-1,01	0,944165
Col_2 - Col_5	*-1,39	0,944165
Col_3 - Col_4	*2,18	0,944165
Col_3 - Col_5	*1,8	0,944165
Col_4 - Col_5	-0,38	0,944165

\* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 8 pares, indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95,0%. En la parte superior de la página, se identifican 4 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5,0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

## AUTOBIBLIOGRAFÍA

### Publicaciones del tema de tesis.

1. Bermúdez RC y **García N.** (2008) Cultivo de setas comestibles (*Pleurotus*) en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Cuba. Capítulo 10. Pp. 155-178. *En: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI.* Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. ISBN 970-9752-01-4. (en prensa).
2. Rodríguez S, **García N**, Bermúdez RC, Fernández M, Augur C. (2008) Decolourisation of mushroom farm wastewater by *Pleurotus ostreatus*. *Biodegradation* 19:519-526.
3. Contreras-Domínguez M, Roopesh K, Ramírez-Coronel A, **García N**, Guyot S, Saucedo-Castañeda S, Gaime-Perraud I, Roussos S, Augur C. (2008) Use of fungal enzymes to study the degradation of specific plant polyphenols. Chapter 35. Pp. 526-536. *In: Current topics on Bioprocesses in Food Industry.* Eds. Pandey A, Larroche C, Koutinas AA. Asiatech Pub. ISBN 9788187680178.
4. **García N**, Bermúdez RC, Augur C, Roussos S, Perraud-Gaime I. (2007) Producción de lacasa extracelular, remoción de fenoles y cafeína por *Pleurotus spp.* cultivado en pulpa de café. *Revista Tecnología Química XXVII* (3): 83-91.
5. Bermúdez RC, **García N**, Mourlot A. (2007) Fermentación sólida para la producción de *Pleurotus sp.* sobre mezclas de pulpa de café y viruta de cedro. *Revista Tecnología Química XXVII* (2):55-62.
6. **García N**, Bermúdez RC, Gross P, Hernández M. (2006) Cultivo de cepas de *Pleurotus sp.* sobre pulpa de café. *Revista Mexicana de Micología* 23:99-101.
7. Orberá T, **García N**, Bermúdez RC, Serrano M. (2002) Evaluación del crecimiento de cepas de setas comestibles *Pleurotus spp.* sobre agar extracto pulpa de café para la conservación y el cultivo de inóculos primarios. *CaféCacao* 3(1):13-19.

8. Gross P, Bermúdez RC, **García N**, Buzón J, Aguilera I, Serrano M. (2002) Influencia del calcio y el manganeso en la composición química de *Pleurotus ostreatus* y el sustrato pulpa de café. *CaféCacao* 3(2):7-10.
9. Bermúdez RC, Ramos I, Donoso C, **García N**, Martínez CE. (2002) Fermentación sólida de la cáscara de cacao por *Pleurotus sp.* *Revista Tecnología Química* XXII (3):53-58.
10. Bermúdez RC, **García N**, Gross P, Serrano M. (2001) Cultivation of *Pleurotus* on agricultural substrates in Cuba. *Micología Aplicada Internacional* 13(1):25-29.
11. Bermúdez RC, Pérez RM, **García N**, Verdecia M, Marañón A. (2001) Biodegradación de la pulpa de café *Coffea arabica L.* y *Coffea canephora* var. Robusta por *Pleurotus ostreatus* var. Florida. *Revista Cubana de Química* XIII (3): 66-70.
12. Bermúdez RC, **García N**, Gross P, Verdecia M, Cárdenas JR. (2001) Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre pulpa de café en Cuba. Monografía, Universidad de Oriente. ISBN 959-207-057-1. CD Monografías de excelencia 2001. ISBN 959-207-012-1.
13. Bermúdez RC, Cárdenas R, Serrat M, **García N**, Deroncelé V, Gross P, Orberá T. (1999) Caracterización técnica socio económica y ambiental de las despulpadoras de café de la provincia Santiago de Cuba. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Informe Técnico. 120p.
14. **García N**, Bermúdez RC (tutora), (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.
15. Bermúdez RC, **García N**, Verdecia M, Gross P, Cárdenas JC, Pérez RM, Toirac I, Orberá T. (1999) Manual de Instrucción sobre la tecnología de producción de setas comestibles sobre pulpa de café. Informe técnico. Registrado por el Centro Nacional de Derecho de Autor, CENDA. No. 05188-5188. 40 p.

#### Comunicaciones cortas.

**García N**, Bermúdez RC, Roussos S, Perraud-Gaime I, Augur C. (2008) Enzymatic biotransformation of coffee pulp polyphenols by *Pleurotus spp.* *Polyphenols Communications* 2008. Volume 1/T3.01:361-363. ISBN-978-84-691-4334-6.

**García N**, Bermúdez RC, Augur C, Perraud-Gaime I, Roussos S. (2007) Solid-state fermentation of coffee pulp: an opportunity to produce fungal laccase. **Avances en Biotecnología Moderna** 2007 Symposium A: Fermentation Technology: Challenges and Opportunities: 48-51. ISSN-1027-2860.

Bermúdez RC, García N, Gross P, Hernández M. (2005) Análisis de la producción de setas comestibles *Pleurotus spp.* sobre pulpa de café. **Revista Cubana de Química XVII(1)** pp.228.

Participación en eventos científicos.

1. **García N**, Bermúdez RC, Roussos S, Perraud-Gaime I, Augur C. (2008) Enzymatic biotransformation of coffee pulp polyphenols by *Pleurotus spp.* **XXIVth International Conference on Polyphenols**, 8-11 Julio, 2008, Salamanca, España.
2. Rodríguez S, Bermúdez RC, **García N**. (2008) Valorización de residuales mediante la explotación de la capacidad lignolítica de *Pleurotus spp.* **1er. Taller de Etanol Celulósico**. 31 de enero del 2008. ICIDCA, La Habana, Cuba.
3. **García N**, Bermúdez RC, Augur C, Perraud-Gaime I, Roussos S. (2007) Solid-state fermentation of coffee pulp: an opportunity to produce fungal laccase. **Congreso Internacional Biotecnología Habana 2007**. Bioproducciones: desde el desarrollo tecnológico a la producción a gran escala. Noviembre 5-9, La Habana, Cuba.
4. **García N**, Bermúdez RC, Augur C, Perraud-Gaime I, Roussos S. (2007) Characterization of a fungal laccase capable of transforming specific plant polyphenols. **XVI Simposio Nacional de Bioprocesos**, 29 Julio - 3 Agosto, Curitiba, Paraná, Brasil.
5. Bermúdez RC, **García N**, Rodríguez S. (2007) Implementación de tecnologías limpias con empleo de hongos de pudrición blanca. **III Simposio Internacional de Química**, 5-8 Junio, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
6. Bermúdez RC, **García N**, Gross P, Hernández M. (2005) Análisis de la producción de setas comestibles *Pleurotus spp.* sobre pulpa de café. **18 Conferencia de Química**, Diciembre 7-9, Santiago de Cuba, Cuba.
7. **García N**, Bermúdez RC, Gross P, Kourouma A. (2005) Biodegradación de la pulpa de café por cepas de *Pleurotus sp.* **III Simposio Internacional de Café y Cacao**. CUBACAFE'05. Noviembre 5-8, Santiago de Cuba, Cuba.
8. Gross P, **García N**, Bermúdez RC, Serrano M, Ochoa M. (2004) Utilización de mezclas de sustratos lignocelulósicos para el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. **Congreso Internacional de Agricultura en ecosistemas frágiles y degradados**. ISBN: 959-7189-01-1. Diciembre 4-6, Bayamo, Gramma, Cuba.
9. Gross P, Bermúdez RC, **García N**, Buzón J, Aguilera I, Serrano M. (2002) Influencia del calcio y el manganeso en la composición química de *Pleurotus*

*ostreatus* y el sustrato pulpa de café. **17 Conferencia de Química**, Diciembre 7-9, Santiago de Cuba, Cuba.

10. Bermúdez RC, Rodríguez S, Terry A, Martínez M, Aguilera I, Buzón J, **García N**, Serrano M. (2003) Aprovechamiento de residuos cafetaleros: una opción para la mujer comprometida con su medio ambiente. **III Simposio Internacional de Mujeres vinculadas al Desarrollo Energético CIEMA 2003**. Noviembre 1-3, Santiago de Cuba, Cuba.
11. Rodríguez S, Fernández M, Bermúdez RC, Morris M, **García N**. (2002) Growth of *Pleurotus ostreatus* on the wastewater of the mushrooms farm. **Fourth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. World Society for Mushroom Biology and Mushroom Products**, Febrero 19-22, Cuernavaca, México.
12. Traba J, **García N**, Bermúdez RC, Serrat M. (1995) Aprovechamiento biotecnológico de los residuales del café. **Congreso Internacional Biotecnología Habana'95**. Nuevas oportunidades en animales, plantas, industria y desarrollo social, Noviembre 5-9, La Habana, Cuba.

Trabajos de diploma dirigidos en la temática.

Kourouma A. 2005. Determinación de enzimas ligninolíticas de *Pleurotus spp.* en residuales del café. (co-tutora)

Tesis presentadas en opción al Título Académico de **Master en Biotecnología** dirigidos en la temática.

Mourlot A. 2007. Producción de setas comestibles *Pleurotus* sobre mezcla de pulpa de café y viruta de cedro. (co-tutora)

Hechavarría M. 2005. Estudio de sustratos y sus mezclas en la fructificación de *Pleurotus spp.* (co-tutora)

Álvarez H. 2004. Evaluación de la biodegradación del extracto líquido de pulpa de café con *Pleurotus spp.* (consultante).

Distinciones, premios y reconocimientos.

Coautora del resultado de innovación tecnológica provincial, **Premio Anual de la Provincia 2007** “Colección de Cultivos del CEBI: Una herramienta para el desarrollo de la docencia, las investigaciones y los servicios en la esfera de la biotecnología en el Sistema de Educación Superior”.

Resultado científico “Cinco años de experiencia en la formación del trabajo profesional a través del grupo científico estudiantil de Inmunología Aplicada”, seleccionado como Premio al mérito científico-técnico en la categoría de **Resultado**

**Científico de Mayor Aporte a la Educación Superior**, Balance de Ciencia e Innovación Tecnológica de la Universidad de Oriente, año 2006.

Resultado científico “Colección de cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial”, seleccionado como Premio al mérito científico-técnico en la categoría de **Resultado Científico de Mayor Aporte a la Protección del Medio Ambiente** en el Balance de Ciencia e Innovación Tecnológica, año 2004.

Resultado científico “Setas nutricéuticas *Pleurotus ostreatus* como alternativa alimentaria en situaciones de contingencia”, seleccionado como Premio al mérito científico-técnico en la categoría de **Resultado Científico de Mayor Aporte a la Defensa** de la Universidad de Oriente en el Balance de Ciencia e Innovación Tecnológica, año 2002.

**Mención Provincial** en **ECOJOVEN’2001**. Evento Provincial de las Brigadas Técnicas Juveniles.

Certificado acreditativo del **Sello Forjadores del Futuro**, en reconocimiento a sus resultados en la actividad de creación Científico Técnica en beneficio del país. Proceso 1997-1998 y 2001.

Reconocimiento por el aporte brindado en los últimos 10 años en la búsqueda de soluciones científico – técnicas. **XIII Forum de Ciencia y Técnica**.

**Premio Nacional** en **ECOJOVEN’98**. Evento Nacional de las Brigadas Técnicas Juveniles.

Diploma al resultado científico: Producción de *Pleurotus sp. cfr. Florida* sobre residuales de la agroindustria cafetalera en Cuba. Por haber obtenido la condición de **destacado a escala provincial** en el año 1995 por su aporte al desarrollo de la provincia.

Otras publicaciones relacionadas con la temática.

Llauradó G, Morris HJ, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, Marcos J, Beltrán Y, **García N.** (2005) Acerca de la funcionalidad de setas comestibles *Pleurotus spp.*: propiedades bioestimulantes de un extracto acuoso. Revista Cubana de Química XVII (1):103-107.

Beltrán Y, Morris HJ, Lebeque Y, Llauradó G, Marcos J, Bermúdez RC, **García N.** (2005) Aqueous extracts from mycelium and fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus spp.* Revista Cubana de Química XVII (1)pp.166

Morris HJ, Marcos J, Llauradó G, Fontaine R, Tamayo V, **García N**, Bermúdez RC (2003) Immunomodulating effects of hot-water extract from *Pleurotus ostreatus*



mycelium on cyclophosphamide treated mice. *Micología Aplicada Internacional* 15(1):7-13.

Morris HJ, Lebeque Y, Marcos J, Llauradó G, Fontaine R, Bermúdez RC, Beltrán Y, **García N**, Tamayo V. (2002) Preliminar characterization and radioprotective effects of aqueous extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. *En: 17 Conferencia de Química (Memorias)*, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba. ISBN: 959-207-083-0.

Bermúdez RC, Serrat M, **García N**, Gross P. (1994) Manual de prácticas de laboratorio de Biotecnología. Parte I. Editado por el Departamento de Textos e Impresiones, Universidad de Oriente. 23pp.

Tabla 1. Historia y desarrollo de la fermentación en estado sólido.

Periodo	Avance alcanzado
2600 años antes de Cristo	Producción de pan por los egipcios.
Antes de Cristo en Asia	Producción de queso por <i>Penicillium roqueforti</i> . Fermentación del pescado/preservación con azúcares, almidones, sales, etc., proceso Koji.
Siglo XVII	Se extiende el proceso Koji de China a Japón por los sacerdotes budistas. Producción de vinagre a partir de residuos de manzana.
Siglo XVIII	Uso del ácido gálico en procesos industriales como el encurtido, la impresión, etc.
1860–1900	Aplicación en el tratamiento de residuos.
1900–1920	Producción de enzimas fúngicas (amilasas), ácido kójico.
1920–1940	Producción de enzimas fúngicas, ácidos glucónico y cítrico. Se desarrolla el fermentador de tambor rotatorio.
1940–1950	Fantásticos avances en la industria de la fermentación. Producción de penicilina por fermentación sólida y sumergida.
1950–1960	Transformación de esteroides por cultivos fúngicos.
1960–1980	Producción de micotoxinas y de alimentos enriquecidos proteicamente.
1980–nuestros días	Producción de otros productos como alcohol y ácido giberélico.

---

Fuente: Rodríguez Couto y Sanromán, 2005

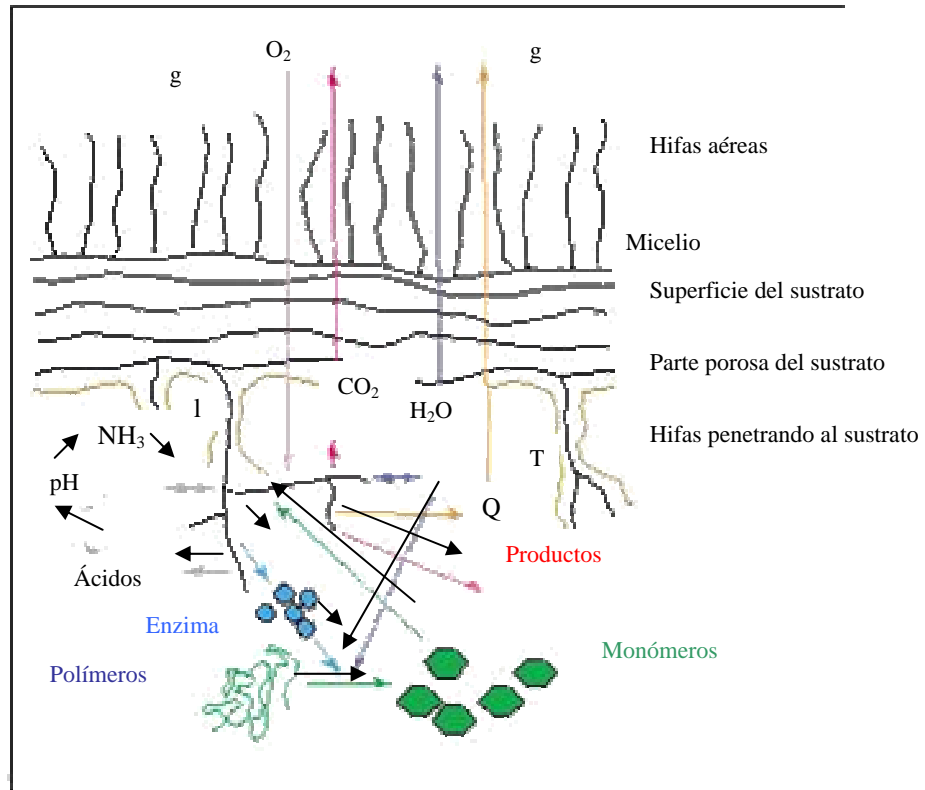


Figura 1. Algunos procesos a micro escala que ocurren en la fermentación sólida (Hölker y Lenz, 2005).

Tabla 2. Ejemplos de aplicaciones económicas de las fermentaciones en estado sólido.

Sector	Aplicación	Ejemplos
Agro-alimentario	Biotransformación de residuos de cosechas.	Alimentos fermentados tradicionales (koji, sake, raji, tempeh), producción de proteína unicelular, enriquecimiento proteico y <b>producción de setas comestibles</b> .
	Aditivos	Compuestos aromáticos, colorantes, ácidos orgánicos y aceites esenciales.
Medio ambiente	Biorremediación y biodegradación de compuestos tóxicos.	Residuales cafeïnados, pesticidas, difenilos policlorados.
	Desintoxicación biológica de residuales agroindustriales	Pulpa de café, cáscaras de yuca y de café.
Industrial	<b>Producción de enzimas</b>	Amilasas, aminoglucosidasas, celulasas, proteasas, pectinasas, xilanasas, glucoamilasas.
	Productos bioactivos	Micotoxinas, giberelinas, alcaloides, antibióticos, hormonas.
	Producción de ácidos orgánicos	Ácidos cítrico, fumárico, itaicoico y láctico.
	Biocombustibles	Producción de etanol.
	Otros	Pigmentos, biosurfactantes, vitaminas, Xantano.

Fuente: Pérez- Guerra y col., 2003

Tabla 3. Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido (FES) comparada con fermentación sumergida (FS).

---

Ventajas

---

La baja disponibilidad de agua reduce la posibilidad de contaminación por bacterias y levaduras. Esto permite trabajar, en muchos casos, en condiciones de asepsia.

Tiene condiciones medioambientales similares al hábitat natural de los hongos, los cuales constituyen el grupo principal de microorganismos usados en FES.

Altos niveles de aireación, especialmente para aquellos procesos que demanden un intenso metabolismo oxidativo.

La inoculación con esporas facilita dispersión uniforme y directa en el sustrato.

Los medios de cultivo son mucho más simples. El sustrato, por lo general suministra todos los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano.

Bajos requerimientos energéticos (en muchos casos el autoclaveado o tratamiento al vapor, la agitación mecánica y la aireación no son necesarios).

Volúmenes pequeños de efluentes contaminantes. Cantidades mínimas de solventes son necesarios para los productos de extracción, dada la alta concentración de productos.

La baja disponibilidad de agua favorece la producción de productos específicos, estos pueden ser poco o no producidos por FS.

En muchos casos los productos obtenidos tienen propiedades ligeramente diferentes (más termotolerancia) cuando son producidos por FES con respecto a FS.

Debido a la concentración natural del sustrato, son usados reactores pequeños en FES con respecto a FS para degradar la misma cantidad de sustrato.

---

Desventajas

---

Pocos microorganismos se pueden usar en FES, dado el bajo contenido de agua.

Los sustratos requieren de pretratamiento (reducción de tamaño por molienda, corte, homogenización, hidrólisis física, química o enzimática, tratamiento con vapor, cocción, etc.).

La naturaleza sólida del sustrato puede causar problemas en el control de los parámetros de proceso (pH, temperatura, contenido de agua, concentración de sustrato, biomasa y oxígeno, etc.).

La agitación del sustrato puede ser difícil, por lo que se prefieren las condiciones estáticas.

Puede ser difícil remover el calor metabólico que se genera durante el crecimiento microbiano.

Los extractos obtenidos son, por lo general, de naturaleza viscosa.

Los tiempos de cultivo en FES son más largos que en FS.

---

Fuente: Pérez- Guerra y col., 2003

Tabla 4. Composición química (%) de algunos subproductos empleados en la producción de setas comestibles y/o enzimas ligninolíticas, por FES.

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

Fuentes: Hunsigi, 1989; Ramos, 1999; Rodríguez Couto y Sanromán, 2005; Howard y col., 2003.

Tabla 5. Producción de café en los diez primeros países exportadores.  
(en miles de sacos).

Año comienzo de cosecha	2004	2005	2006	<b>2007</b>	% Variación entre 2006 y 2007
<b>Brasil</b>	<b>39 272</b>	<b>32 944</b>	<b>42 512</b>	<b>33 740</b>	<b>-20,63</b>
Vietnam	14 174	13 595	18 455	<b>17 500</b>	-5,17
Colombia	12 033	12 329	12 163	<b>12 400</b>	1,95
Indonesia	7 536	8 659	6 650	<b>7 000</b>	5,25
Etiopía	4 568	4 003	4 636	<b>5 733</b>	23,67
India	4 599	4 396	5 079	<b>4 850</b>	-4,51
México	3 867	4 225	4 200	<b>4 500</b>	7,13
Guatemala	3 703	3 676	3 950	<b>4 000</b>	1,26
Honduras	2 575	3 204	3 461	<b>3 833</b>	10,75
Uganda	2 593	2 159	2 600	<b>2 750</b>	5,76

Fuente: Organización Internacional del Café (OIC, 2008).

Tabla 6. Composición química de la pulpa de café y la cáscara de café (% base seca).

	Pulpa de café	Cáscara de café
Carbohidratos	44-50	26-58
Proteínas	10-12	7-9
Fibra	18-21	26-32
Grasas	2,5	1,5
<b>Cafeína</b>	<b>0,68-0,75</b>	<b>1,2-1,3</b>
<b>Taninos</b>	<b>1,80-8,56</b>	<b>4,5-9,3</b>
<b>Polifenoles</b>	<b>0,7-1,0</b>	<b>ND</b>
Pectina	3,7	6,5-12,4

Fuentes: Bressani, 1979; Elías, 1979; Porres y col., 1993; Serrat, 1998; Pandey y col., 1998, 2000; Brand y col., 2000.

Tabla 7. Compuestos fenólicos presentes en la pulpa de café fresca y fermentada (3 días), análisis por HPLC.<sup>a</sup>

Compuesto	Fresca	3 días fermentada
<b>Flavonoides 3-ol (taninos condensados)</b>		
Monómeros	2,0 ± 0,6	0,6 ± 0,07
Proantocianidinas	20,1 ± 0,7	15,0 ± 0,4
<b>Ácidos hidroxicinámicos (taninos hidrolizables)</b>		
Ácidos cafeoléticos	11,8 ± 0,01	12,8 ± 0,3
Ácidos cafeoilquinéticos (iso)	2,4 ± 0,8	3,1 ± 0
Acido <i>p</i> -coumaroilquinéticos	0,6 ± 0	0,08 ± 0
<b>Flavonoides</b>	0,6 ± 0,02	0,5 ± 0,05
<b>Antocianidinas</b>	0,4 ± 0,22	0,5 ± 0,2
<b>Total g/kg</b>	<b>37,9 ± 1,0</b>	<b>32,6 ± 1,2</b>

Fuente: Ramírez-Coronel y col., 2004.

<sup>a</sup>Las cantidades se reportan en g/kg de materia seca, con la desviación estándar (n=3)



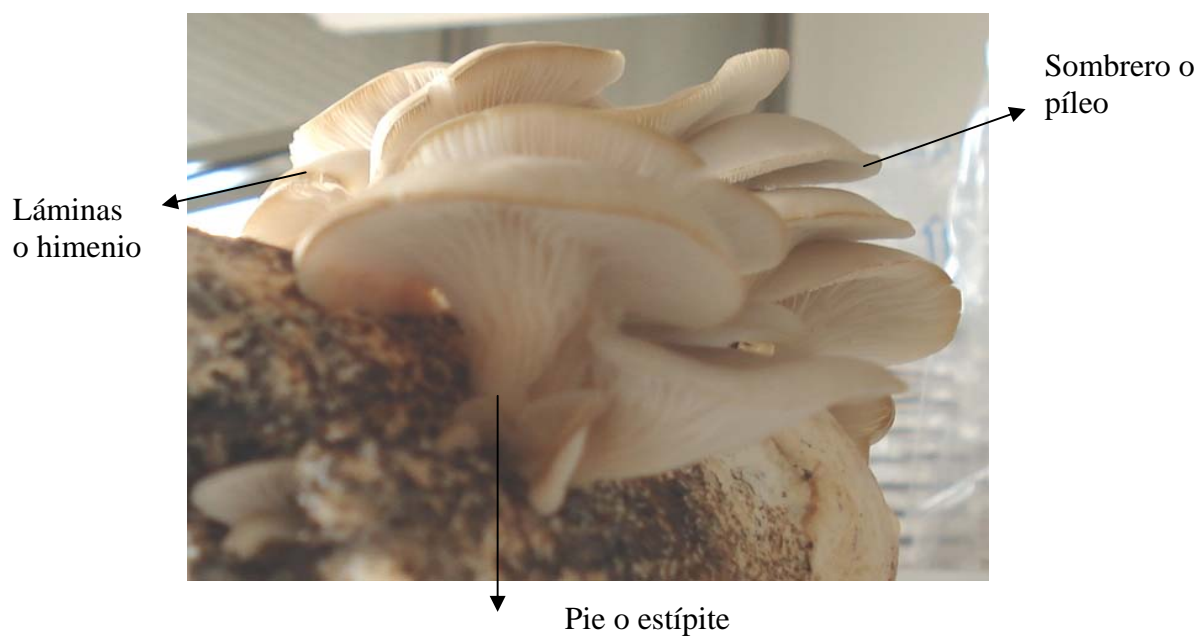


Figura 2. Estructura morfológica del *Pleurotus* spp.

Tabla 8. Algunos ejemplos de sustratos en la producción de setas comestibles *Pleurotus ostreatus* y su eficiencia biológica.

Sustratos	Eficiencia biológica (%)	Referencia
Pulpa de café	168,5	(Bermúdez y col., 1994)
Pulpa de café	175,8	(Martínez-Carrera y col., 2000)
Paja de arroz	84,6	(Pani y Mohanty, 1998)
Cascarilla de arroz	56,1	(Hashimoto y Takahashi, 1974)
Bagazo de caña de azúcar	14,1	(Martínez-Carrera, 1989)
Cáscara de coco	88,6	(González y col., 1993)
Pulpa de café: paja de cebada	99,7	(Martínez-Carrera y col., 2000)
Pulpa de café: bagazo caña de azúcar	96,9	(Martínez-Carrera y col., 2000)
Pulpa de café: fibra de coco	89,4	(Martínez-Carrera y col., 2000)
Pulpa de café: tusa de maíz	74,7	(Villa Cruz y col., 1999)
Aserrín de pino (con salvado de arroz)	44,8	(Hashimoto y Takahashi, 1974)

Tabla 9. Análisis del valor fertilizante del sustrato remanente obtenido luego de la producción de setas comestibles *Pleurotus* spp. (en %).

	Nitrógeno	Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	Potasio (K <sub>2</sub> O)
<b>Sustrato remanente de <i>Pleurotus</i> spp.</b>	<b>1,70</b>	<b>0,61</b>	<b>1,13</b>
Estiércol y orina humana	0,30	0,16	0,30
Estiércol de cerdo	0,60	0,60	0,50
Estiércol de bovino	0,59	0,28	0,14

Fuente: Rinker y col., 2005

Tabla 10. Valor nutricional de diferentes setas comestibles y alimentos (% peso fresco).

Setas y alimentos	Proteínas	Carbohidratos	Grasas	Calcio	Tiamina (vitamina B <sub>1</sub> )	Riboflavina (vitamina B <sub>2</sub> )	Hierro	Niacina
<b><i>Pleurotus spp.</i></b>	<b>2,9</b>	<b>5,66</b>	<b>1,79</b>	<b>3,14</b>	<b>0,20</b>	<b>0,22</b>	<b>3,40</b>	<b>7,72</b>
	<b>(26-35)*</b>							
<i>Volvariella</i>	3,8	6,00	0,60	3,00	0,10	0,17	1,7	8,30
	(25-29)*							
<i>Agaricus</i>	3,5	11,4	0,40	2,40	0,10	ND	trazas	5,85
	(24-34)*							
<i>Lentinus</i>	7,5	6,50	0,93	3,00	ND	ND	1,90	7,60
	(13-17)*							
<i>Auricularia</i>	4,8	7,16	0,50	3,15	0,08	0,19	3,60	4,00
	(4-8)*							
Papa	2,0	9,10	0	11	0,10	0,04	0,70	0,04
Leche	3,5	4,90	3,9	118	0,04	0,17	0,10	0,17
Pescado	14-20	2-3	1-2	15	60	1,20	1,50	1,20
Huevo	13	2,0	13,3	68	18	0,27	1-15	0,27
Carne	21	-	3,6	8,3	0,10	0,29	2,52	29,00
Zanahoria	1,2	9,3	0,3	39	0,06	0,06	0,8	0,06

Compilado de varias fuentes. \*Números entre paréntesis indican peso seco. Fuente: Quimio, 2005.

Tabla 11. Diseño experimental empleado en la producción de setas comestibles y enzimas lacasas.

<b>Diseño experimental para la producción de setas comestibles</b>	
<b>Variables</b>	<b>Niveles</b>
Cepa	<i>Pleurotus ostreatus</i> (seis) y <i>Pleurotus sajor-caju</i> (una)
Sustrato lignocelulósico natural	Pulpa de café ( <i>Coffea arabica</i> , <i>C. canephora</i> ), cáscaras de cacao y coco, viruta de cedro.
Formulaciones de los sustratos	Puros y mezclados
Tamaño de partícula del sustrato	Fracciones entre 1,25 y 4 mm y mayor 4 mm
Tamaño del biorreactor	2 kg y 4 kg
<b>Diseño experimental para la producción de enzimas lacasas</b>	
<b>Variables</b>	<b>Niveles</b>
Cepa	<i>Pleurotus ostreatus</i> (tres) y <i>Pleurotus sajor-caju</i> (una)
Tamaño del biorreactor	Pequeño, medio y de 0,75 kg.
Etapa de fermentación	Fructificación y colonización

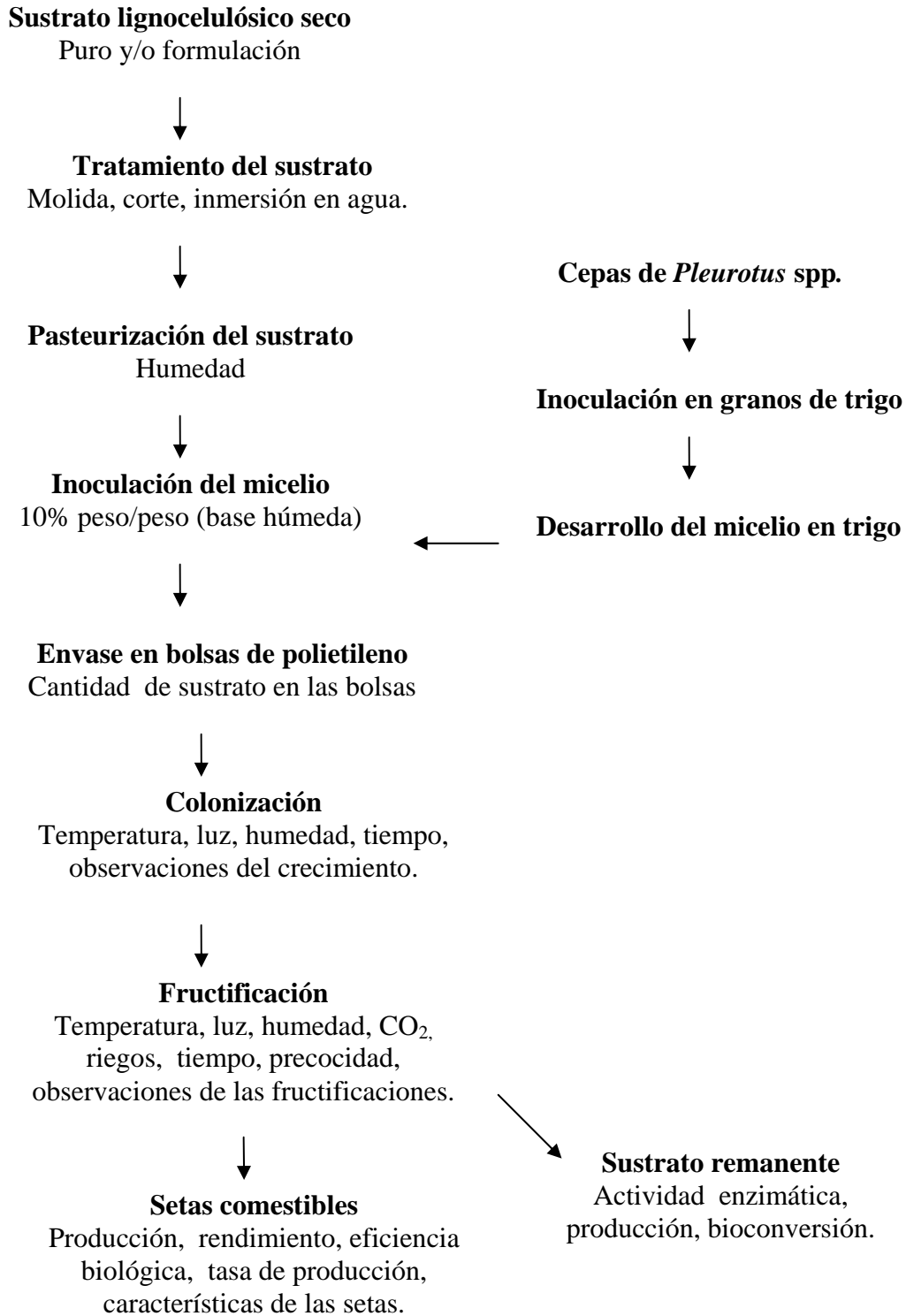


Figura 3. Metodología de trabajo de la producción de setas *Pleurotus* spp.

Tabla 12. Formulaciones binarias de los sustratos.

Sustratos	Formulaciones (% base húmeda)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Pulpa de café	100	-	-	-	75	50	25	50	50	-	-	-	-	-
Cáscara de cacao	-	100	-	-	-	-	-	50	-	-	-	50	50	-
Cáscara de coco	-	-	100	-	25	50	75	-	-	75	-	50	-	50
Viruta de cedro	-	-	-	100	-	-	-	-	50	-	75	-	50	50
Trigo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	25	-	-	-

Las formulaciones 10 y 11 se consideran suplementaciones del sustrato.

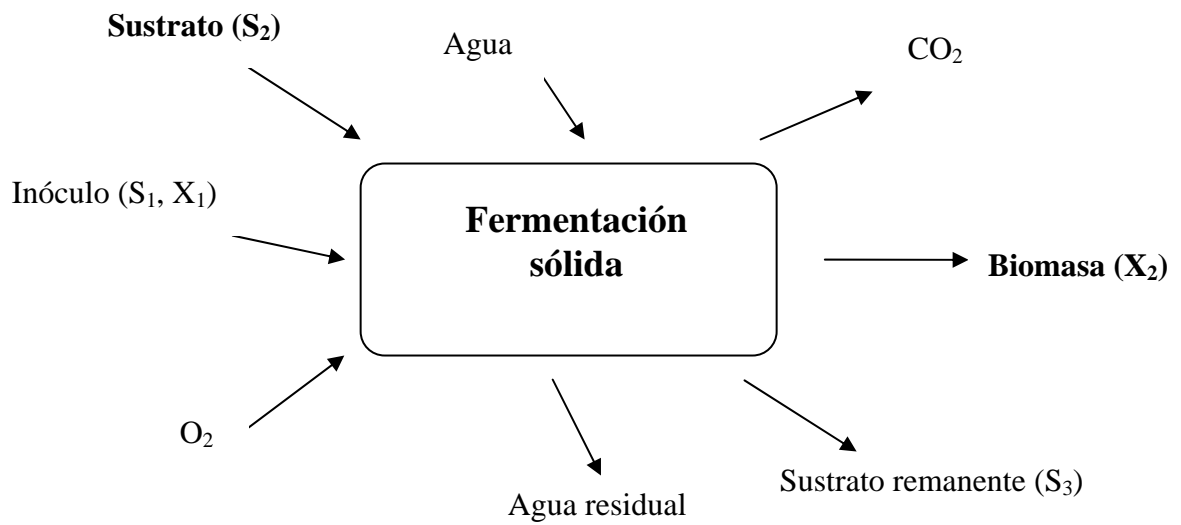


Figura 4. Elementos de entrada y salida para el balance de masa durante la producción de setas comestibles.

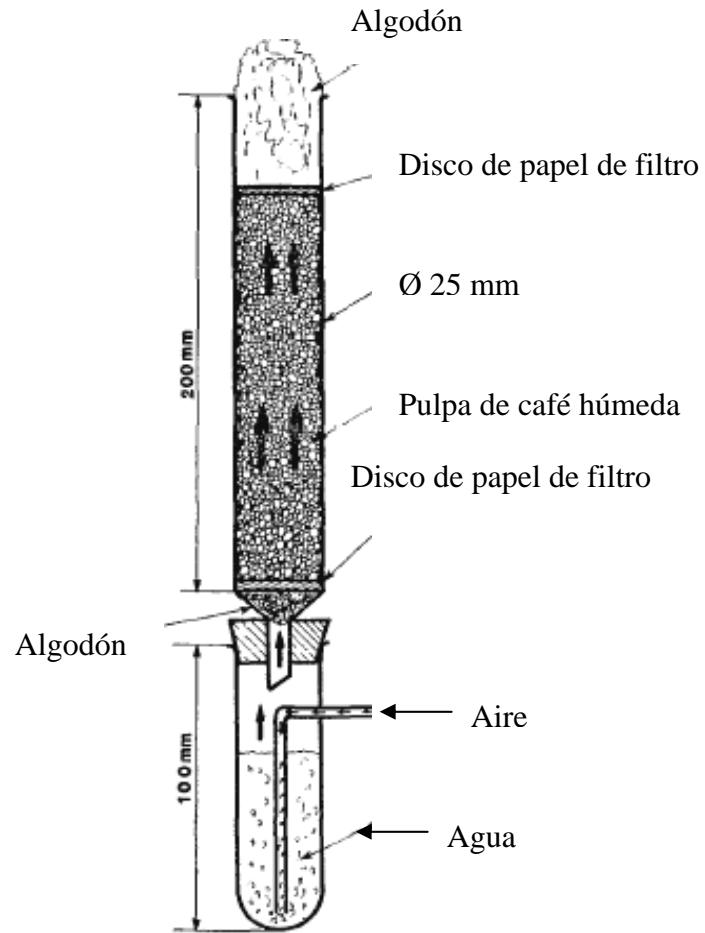


Figura 5. Columna de fermentación en estado sólido, según diseño de Raimbault.

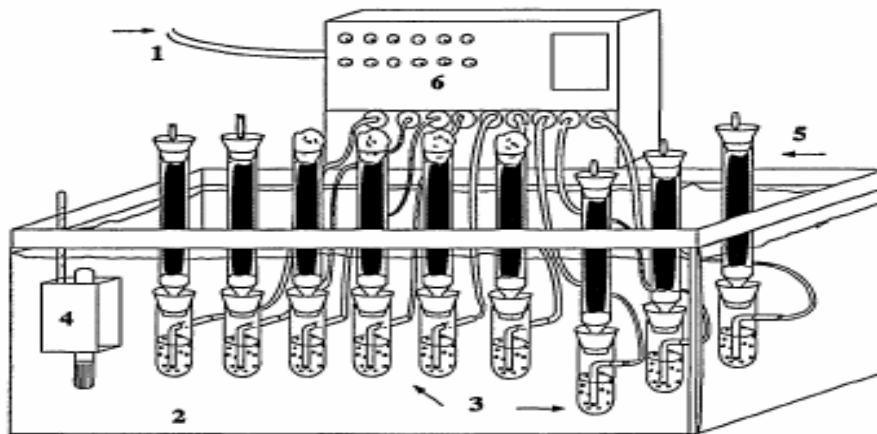


Figura 6. Dispositivo de fermentación aerobia con columnas Raimbault.

1. Entrada del aire.
2. Baño de agua.
3. Humidificadores.
4. Termostato.
5. Columna de fermentación.
6. Válvulas de control del aire.



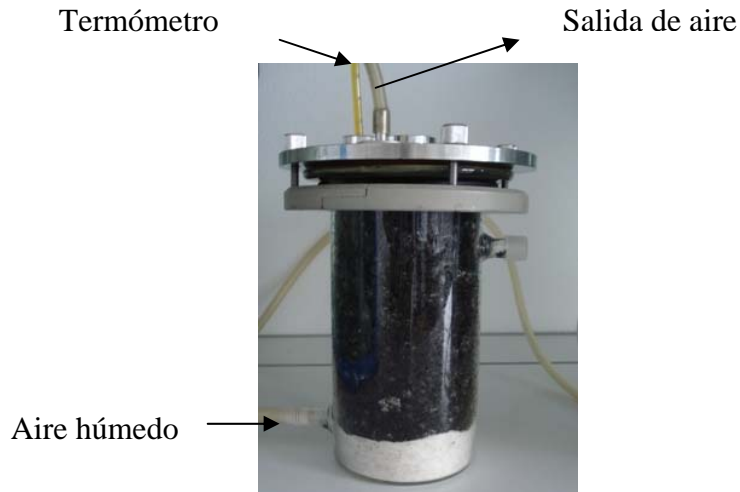


Figura 7. Columna de 0,75 kg.

Tabla 13. Parámetros de diseño y trabajo de las columnas a diferentes escalas de fermentación.

Parámetros de diseño y de trabajo	Escala de fermentación		
	pequeña	media	de 0,75kg
Diámetro (cm)	2,5	4	10
Altura (cm)	20	30	20
Altura de trabajo (cm)	12,5	20	16
Volumen total (mL)	95	350	1 600
Volumen de trabajo (mL)	65	250	1 256
Volumen por cálculo (mL)	61,3	251,2	1 256
<b>Carga (g de pulpa de café húmeda)</b>	<b>30</b>	<b>150</b>	<b>750</b>
Humedad de la pulpa de café (%)	65	70	70
Carga (g de pulpa de café seca)	10,5	45	225
Relación altura L / diámetro D	5	5	1,6
Flujo de aire (mL min <sup>-1</sup> )	21	90	450
<b>Flujo aire por g secos (mL min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup> seco)</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
Flujo de aire (mL h <sup>-1</sup> columna <sup>-1</sup> )	1 260	5 400	27 000
(v v m) o renovaciones del aire	19	22	21
<b>Densidad aparente (g mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>

v v m: volumen de aire por volumen de sustrato

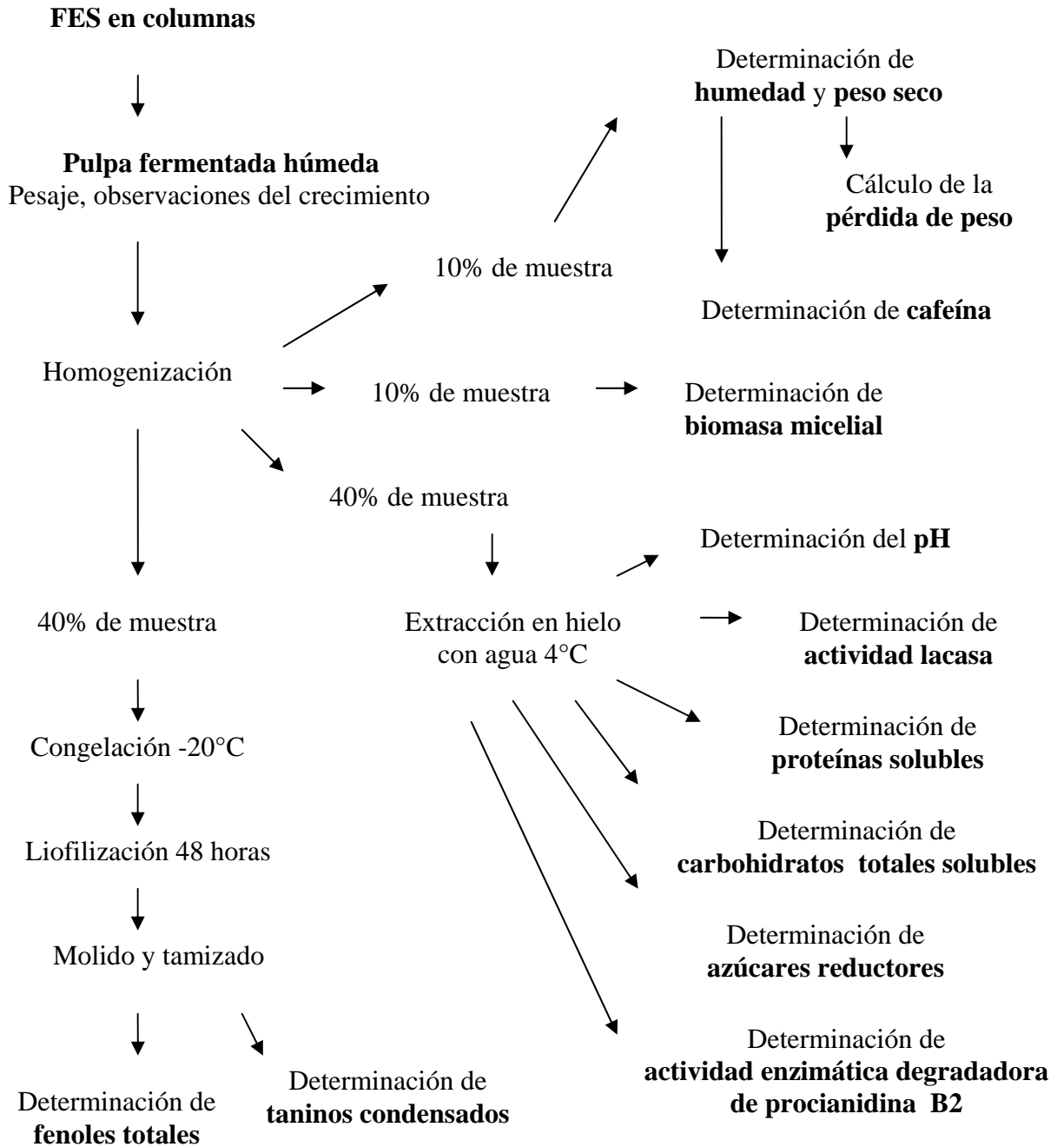


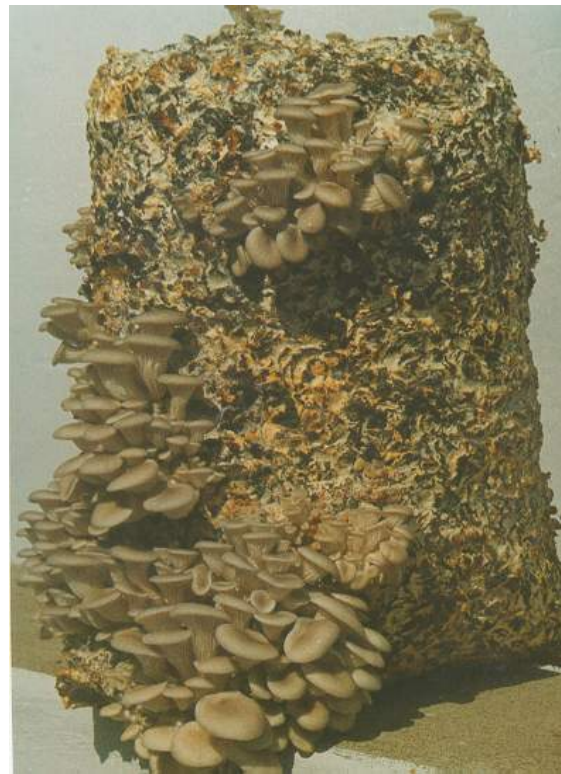
Figura 8. Tratamiento realizado a las muestras de pulpa de café fermentadas.



Figura 9. Colonización del micelio de *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa CCEBI 3024, en semillas de trigo, luego de 15 días de sembrados.

Tabla 14. Producción de setas comestibles de *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa CCEBI 3024, con los subproductos del café y dos tamaños de biorreactor.

Capacidad (kg)	Producción promedio por bolsa (kg)	Eficiencia biológica (%)	Rendimiento (%)	Precocidad (días)
Pulpa de café				
2	0,514±0,106	85,6±17,8	25,7±1,2	25
4	1,286±0,307	107,1±25,9	32,1±7,6	30
Aflecho				
2	0,242±0,018	40,3±3,0	12,1±0,9	30
4	0,343±0,032	28,5±2,6	8,6±0,8	40



a)



b)

Figura 10. Primordios (a) y setas comestibles (b) de *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa CCEBI 3024, sobre pulpa de café.

Tabla 15. Producción de setas comestibles de *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa CCEBI 3024, en diversos experimentos (E) de la planta de investigación-producción del CEBI.

E	Pulpa fresca (kg)	No. de bolsas inoculadas	Producción de setas frescas (kg)	Producción promedio por bolsa (kg)	Eficiencia biológica (%)	Rendimiento (%)	Precocidad (días)
1	16	4	3,912	0,978	81,5	24,4	35-40
2	16	4	6,373	1,593	132,8	39,8	25
3	96	24	32,848	1,367	170,8	34,2	27
4	148	37	39,602	1,070	133,8	26,8	30
5	128	32	26,299	0,822	82,2	20,5	35
6	136	34	24,099	0,709	70,9	17,7	36
Total	540	135	133,133	1,090*	112,0*	27,2*	31,7*

\*valores promedios

Tabla 16. Producción de setas comestibles de *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa CCEBI 3024, en diversos experimentos (E) de una planta rural.

E	Pulpa fresca (kg)	No. de bolsas inoculadas	Producción de setas frescas (kg)	Producción promedio por bolsa (kg)	Eficiencia biológica (%)	Rendimiento (%)	Precocidad (días)
1	72	18	36,936	2,052	205,2	51,3	20
2	72	18	34,872	1,937	193,7	48,4	15
3	72	18	25,010	1,389	138,9	34,7	20
4	124	31	29,104	0,939	93,9	23,5	30
5	132	33	30,500	0,924	57,7	23,1	27
6	252	63	50,000	0,794	49,6	19,8	18
7	528	132	106,000	0,803	66,9	20,1	27
Total	1 252	313	586,922	1,263*	115,1*	31,5*	22,5*

\*valores promedios



Figura 11. Producción de setas en la planta de investigación-producción.



Figura 12. Producción de setas en la planta rural.

Tabla 17. Temperatura y humedad relativa durante la producción de setas en la planta de investigación-producción.

Etapa de cultivo	Colonización			Fructificación			
	Hora	7:00am	12:00m	5:00pm	7:00am	12:00m	5:00pm
Temperatura (°C)		24,1±0,1	25,8±0,1	24,9±0,1	21,1±0,1	19,8±0,1	19,8±0,1
Humedad relativa(%)		95	95	95	85,7±0,1	95,8±0,2	93,1±0,2

Tabla 18. Temperatura y humedad relativa durante la producción de setas en la planta rural.

Parámetro	Hora		
	7:00am	12:00m	5:00pm
Temperatura (°C)	21,8±0,6	22,4±0,5	22,7±0,4
Humedad relativa (%)	100±0,15	92,0±2,73	96,7±3,02

Tabla 19. Producción de setas comestibles frescas de *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa CCEBI 3024, sobre pulpa de café *Coffea arabica* y *C. canephora* en la planta rural.

Variedad de pulpa de café	Eficiencia biológica (%)	Rendimiento (%)	Producción promedio por bolsa (kg)	Precocidad (días)
<i>C. arabica</i>	138,9	34,8	1,4	20
<i>C. canephora</i>	67,1	20,1	0,8	27

Coefficiente de variación menor del 20%.

Tabla 20. Condiciones establecidas para la producción de setas comestibles *Pleurotus* en la planta de investigación-producción.

Cepa	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Florida) cepa CCEBI 3024
Sustrato	Pulpa de café
Capacidad del biorreactor	4 kg de sustrato húmedo
Humedad del sustrato de siembra	70-75 %
Inoculación	Micelio crecido en trigo, 10% masa/masa
Fase colonización	Temperatura: 25±1°C Humedad relativa del ambiente: <95% Concentración CO <sub>2</sub> : 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 <sub>2</sub> : <0,6%, ventilación forzada Luminosidad: 150-200 lux (suficiente para leer)



Tabla 21. Tiempos (días) para la formación de los primordios a partir de la inoculación cepas de *Pleurotus* spp. sobre pulpa de café *Coffea arabica*.

Cepas	Cosechas			
	1era.	2da.	3era.	4ta.
CCEBI 3021	21±1,0	32±1,3	55±3,0	
CCEBI 3022	25±1,7	48±0,7		
CCEBI 3023	24±1,0	29±1,3	35±1,0	50±2,3
CCEBI 3024	18±1,7	23±3,5	31±1,4	44±1,0
CCEBI 3025	23±2,5	28±2,0	50±1,0	
CCEBI 3027	21±1,7	31±0,9	44±1,0	

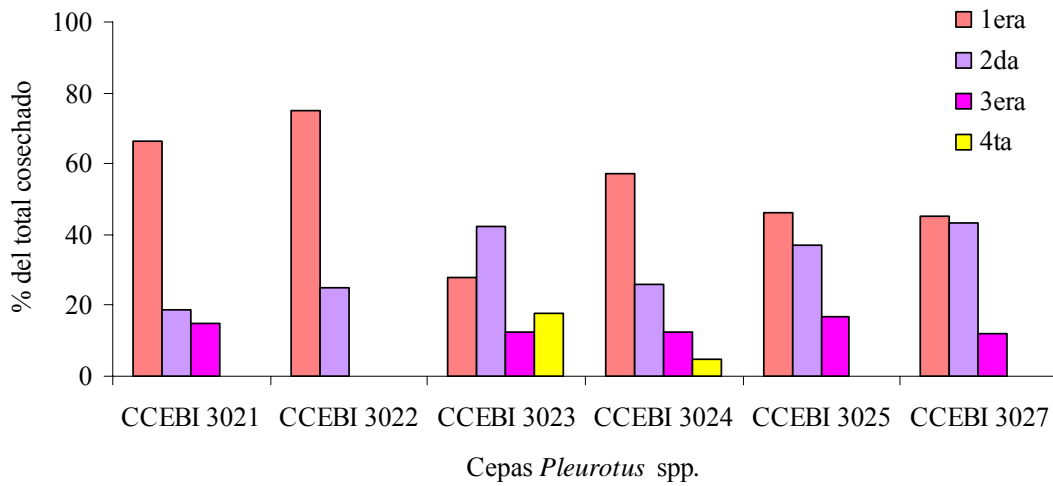


Figura 13. Distribución porcentual de las cosechas obtenidas por las cepas de *Pleurotus* spp. sobre pulpa de café *Coffea arabica*.

Tabla 22. Eficiencia biológica, tasa de producción y diámetro de los cuerpos fructíferos.

Cepas CCEBI	Eficiencia biológica (%)	Días de producción	Tasa de producción (%)	Diámetro de los cuerpos fructíferos (cm)*
3021	204,36± 33,9 <sup>d</sup>	60	3,41± 0,0 <sup>cd</sup>	9,26± 1,51 <sup>bc</sup>
3022	33,17± 16,0 <sup>a</sup>	54	0,62± 0,31 <sup>a</sup>	6,90± 2,50 <sup>ab</sup>
3023	148,22± 25,0 <sup>c</sup>	55	2,70± 0,49 <sup>bc</sup>	9,33± 1,15 <sup>bc</sup>
3024	195,38± 11,7 <sup>cd</sup>	45	4,35±0,32 <sup>de</sup>	8,50± 0,50 <sup>abc</sup>
3025	95,33± 29,9 <sup>b</sup>	51	1,87± 0,61 <sup>b</sup>	6,17± 1,15 <sup>a</sup>
3027	225,23± 42,9 <sup>d</sup>	50	4,50± 0,81 <sup>e</sup>	10,17± 0,76 <sup>c</sup>

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

Tabla 23. Características de los cuerpos fructíferos obtenidos con las cepas cultivadas sobre pulpa de café.

Cepas	Color	Textura	Proteína bruta (% base seca)	Ácidos nucleicos (% base seca)
CCEBI 3021	café claro	carrosa	30,00	2,39
CCEBI 3022	amarillo	corácea	26,43	ND
CCEBI 3023	blanco	carrosa	27,28	2,20
CCEBI 3024	blanco	carrosa	27,45	5,90
CCEBI 3025	blanco	carrosa	22,29	ND
CCEBI 3027	café oscuro	carrosa	38,00	2,34

ND: no determinado. Coeficiente de variación menor del 5%.



*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. CCEBI 3021



*Pleurotus ostreatus* CCEBI 3022



*Pleurotus ostreatus* CCEBI 3023



*Pleurotus ostreatus* CCEBI 3025



*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer CCEBI 3027

Figura 14. Setas comestibles de las cepas cultivadas sobre pulpa de café.

Tabla 24. Actividades enzimáticas lacasa, manganeso peroxidasa y versátil peroxidasa de las cepas de *Pleurotus* spp. luego de 60 días de cultivo sobre pulpa de café.

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

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

Tabla 25. Caracterización química de los subproductos y el trigo para la producción de setas comestibles.

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

Recopilado de diferentes fuentes: Traba y col., 1994; Ramos, 1999 y datos de la autora.

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

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

La materia orgánica se calcula por la diferencia entre la materia seca y las cenizas (Sánchez y Royse, 2002).

ND: no determinado.

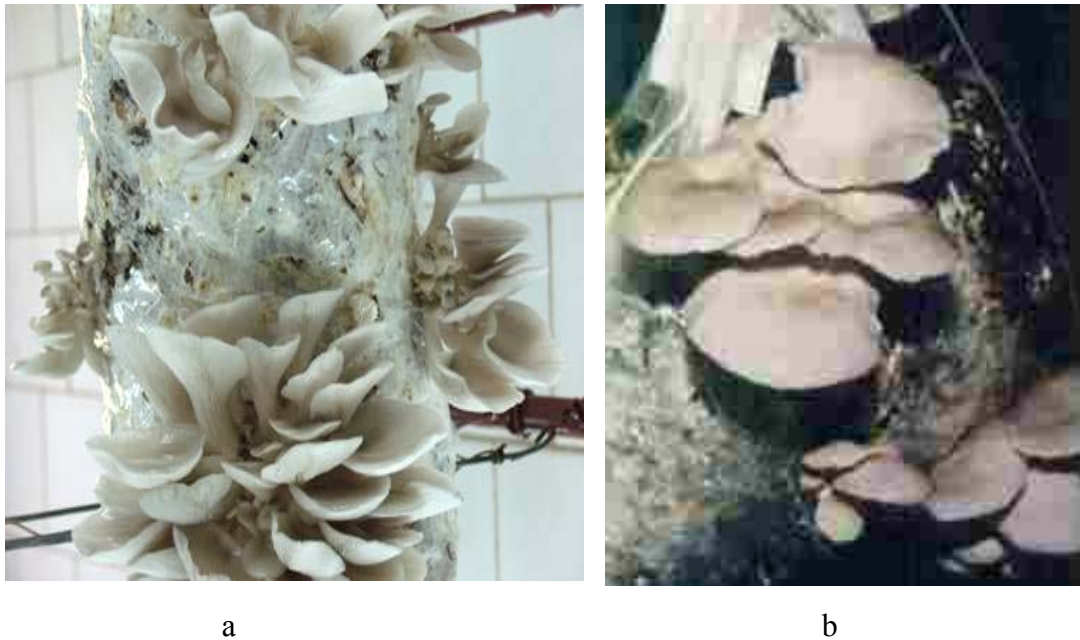


Figura 15. Primera cosecha de setas comestibles de *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa CCEBI 3024, sobre cáscaras de coco (a) y cacao (b).

Tabla 26. Resultados obtenidos del cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Florida), cepa CCEBI 3024, sobre diferentes subproductos agrícolas.

	Pulpa de café	Cáscara de cacao	Cáscara de coco
Total de sustrato seco (g)	500	540	300
Total de setas frescas (g)	842,5	456,2	270,0
Precocidad (días)	24±2	16±1	12±1
Eficiencia biológica (%)	168,5±11,7	84,5±12,0	90,0±15,6
Rendimiento (%)	42,0±1,0	22,8±3,6	13,5±5,1

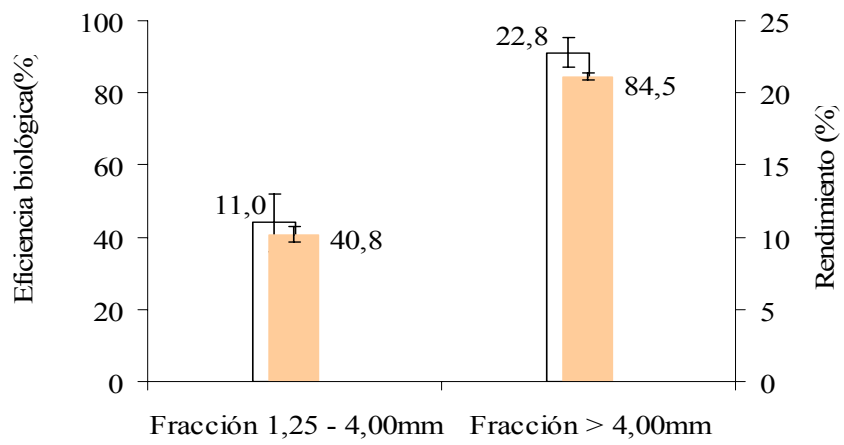


Figura 16. Eficiencia biológica (■) y rendimiento (□) de la producción de setas comestibles con diferentes tamaños de partícula de la cáscara de cacao.

Tabla 27. Bioconversión (en %) de los sustratos estudiados y su comparación con resultados de Martínez-Carrera y col, 2000\*.

Sustratos	Setas	Sustrato remanente	CO <sub>2</sub> y H <sub>2</sub> O
Pulpa de café	27,2	56,7	16,1
Cáscara de cacao	20,6	27,9	51,5
Cáscara de coco	12,4	70,3	17,3
Pulpa de café *	17,0	27,0	56,0



Tabla 28. Resultados de la producción de setas comestibles sobre las formulaciones de sustratos.

Parámetros	Formulación													
	1	2	3	4	5	6	7	8*	9*	10	11	12*	13*	14*
Precocidad (días)	<b>25</b>	16	17	20	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	16	16	30	35	12	18	23
Rendimiento (%)	<b>42</b>	23	31	21	<b>48</b>	<b>31</b>	<b>26</b>	18	15	21	24	11	21	11
Eficiencia biológica (%)	<b>168</b>	84	95	67	<b>114</b>	<b>110</b>	<b>101</b>	51	43	76	84	30	61	31
Tasa de producción (%)	<b>2,7</b>	1,8	1,8	1,1	<b>2,5</b>	<b>2,5</b>	<b>2,0</b>	1,3	0,7	1,2	1,3	0,8	1,0	0,6
1. Pulpa de café 100%	5. Pulpa de café: Cáscara de coco (3:1)							10. Cáscara de coco suplementada con trigo(2:1)						
2. Cáscara de cacao100%	6. Pulpa de café: Cáscara de coco (1:1)							11. Viruta de cedro suplementada con trigo(2:1)						
3. Cáscara de coco 100%	7. Pulpa de café: Cáscara de coco (1:3)							12. Cáscara de cacao: Cáscara de coco (1:1)						
4. Viruta de cedro 100%	8. Pulpa de café: Cáscara de cacao (1:1)							13. Cáscara de cacao: Viruta de cedro (1:1)						
	9. Pulpa de café: Viruta de cedro (1:1)							14. Cáscara de coco: Viruta de cedro (1:1)						

\*con la cepa CCEBI 3023

Cada valor es el promedio de tres determinaciones.

Todas las mezclas están peso/peso base húmeda.

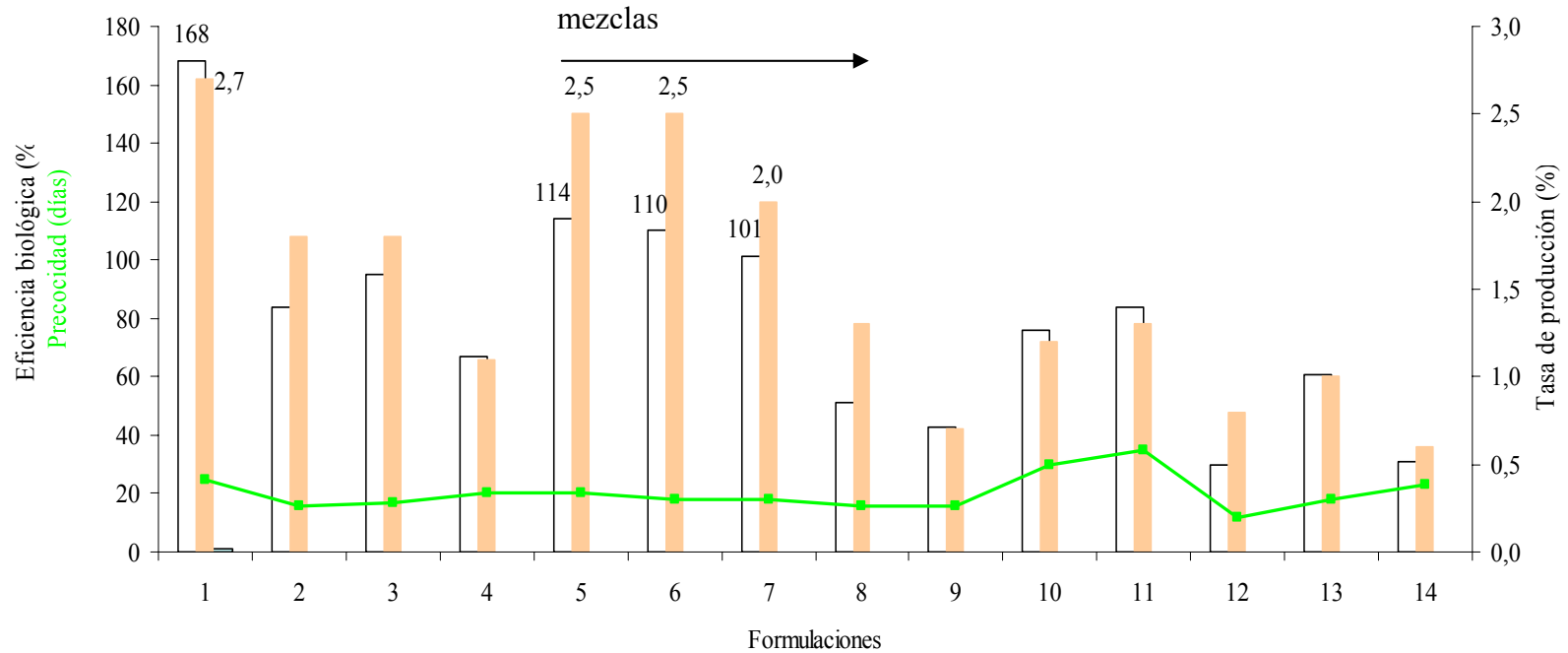


Figura 17. Comportamiento de la eficiencia biológica (□), la tasa de producción (■) y la precocidad (línea) en las diferentes formulaciones. Cada valor graficado es el promedio de tres determinaciones.

1. Pulpa de café 100%, 2. Cáscara de cacao 100%, 3. Cáscara de coco 100%, 4. Viruta de cedro 100%, 5. Pulpa de café: Cáscara de coco (3:1), 6. Pulpa de café: Cáscara de coco (1:1), 7. Pulpa de café: Cáscara de coco (1:3), 8. Pulpa de café: Cáscara de cacao (1:1), 9. Pulpa de café: Viruta de cedro (1:1), 10. Cáscara de cacao suplementada con trigo (2:1), 11. Viruta de cedro suplementada con trigo (2:1), 12. Cáscara de cacao: Cáscara de coco (1:1), 13. Cáscara de cacao: Viruta de cedro (1:1), 14. Cáscara de coco: Viruta de cedro (1:1).

Tabla 29. Influencia de las mezclas con pulpa de café sobre la eficiencia biológica y la *tasa de producción* (en cursiva) de las cepas.

Cepas	Pulpa de café				Viruta de cedro
	al 100 %	con cáscara de cacao	con cáscara de coco	con viruta de cedro	
CCEBI 3021	204,4± 33,9	ND	ND	75,0±18,0	84,0±7,0
	<i>3,41±0,6</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>1,31±0,28</i>	<i>1,60±0,10</i>
<b>CCEBI 3023</b>	<b>148,2± 25,0</b>	<b>51,3± 4,2</b>	<b>47,7± 0,6</b>	<b>42,6± 4,6</b>	<b>9,5± 0,4</b>
	<i>1,20± 0,49</i>	<i>1,35± 0,11</i>	<i>0,92± 0,01</i>	<i>0,68± 0,07</i>	<i>0,16± 0,01</i>
CCEBI 3024	195,4± 11,7	ND	113,9 ± 36,5	ND	67,3± 3,9
	<i>4,35±0,32</i>	<i>ND</i>	<i>2,53 ± 0,81</i>	<i>ND</i>	<i>1,07±0,05</i>
CCEBI 3025	95,3± 29,9	53,5± 10,7	36,8± 0,9	31,0±0,1	16,1± 4,5
	<i>1,87±0,61</i>	<i>0,82±0,16</i>	<i>0,61±0,02</i>	<i>0,56±0,00</i>	<i>0,26±0,07</i>
CCEBI 3027	225,2± 42,9	ND	ND	136,9± 3,3	68,0± 1,1
	<i>4,5±0,81</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>2,32±0,11</i>	<i>1,12±0,07</i>

La relación de mezclado fue 1:1 (base húmeda), se muestran los resultados de la viruta de cedro al 100 % como criterio de comparación. Se reflejan los valores promedios de tres réplicas ± la desviación estándar. ND: no determinado.

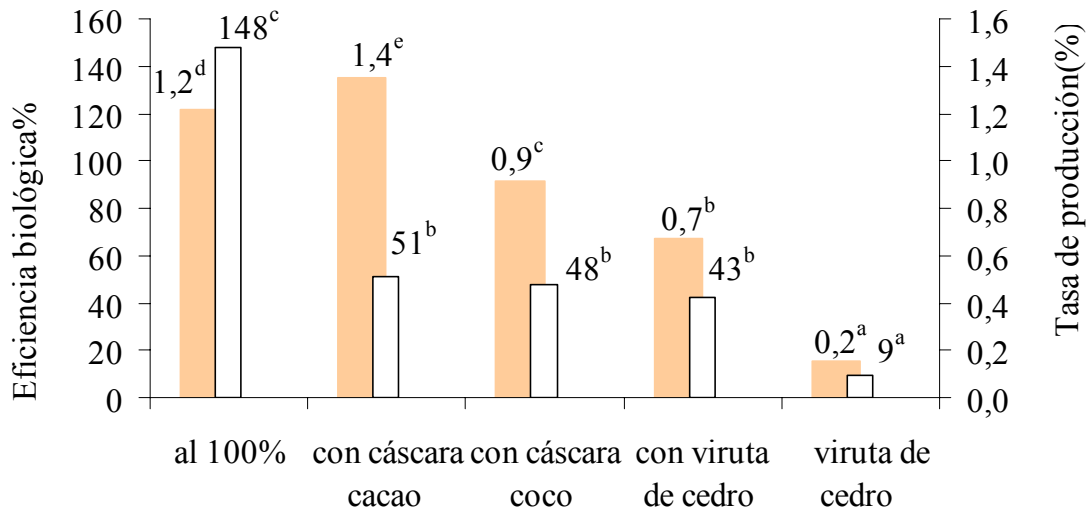


Figura 18. Influencia de las mezclas de sustratos con pulpa de café (1:1) sobre la eficiencia biológica (□) y la tasa de producción (■) en la producción de setas comestibles *Pleurotus ostreatus*, cepa CCEBI 3023. Se muestran los resultados de la viruta de cedro al 100 % como criterio de comparación.

Cada valor graficado es el promedio de tres determinaciones y las letras indican grupos homogéneos de significación estadística, según prueba de Rangos Múltiples de Duncan ( $p < 0,05$ ). Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias.

Tabla 30. Producción de enzima lacasa por *Pleurotus ostreatus*, cepa CCEBI 3023, sobre pulpa de café al 100% y mezclada luego de 60 días de cultivo.

Sustratos	Actividad lacasa ( $Ug^{-1}$ )
Pulpa de café	1,745±0,013 <sup>d</sup>
Pulpa de café : cáscara de cacao	1,234±0,004 <sup>c</sup>
Pulpa de café : cáscara de coco	0,447±0,016 <sup>b</sup>
Pulpa de café : viruta de cedro	0,308±0,036 <sup>a</sup>

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

Tabla 31. Producción setas *Pleurotus* spp. sobre mezcla pulpa de café: viruta de cedro (1:1).

Cepas	Sustratos	Setas obtenidas (g)	Rendimiento (%)	Eficiencia biológica (%)	Tasa de producción (%)
CCEBI	Pulpa de café	881±146 <sup>b</sup>	58,7±9,7 <sup>c</sup>	204,4±33,9 <sup>c</sup>	3,41±0,60 <sup>c</sup>
3021	Viruta de cedro	118	23,6	89,4	1,60
	Pulpa: viruta	112±27 <sup>a</sup>	22,4±5,4 <sup>a</sup>	75,0±18,0 <sup>a</sup>	1,31±0,28 <sup>a</sup>
CCEBI	Pulpa de café	971±105 <sup>b</sup>	64,7±12,3 <sup>c</sup>	225,2±42,9 <sup>c</sup>	4,50±0,81 <sup>d</sup>
3027	Viruta de cedro	91	18,2	68,5	1,12
	Pulpa: viruta	204±4 <sup>a</sup>	40,9±1,0 <sup>b</sup>	136,9±3,3 <sup>b</sup>	2,32±0,11 <sup>b</sup>
CCEBI	Pulpa de café	842±51 <sup>b</sup>	42,0±3,4 <sup>b</sup>	195,4±11,7 <sup>c</sup>	2,70±0,49 <sup>bc</sup>
3024	Viruta de cedro	209	20,9	67,3	1,07

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

Tabla 32. Características de los cuerpos fructíferos obtenidos en la mezcla pulpa de café: viruta de cedro (1:1).

Cepas	Sustratos	Color	Diámetro carpoforos (cm)
CCEBI	Pulpa de café	Café claro	9,26±1,51
3021	Viruta de cedro	Café claro	4,00
	Pulpa: viruta	Café claro	5,15±0,21
CCEBI	Pulpa de café	Café oscuro	10,17±0,76
3027	Viruta de cedro	Marrón claro	4,00
	Pulpa: viruta	Café oscuro	5,91±0,12
CCEBI	Pulpa de café	Blanco	8,50±0,50
3024	Viruta de cedro	Blanco	no determinado

Se reflejan los valores promedios de tres réplicas ± la desviación estándar.



Figura 19. Cuerpos fructíferos de las cepas CCEBI 3021 y CCEBI 3027 cultivadas sobre pulpa de café: viruta de cedro (1:1).



A

B

Figura 20. Actividad lacasa cualitativa sobre micelio de *Pleurotus* spp. crecido sobre extracto de pulpa de café con glucosa, lateral (A) y centro de la placa (B).

Tabla 33. Evaluación cualitativa de actividad lacasa extracelular de las cepas de *Pleurotus* spp. sobre los medios de cultivo a los 10 días de incubación a 25°C.

Cepa	agar papa dextrosa		extracto pulpa de café con glucosa		extracto pulpa café sin glucosa	
	centro	lateral	centro	lateral	centro	lateral
	CCEBI 3021	xxx	xx	xx	x	xx
CCEBI 3023	xx	x	xxx	xxx	xx	xx
CCEBI 3024	xxx	xx	xxx	xxx	-	-
CCEBI 3027	xxx	xx	xxx	xx	-	-

x verde azul claro    xx verde azul    xxx verde azul intenso    - no cambio de coloración

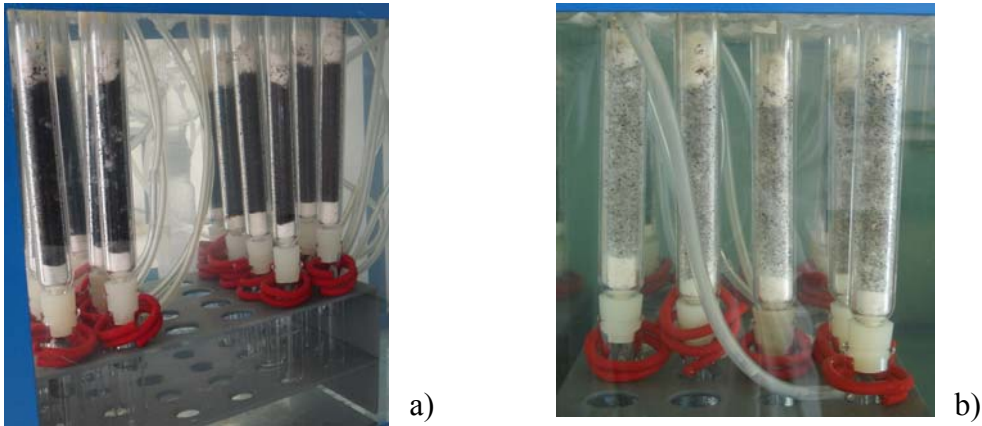


Figura 21. Fermentación sólida de la pulpa de café en columnas pequeñas a) recién inoculadas (derecha), con 24 horas de incubación (izquierda) b) con micelio de *Pleurotus spp.*, luego de 96 horas de incubación.

Tabla 34. Producción de biomasa micelial ( $\text{mg g}^{-1}$  sustrato seco) de las cepas de *Pleurotus spp.* sobre pulpa de café en columnas Raimbault.

Tiempo (días)	CCEBI 3021	CCEBI 3023	CCEBI 3024	CCEBI 3027
1	13,02±0,05	14,53±0,06	13,31±0,86	18,00±0,26
2	<b>25,43±0,48</b>	<b>16,96±0,18</b>	<b>24,60±0,83</b>	<b>20,61±0,22</b>
3	<b>19,00±0,21</b>	<b>12,73±0,11</b>	<b>22,06±0,10</b>	<b>21,64±0,33</b>
4	11,01±0,16	15,15±0,02	16,14±0,13	18,49±0,12
5	7,11±0,54	5,09±0,05	4,39±0,00	15,89±0,50
6	7,62±0,34	7,25±0,01	1,19±0,02	14,79±0,09
7	7,78±0,03	9,04±0,03	1,24±0,04	7,79±0,19



Figura 22. Producción de enzima lacasa por cepas de *Pleurotus* spp. sobre pulpa de café en columnas Raimbault.

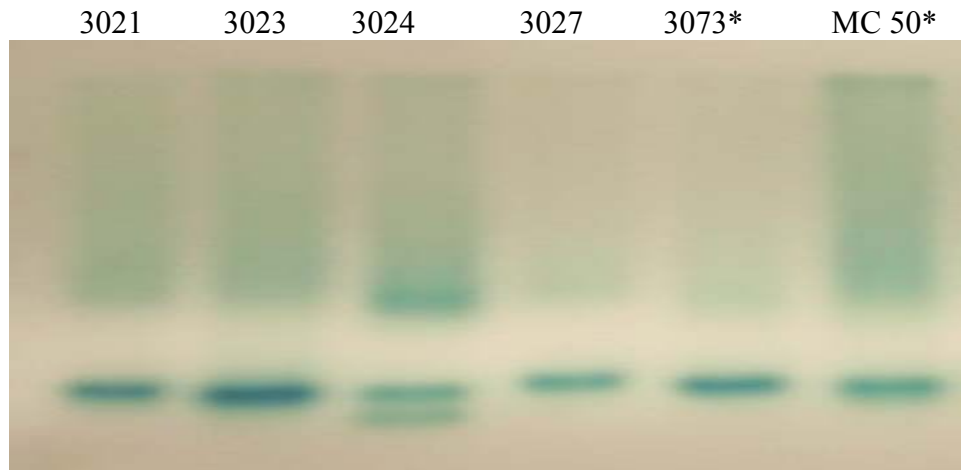
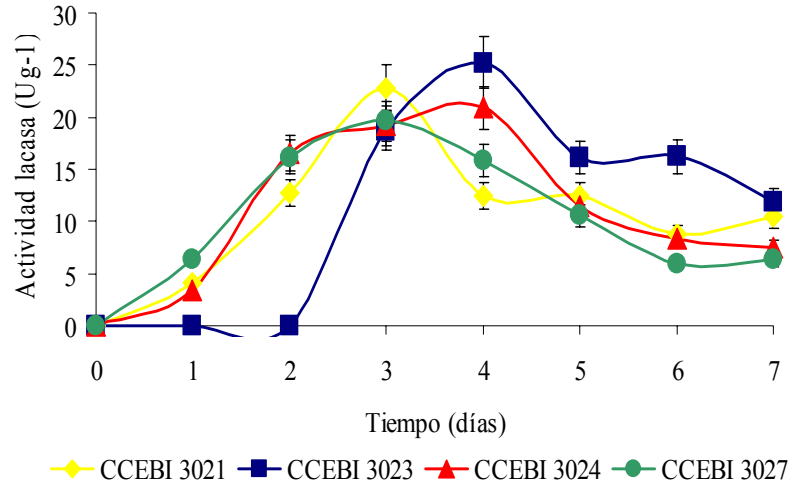


Figura 23. Zimograma de máxima producción de lacasa de las cepas de *Pleurotus* spp. (acrilamida al 10%). Se reveló con 2mM ABTS en 0,1M de amortiguador de citrato de sodio (pH 3, 30°C). Se aplicó 30μL de muestras.

\*Las cepas CCEBI 3073 y MC50 son cepas patrones.

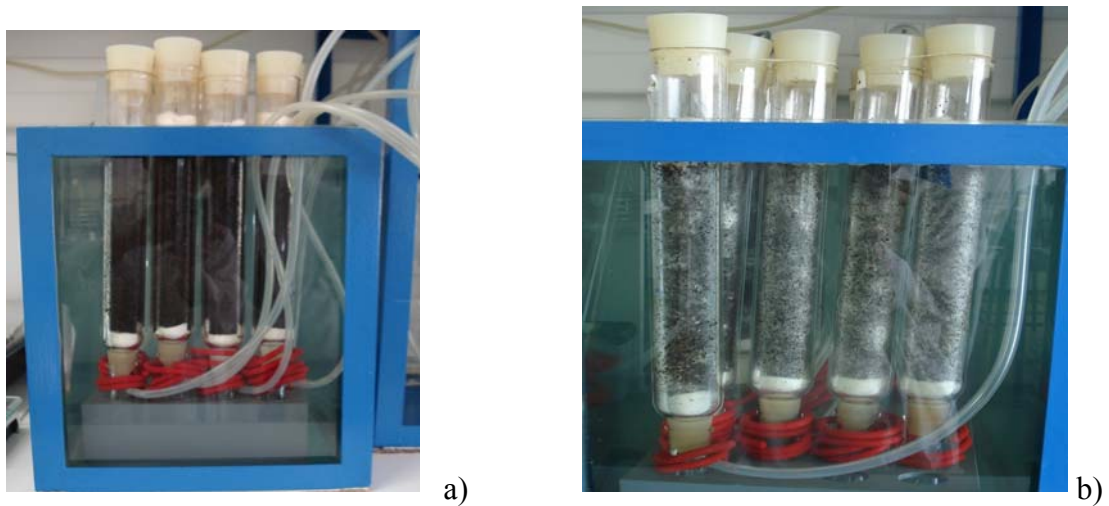


Figura 24. Fermentación sólida de la pulpa de café en escala media de fermentación, (a) recién montadas y (b) con micelio de *Pleurotus spp.* luego de 96 horas de fermentación.

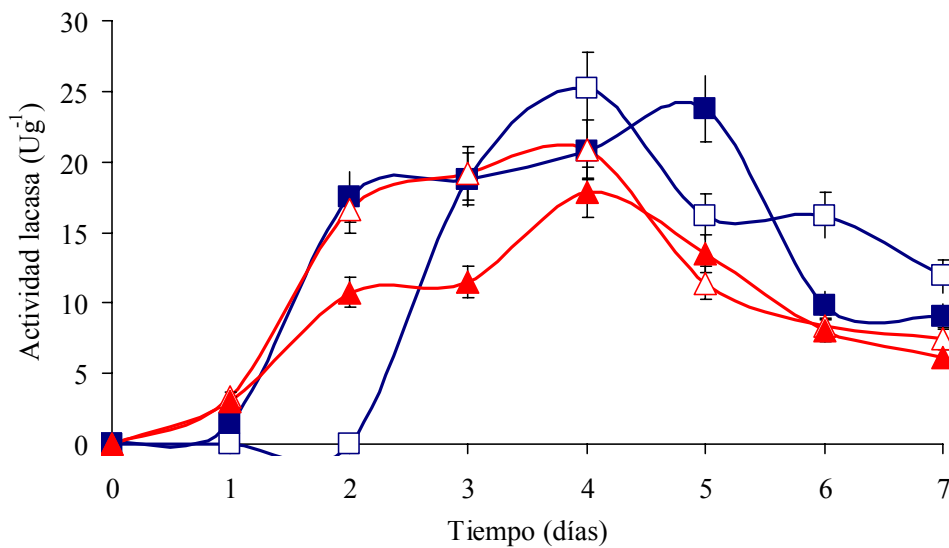


Figura 25. Actividad enzimática lacasa de las cepas CCEBI 3023 (línea azul) y CCEBI 3024 (línea roja) sobre pulpa de café, a escala pequeña (vacío) y media (lleno) de fermentación.



CCEBI 3023



CCEBI 3024



Figura 26. Conjunto de fotos de la fermentación sólida de la pulpa de café con las cepas CCEBI 3023 y CCEBI 3024 en columna de 0,75 kg.

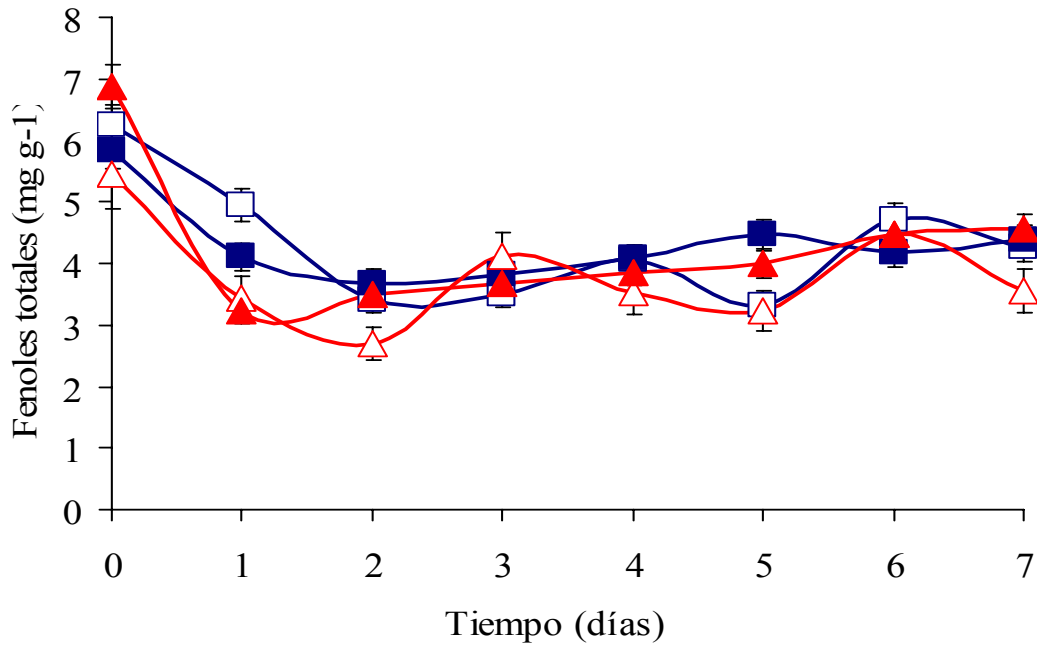


Figura 27. Disminución del contenido de los fenoles totales durante el crecimiento de las cepas CCEBI 3023 (línea azul) y CCEBI 3024 (línea roja), a escala pequeña (vacío) y media (lleno) de fermentación.

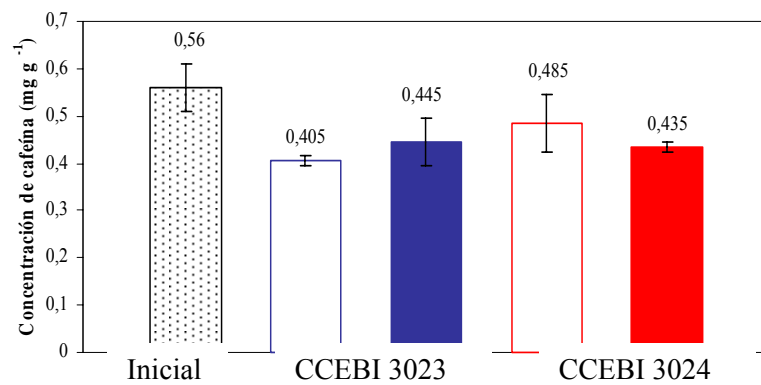


Figura 28. Concentración inicial y final de cafeína (mg g<sup>-1</sup> sustrato seco) en la pulpa de café a escala pequeña (vacío) y media (lleno) de fermentación.

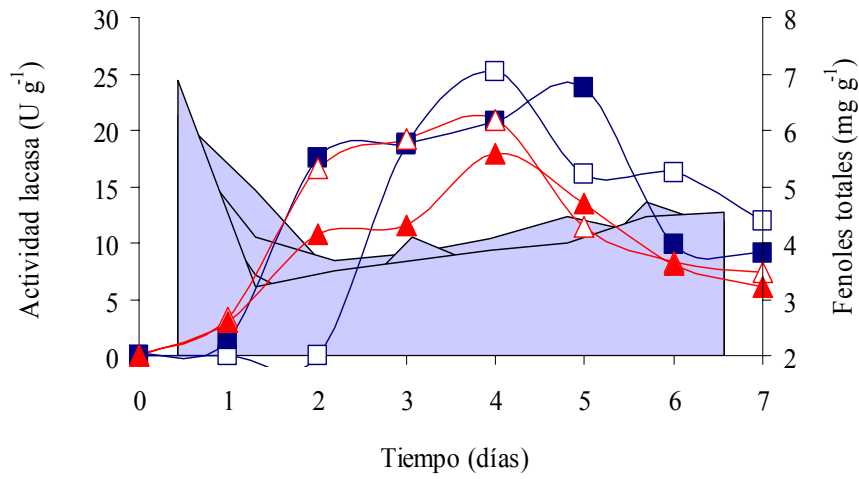


Figura 29. Cambios en la concentración de fenoles totales (áreas) de la pulpa de café y producción de lacasa (líneas) por *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3023 (línea azul) y *Pleurotus ostreatus* (Florida) CCEBI 3024 (línea roja) en columnas pequeñas (vacío) y en columnas medias (lleno).

Tabla 35. Máxima actividad lacasa producida por las cepas de *Pleurotus* spp., empleando columnas pequeñas de fermentación en medio sólido.

Cepas	Actividad lacasa (Ug <sup>-1</sup> sustrato seco)	Tiempo de fermentación
CCEBI 3021	22,74±0,34	3er. día
<b>CCEBI 3023</b>	<b>25,25±1,00</b>	4to. día
CCEBI 3024	20,90±1,45	4to. día
CCEBI 3027	19,60±4,22	3er. día
CCEBI 3073*	17,16±0,11	3er. día
MC 50*	20,10±2,05	3er. día

\*cepas patrones

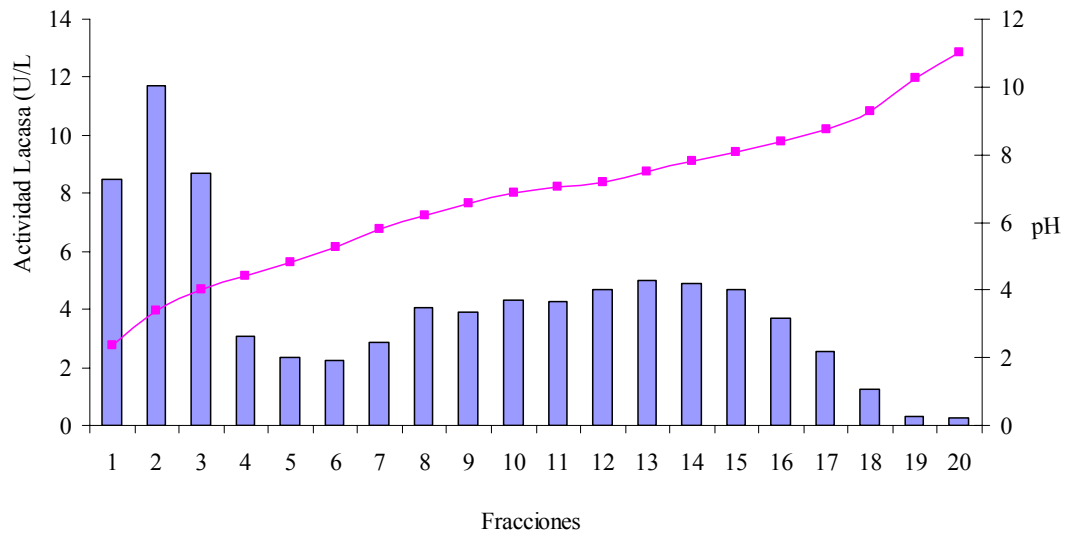


Figura 30. pH (línea) y actividad lacasa (barras) de las 20 fracciones obtenidas en el isoelectroenfoque del extracto crudo de *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3023, al cuarto día de fermentación. Se emplea ABTS como sustrato para la actividad lacasa.

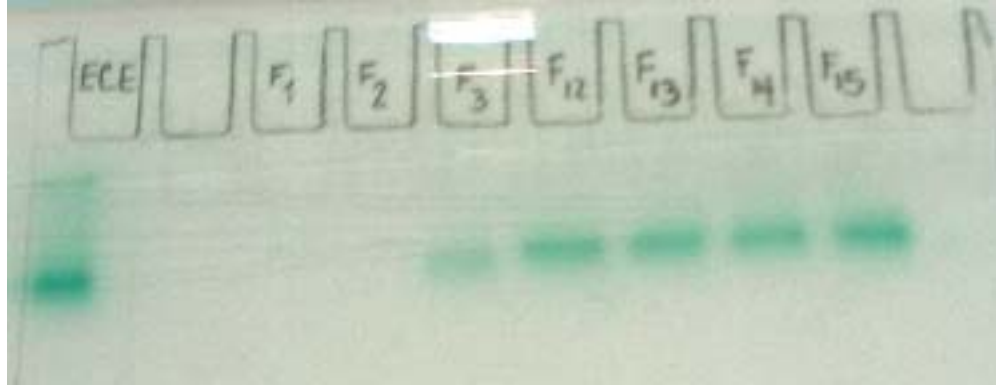


Figura 31. Zimograma de lacasa producida por *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3023 (acrilamida al 10%) de las fracciones con actividad lacasa obtenidas del isoelectroenfoque. Se reveló con 2mM ABTS en 0,1M de amortiguador de citrato de sodio (pH 3, 30°C). Se aplicó 25µL de muestras.

ECE Extracto crudo enzimático.

F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>12</sub>, F<sub>13</sub>, F<sub>14</sub> y F<sub>15</sub>: Fracciones obtenidas en el isoelectroenfoque.

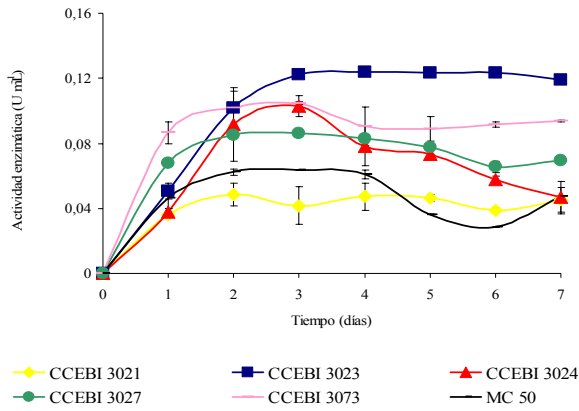
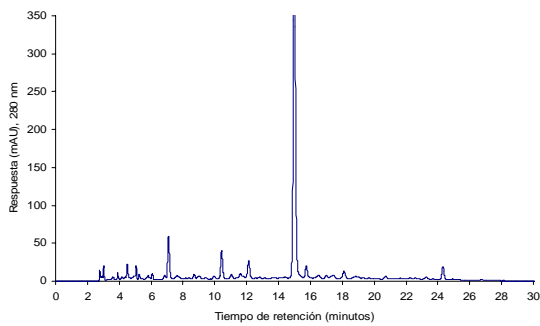
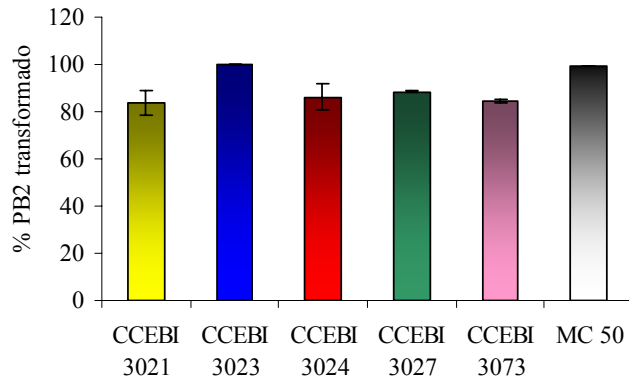
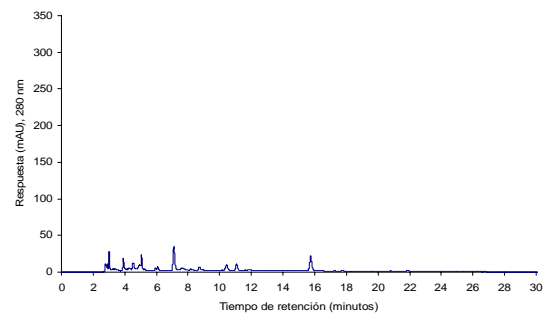


Figura 32. Actividad enzimática los extractos crudos de las cepas de *Pleurotus* spp. sobre la procianidina B2.

Figura 33. Transformación de la procianidina B2 por los extractos crudos enzimáticos de las cepas de *Pleurotus* spp. luego de tres días de fermentación.



(a)



(b)

Figura 34. Cromatograma de procianidina B2 comercial (a). Acción del extracto crudo enzimático de *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3023 sobre la procianidina B2 luego de 48 horas de fermentación (b).



Tabla 36. Costos de inversión de una planta productora de setas de 60 ton año<sup>-1</sup>.

	CUP	CUC	Total	%
Construcción y montaje	456 000	24 000	480 000	89
Equipamiento tecnológico	14 800	26 400	41 200	8
Otros gastos	14 000	5 000	19 000	3
<b>Total</b>	<b>484 800</b>	<b>55 400</b>	<b>540 200</b>	<b>100</b>

Tabla 37. Costos de los equipos para la inversión de una planta productora de setas de 60 ton año<sup>-1</sup>.

Equipos	Cantidad	Precio	
		CUP	CUC
Refrigerador	1	-	400,00
Autoclave	1	-	3 948,00
Estufa	1	-	167,25
Incubadora	1	-	474,65
Báscula	1	315,50	-
Balanza analítica	1	-	263,50
Selladora de nylons	1	-	325,67
Extractor de aire	1	500,00	-
Conductor de banda alimentador	1	750,00	-
Carreta adaptada	1	11 000,00	-
Microscopio	1	-	465,85
Aire acondicionado	1	-	400,00
Baño de María	1	-	53,45
pH	1	-	188,35
Estantes metálicos		2271,20	-
Lámpara ultravioleta	1	-	13,75
Mufla	1	-	160,25
Cámara fría y de conservación	1	-	4 585,60
Transporte	1	-	15 000,00
	Subtotal	14 836,70	26 449,32
	<b>Total</b>	<b>41 286,02</b>	

Tabla 38. Costos de producción total de una planta productora de setas de 60 ton año<sup>-1</sup>.

Concepto	Cantidad	Precio	Importe
<b>A) Materias primas</b>			
Pulpa de café húmeda (75 %) (ton)	160,6	22,0	3 533,20
Semillas de trigo (ton)	14,0	413,0	5 782,00
Inóculo (1era. generación) (kg)	58,0	70,0	4 060,00
Subtotal			13 375,20
<b>B) Materiales auxiliares</b>			
Bolsas de polietileno (unidad)	40 000,0	0,09	3 600,00
Papel aluminio (rollo)	100,0	21,70	2 170,00
Frascos omnia (750 mL)	8 000,0	0,20	1 600,00
Subtotal			7 370,00
<b>C) Combustible</b>			
Gas oíl (ton)	5,0	273,43	1 367,15
Subtotal			1 367,15
<b>D) Servicios</b>			
Electricidad (kW h <sup>-1</sup> )	30 720,0	0,06	1 843,20
Agua (m <sup>3</sup> )	750,0	0,10	75,00
Subtotal			1 918,20
<b>E) Otros costos</b>			
Salarios directos			38 489,00
Seguridad social y prestaciones (25% del salario)			9 622,25
Depreciación (8% del costo de inversión)			43 216,00
Comercialización (15 % del precio)			900,00
Subtotal			92 227,25
Total			116 257,80

Tabla 39. Gastos en salarios del personal de la planta de setas.

1 jefe de planta (dirección técnica y administrativa)			
1 jefe de turno (técnico medio)			
1 administrador (técnico medio)			
1 obrero para mantenimiento (calificado)			
1 económico (técnico medio)			
1 técnico de laboratorio (técnico medio)			
7 obreros calificados			
Categoría	Cantidad	Salario/año	Total
Director técnico administrativo	1	4 829	4 829
Técnico medio	4	3 465	13 860
Obrero calificado	8	2 475	19 800
Total		13	38 489

Tabla 40. Costos unitarios de producción.

Concepto	Importe (CUP)	%
A) Materias primas	222,92	12
B) Materiales auxiliares	122,83	6
C) Combustible	22,79	1
D) Servicios	31,97	2
E) Otros costos	1 537,12	79
Total	1 937,63	100

Concepto	Importe (CUC)	%
Bolsas de polietileno	60,00	34
Papel aluminio	36,17	21
Frascos omnia	26,67	15
Combustible	22,79	13
Electricidad	30,72	17
Total	176,35	100

Tabla 41. Indicadores de eficiencia económica (en pesos).

Concepto	Capacidad: 60 ton de setas frescas
Costo de la inversión inicial	540 200
Costo de operación anual	116 258
Precio de venta unitario	6 000
Ventas anuales	360 000
Utilidades brutas anuales (ganancia)	243 742
Impuesto (25% sobre ganancia)	60 935
Utilidades netas anuales	182 807
Rentabilidad (%)	45%
Flujo acumulado (año 7)	1 293 857
Valor actualizado neto (12%)	230 526
Tasa interna de retorno	16,2%
Período de recuperación	4to. año

Tabla 42. Flujo económico neto durante siete años de una planta productora de 60 ton año<sup>-1</sup> de setas frescas (en pesos)

Concepto	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7
Capacidad de producción	0 ton	50 ton	54 ton	58 ton	60 ton	60 ton	60 ton	60 ton
<b>Inversiones</b> <b>SUBTOTAL</b>	<b>540 200</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Costos de operación</b>								
Materias primas	0	11 146	12 038	12 929	13 375	13 375	13 375	13 375
Materiales auxiliares	0	6 141	6 633	7 124	7 370	7 370	7 370	7 370
Combustible	0	1 139	1 231	1 322	1 367	1 367	1 367	1 367
Servicios	0	1 598	1 726	1 854	1 918	1 918	1 918	1 918
Otros costos	0	92 227	92 227	92 227	92 227	92 227	92 227	92 227
<b>SUBTOTAL</b>	<b>-540 200</b>	<b>112 251</b>	<b>113 855</b>	<b>115 456</b>	<b>116 257</b>	<b>116 257</b>	<b>116 257</b>	<b>116 257</b>
<b>Ingresos</b>								
Ventas	0	300 000	324 000	348 000	360 000	360 000	360 000	360 000
<b>SUBTOTAL</b>	<b>0</b>	<b>300 000</b>	<b>324 000</b>	<b>348 000</b>	<b>360 000</b>	<b>360 000</b>	<b>360 000</b>	<b>360 000</b>
<b>Resultados</b>								
Utilidades brutas (ganancia)	<b>-540 200</b>	<b>187 749</b>	<b>210 145</b>	<b>232 544</b>	<b>243 743</b>	<b>243 743</b>	<b>243 743</b>	<b>243 743</b>
Impuestos (25% sobre ganancia)	0	46 937	52 536	58 136	60 936	60 936	60 936	60 936
Utilidades netas	<b>-540 200</b>	<b>140 812</b>	<b>157 609</b>	<b>174 408</b>	<b>182 807</b>	<b>182 807</b>	<b>182 807</b>	<b>182 807</b>
Flujo acumulado neto	<b>-540 200</b>	<b>-399 388</b>	<b>-241 779</b>	<b>-67 371</b>	<b>115 436</b>	<b>928 243</b>	<b>1 111 050</b>	<b>1 293 857</b>
Flujo actualizado neto (12%)	<b>-540 200</b>	<b>125 725</b>	<b>125 645</b>	<b>124 140</b>	<b>116 177</b>	<b>103 730</b>	<b>92 616</b>	<b>82 693</b>
<b>Flujo actualizado neto (12%)</b>	<b>230 526</b>							
<b>Tasa interna de retorno</b>	<b>16,2%</b>							