

Determinación de biomasa fúngica y su utilidad en procesos biotecnológicos

S. Rodríguez Pérez*, M.A. Crescencia Arone, J. Soria Calzadillo,
I. A. Aguilera Rodríguez y M.J. Serrat Díaz

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Patricio Lumumba s/n, Santiago de Cuba 90500, Cuba.

Determination of fungal biomass and its utility in biotechnological processes

Determinació de biomassa fúngica i la seva utilitat en processos biotecnològics

RECEIVED: 11 JANUARY 2016. REVISED: 12 APRIL 2016. ACCEPTED: 13 SEPTEMBER 2016

SUMMARY

The mushrooms constitute versatile organisms for their uses in biotechnological processes, the ones that can be grown of manner controlled by submerged (FS) and solid state (FES) fermentation, in the obtaining of products or metabolites of concern. For that, is required the determination of fungal growth for monitoring and control of fermentative processes itself. In this research, the growth of *Pleurotus* and *Trametes* strains were evaluated comparatively by gravimetric and spectrophotometric methods, in submerged and solid state fermentations. The chitin was selected as pattern molecule for spectrophotometric monitoring of the fungal growth, because it is a characteristic and majority polysaccharide of cell walls in mushrooms. In FS were obtained $1,38 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ and $0,40 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ of dry biomass for *Trametes* sp. and *Pleurotus* sp., respectively, at 12 days of inoculated. *Pleurotus* sp. CCEBI 3024 showed biggest growth in FES on coffee pulp, with values of 300,5 mg/g and 1,10 mg/g of dry biomass and chitin respectively, which evidenced a best adaptation to its components and permitting more assimilation and bioconversion of this substrate. The experiments with both mushrooms demonstrated the existence of a strong correlation ($r > 0,94$; $p < 0,01$) between the biomass concentration determined by gravimetry and the spectrophotometric content of chitin, which allowed the monitoring of microbial growth during fermentation course.

Keywords: Gravimetry; spectrophotometry; fungal biomass; chitin; fermentation.

RESUMEN

Los hongos macromicetos constituyen organismos versátiles en sus usos para procesos biotecnológicos y pueden crecer de manera controlada, mediante fer-

mentación sumergida y en medio sólido, para obtener productos o metabolitos de interés. Para ello, se requiere la determinación del crecimiento fúngico en el monitoreo y control de los procesos fermentativos. En esta investigación se comparó, usando los métodos gravimétrico y espectrofotométrico, el crecimiento de cepas de *Pleurotus ostreatus* y *Trametes maxima* en fermentación sumergida (FS) y fermentación en medio sólido (FES). Como biomolécula patrón para el seguimiento espectrofotométrico del crecimiento se seleccionó la quitina, por ser un polisacárido característico de las paredes celulares de los hongos. En FS se obtuvo $1,38 \pm 0,01 \text{ g/L}$ y $0,40 \pm 0,02 \text{ g/L}$ de biomasa seca para los cultivos de *Trametes* sp. y *Pleurotus* sp., respectivamente, después de 12 días decultivos. En la FES sobre pulpa de café, *Pleurotus* sp. CCEBI 3024 mostró mayor crecimiento con valores de 300,5 mg/g y 1,10 mg/g de biomasa seca y quitina respectivamente, evidenciando una mejor adaptación a los componentes de la misma lo que posibilitó una mayor asimilación y bioconversión de este sustrato. En ambos casos se observó una fuerte correlación entre la concentración de biomasa determinada por gravimetría y la concentración de quitina estimada por espectrofotometría ($r > 0,94$ $p < 0,01$), lo que permitió el seguimiento del crecimiento microbiano según las condiciones fermentativas establecidas.

Palabras clave: Gravimetría; espectrofotometría; biomasa fúngica; quitina; fermentación.

RESUM

Els fongs macromicets constitueixen organismes versàtils en els seus usos per a processos biotecnològics.

*Correpondins author: suyen@cebi.uo.edu.cu

lògics i poden créixer de manera controlada, mitjançant fermentació submergida i enmig sòlid, per obtenir productes o metabòlits d'interès. Per a això, es requereix la determinació del creixement fúngic en el monitoratge i control dels processos fermentatius. En aquesta investigació es va comparar, usant els mètodes gravimètric i espectrofotomètric, el creixement de soques de *Pleurotus ostreatus* i *Trametes máxima* en fermentació submergida (FS) i fermentació en medi sòlid (FES). Com biomolècula patró per al seguiment espectrofotomètric del creixement es va seleccionar la quitina, per ser un polisacàrid característic de les parets cel·lulars dels fongs. En FS es va obtenir $1,38 \pm 0,01$ g / L i $0,40 \pm 0,02$ g / L de biomassa seca per als cultius de *Trametes sp.* i *Pleurotus sp.*, respectivament, després de 12 dies de cultius. A la FES sobre polpa de cafè, *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 va mostrar major creixement amb valors de 300,5 mg / g i 1,10 mg / g de biomassa seca i quitina, respectivament, evidenciant una millor adaptació als components de la mateixa el que va possibilitar una major assimilació i bioconversió d'aquest substrat. En tots dos casos es va observar una forta correlació entre la concentració de biomassa determinada per gravimetria i la concentració de quitina estimada per espectrofotometria ($r > 0,94$ $p > 0,01$), el que va permetre el seguiment del creixement microbià segons les condicions fermentatives establertes.

Paraules clau: Gravimetria; espectrofotometria; biomassa fúngica; quitina; fermentació.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son las más numerosas y antiguas entidades bióticas que existen, logrando colonizar exitosamente cada nicho ecológico del planeta. Estos han sido empleados para la obtención de medicamentos (antibióticos, vitaminas, aminoácidos), elaboración de alimentos (pan, queso, leche, bebidas y licores), producción de solventes (acetona) y reactivos, degradación de compuestos tóxicos y residuales industriales (ej. hidrocarburos policíclicos aromáticos), entre otras aplicaciones. El creciente uso de estos entes biológicos en la biotecnología y para la protección medioambiental ha fortalecido la necesidad de multiplicarlos de manera controlada, y que las propiedades que los hacen útiles permanezcan estables¹.

Entre las biotécnicas de cultivo empleadas para el crecimiento microbiano están la fermentación en estado sólido (FES) y la fermentación líquida o sumergida (FS). La fermentación en medio sólido es una tecnología de elección para la obtención de productos microbiológicos, los cuales son de utilidad en la industria alimenticia, química y farmacéutica. La FES además es utilizada para la obtención de setas comestibles, la transformación de desechos agroindustriales en alimento para los animales y para la producción de enzimas de interés industrial y medioambiental, entre otros. La utilización de los residuos agro-industriales

como sustratos en FES proporciona una alternativa de aprovechamiento o revalorización de los mismos².

Por su parte, la FS ha sido desarrollada para una gran variedad de hongos, ofreciendo la posibilidad de una alta producción de biomasa en un espacio compacto, menor tiempo de crecimiento y menores posibilidades de contaminación. En esta, la producción de biomasa micelial y de exopolisacáridos depende de las especies utilizadas, las condiciones de crecimiento, el tiempo y sus requerimientos nutricionales³.

Por tales razones resulta necesario contar con métodos analíticos generales o específicos, para el seguimiento del crecimiento fúngico durante el desarrollo de procesos fermentativos sobre sustratos orgánicos y, a su vez, optimizar parámetros de interés. El método generalmente utilizado para cuantificar la biomasa es la determinación de su peso seco o método gravimétrico, el cual presenta importantes limitaciones en su aplicación a la FES, debido a la íntima relación física existente entre la biomasa microbiana y el sustrato, que hace casi imposible su separación.

Sin embargo, la pared celular de los hongos está conformada principalmente de quitina, un polisacárido compuesto de residuos de N-acetil-β-D-glucosamina unidos por enlaces β-1,4 (Figura 1), cuya presencia propicia una diferenciación entre las paredes celulares de estos organismos con respecto a los vegetales, lo que puede ser aprovechado para fines analíticos, aunque su contenido específico varía marcadamente entre diferentes especies de hongos. Aunque en trabajos anteriores ha sido cuantificada la quitina para determinar biomasa fúngica, aún son escasos los informes acerca del contenido de este polisacárido en basidiomicetos bajo condiciones diferentes de fermentación⁴⁻⁵.

En el desarrollo de la investigación se seleccionaron las cepas de *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3024 y *Trametes máxima* CCEBI 1001, de la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), teniendo en cuenta que estos constituyen basidiomicetos que crecen fácilmente a temperatura ambiente y sobre diversos sustratos naturales o artificiales. Ambos organismos han sido reconocidos por sus potencialidades para la degradación de materiales lignocelulósicos, contaminantes químicos recalcitrantes, producción de biomasa y/o enzimas, por lo que constituyen hongos de interés biotecnológico⁶.

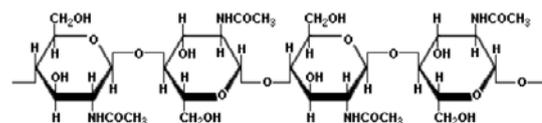


Figura 1. Estructura química de la quitina.

En el presente trabajo se evalúa el crecimiento fúngico mediante dos métodos analíticos: la determinación del peso seco de la biomasa (gravimetria) y la cuantificación espectrofotométrica de quitina, estableciendo comparaciones entre los valores obtenidos en el cultivo de organismos de estas dos especies de basidiomicetos, crecidos en FS y FES; permitiendo el

seguimiento del crecimiento fúngico en dependencia del proceso fermentativo que se desarrolle.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención de los inóculos fúngicos se utilizaron las cepas de *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3024 y *Trametes maxima* CCEBI 1001, conservadas en Agar Extracto de Malta a 4°C y pertenecientes a la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Universidad de Oriente⁷. Los hongos se sembraron en placas Petri conteniendo el medio Agar Papa Dextrosa (APD) a pH 6, colocando una pequeña porción de micelio en el centro de las placas. Luego se incubó a 28°C, hasta que el micelio cubrió toda la placa.

Para la inoculación en medio líquido, en el desarrollo de la Fermentación Sumergida (FS), se raspó con una espátula estéril el micelio crecido en las placas y se adicionó directamente a los frascos Erlenmeyers conteniendo 50 mL del medio de cultivo estéril (caldo peptona-15 g/L). Los frascos se incubaron en zaranda orbital a 120 rpm, en área climatizada a 25°C. Se muestreó cada 3 días hasta completar los 15 días de incubación, tomando todo el contenido del Erlenmeyer para la separación de la biomasa por filtración. Se emplearon 5 réplicas para cada punto experimental.

Para la FES se utilizó como sustrato la pulpa de café, residual mayoritario obtenido del beneficiado de este grano. La pulpa de café fresca se colecta en el centro de beneficio, se deja secar al sol y se almacena en sacos en un lugar fresco y oscuro para su conservación, por no más de dos meses. El citado sustrato se remojó en agua durante 4 horas, y se esterilizó en autoclave a 121°C durante una hora. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente, se mezcló con el inóculo fúngico a razón del 10 % de micelio con relación al peso del sustrato húmedo y se envasó entonces en pomos de cristal estéril con una capacidad volumétrica de 500 mL. Se dejó un control negativo (sin crecimiento de biomasa) consistente en pulpa de café (sustrato) bajo el mismo tratamiento, sin inocular. Los frascos inoculados se incubaron en un local en penumbra a una temperatura de 25°C y con una humedad relativa de un 70-80%, durante 20 días. Durante este tiempo, ambos microorganismos lograron la colonización completa del sustrato. Entonces, de cada frasco se tomaron varias porciones (réplicas) de 3 g del sustrato colonizado para colocar en un erlenmeyer de 25 mL, con un volumen mínimo de agua destilada (10 mL). Cada porción se agitó suavemente por una hora, en una zaranda orbital con aditamento para estos erlenmeyer, permitiendo el desprendimiento de la biomasa del hongo para su posterior filtración y determinación. A igual tratamiento fue sometida una porción del control negativo anteriormente descrito.

Tanto la biomasa obtenida por filtración del cultivo sumergido como de la pulpa de café, según se ha descrito anteriormente, fueron secadas durante 24 horas en estufa a 110°C hasta peso constante^{4,8,9}.

A la biomasa seca en ambos casos (FS y FES) y para ambos hongos, se le realizó la determinación de quitina, según el método de Chen y Johnson (1983) con algunas modificaciones. Para el ensayo se tomaron 0,2 g de biomasa seca y se hidrolizaron con H₂SO₄ (72%) durante 4 h a temperatura ambiente; luego se diluyó la solución hidrolizada hasta obtener una concentración de ácido del 3%, se prosiguió con la hidrólisis a 100 °C en estufa por otras dos horas, se enfrió, se neutralizó con NaOH 10 N y se centrifugó. Se tomaron 0,5 mL del sobrenadante y se llevaron a un tubo de ensayos con cierre hermético, se añadieron 0,25 mL de la solución A, se tapó el tubo y se calentó a 90 °C durante 1 h; posteriormente se enfrió y se añadieron 0,8 mL de etanol para disolver el precipitado formado. Se adicionaron entonces 0,25 mL del reactivo de Ehrlich para el desarrollo de color y, por último, se midió la absorbancia a 530 nm. La solución A consistió de acetilacetona 4 % (v/v) en carbonato de sodio 1,25 N y el reactivo de Ehrlich, de 1,6 g de N,N-dimetil p-aminobenzaldehído disueltos en una mezcla de 30:30 (mL) de etanol y HCl (c). Se empleó glucosamina:HCl como solución patrón para la curva de calibración⁵.

Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizó el software STATGRAPHICS *Plus*TM 5.1. Los datos de crecimiento se compararon mediante un ANOVA de clasificación simple y las medias se compararon *a posteriori* mediante la prueba de Tukey. Para la comparación de los dos métodos analíticos se realizaron análisis de correlación producto-momento y de regresión, empleando el coeficiente de correlación de Pearson y al estadístico de Durbin-Watson. Se realizó una evaluación *a priori* de la especificidad del método mediante pruebas de comparación de medias (test-Student) y de las desviaciones típicas (test-Fisher), así como las determinaciones de los intervalos de confianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del crecimiento fúngico en Fermentación Sumergida

Durante la etapa de crecimiento en FS se pudo observar la formación de masas miceliales compactas de color blanco en forma de *pellets*, favoreciéndose la transparencia del medio de cultivo (Figura 2). Esta forma de desarrollo del micelio facilita el empleo del sobrenadante del cultivo en procesos de purificación de enzimas, extracción de exopolisacáridos u otros fines biotecnológicos. El uso de la FS se aprovecha en la obtención de metabolitos de interés farmacológico, usualmente excretados al medio de cultivo, tales como diversos polisacáridos, ácidos orgánicos y pequeñas moléculas lipídicas con actividad biológica¹⁰.

En el cultivo de ambos microorganismos se obtuvo el mayor crecimiento fúngico a los 12 días de inoculado el medio caldo peptona (Figura 3); alcanzándose valores máximos de biomasa seca de 1,38±0,01 g/L y 0,40±0,02 g/L para *Trametes maxima* y *Pleurotus ostreatus*, respectivamente. Se observó una mayor tasa de crecimiento para el género *Trametes*, con va-

lores de 0,11 mg/d de biomasa comparado con los 0,03 mg/d para *Pleurotus*.



Figura 2. Crecimiento de *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3024 en cultivo sumergido.

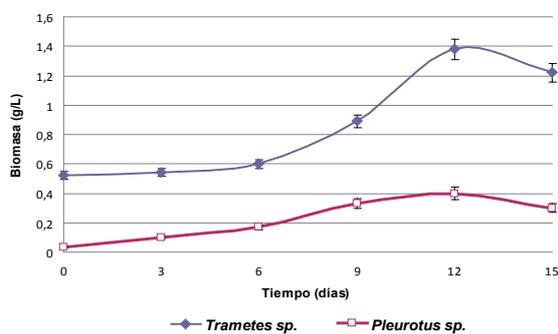


Figura 3. Curva de crecimiento microbiano en Fermentación Sumergida para *P. ostreatus* y *T. maxima*, determinadas en función del peso seco de la biomasa (gravimetría).

Estos valores obtenidos resultan cercanos a cultivos de *Trametes sp.*, crecido en medios líquidos con inductores del crecimiento (1.9 g/l - 2.0 g/l); sin embargo, resultan bajos si se comparan con los promedios obtenidos en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* con diferentes fuentes carbonadas y peptona (hasta 16.62g/L), siendo este el hongo de menor producción en el trabajo¹¹. Son varios los factores que influyen en el rendimientos de biomasa en los cultivos en medio líquido, por lo que resulta necesario su evaluación para cada condición ensayada.

Aunque *Trametes maxima* CCEBI 1001 presentó una mayor velocidad de crecimiento, en este microorganismo se observó una fase de latencia o adaptación (de 3 a 6 días), la cual no fue detectada en el crecimiento de *Pleurotus sp.* La cepa de *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3024 es una cepa comercial, que ha sido sometida frecuentemente a propagación en medios sintéticos para su conservación en subcultivos; lo antes señalado explica su mejor adaptación al medio de cultivo utilizado para su crecimiento. Sin embargo, el organismo *Trametes maxima* CCEBI 1001 es una cepa recientemente aislada de su hábitat natural, no adaptada a su propagación en medios de cultivo de laboratorio.

En otras investigaciones realizadas con *Pleurotus sp.* CCEBI 3024, crecido en diferentes medios de cultivos, se obtuvieron mayores valores de biomasa (1,4–7,5g/L) en tiempos similares de incubación, pero empleando

medios complejos enriquecidos con azúcares (5-20 gL⁻¹)¹³. En ese mismo trabajo, pero en ausencia de la glucosa, la cantidad de biomasa no sobrepasó los 0,3 g/L.

Se puede atribuir la menor producción de biomasa de *Pleurotus* observada en este trabajo (0,40 ± 0,02 g L⁻¹) a que el medio de cultivo utilizado (caldo peptona sin adición de un azúcar) está limitado en cuanto al suministro de carbono para el microorganismo, debido a la ausencia de un sacárido adicional en el mismo. El crecimiento microbiano está estrechamente relacionado con la fuente de nutrientes disponible, fundamentalmente en lo concerniente a macronutrientes como el carbono y el nitrógeno. No obstante esta posible limitación, se utilizó este medio con peptona debido a que puede suplir tanto los requerimientos de carbono como de nitrógeno, con un solo constituyente orgánico. Además, en el medio utilizado debían ser mínimos y conocidos los componentes orgánicos empleados, con el fin de reducir las interferencias en las determinaciones de biomasa, principalmente en el método espectrofotométrico.

La quitina es uno de los componentes principales de las paredes celulares de los hongos, que confiere soporte-protección a estos microorganismos y a su vez permite su diferenciación. La determinación del crecimiento fúngico puede hacerse mediante la cuantificación espectrofotométrica de este compuesto; siendo este un método rápido, sensible y que reduce la sobrevaloración por componentes del sustrato, a diferencia del método gravimétrico^{5,14}. Para ello se hace necesario estimar los valores en que la quitina se encuentra presente en las diferentes especies de hongos.

En el seguimiento del crecimiento fúngico, a través de la cuantificación indirecta de la biomasa en base al contenido de quitina, se obtuvo un perfil similar al observado en medición gravimétrica directa (Figura 4). Se cuantificó 0,019±0,001 mg_{quitina}/g_{micelio} de *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3024 y 0,023±0,001 mg_{quitina}/g_{micelio} de *Trametes maxima* CCEBI 1001, a los doce días. Los valores promedio del contenido de quitina con respecto al micelio seco, en cada especie de hongo, durante toda la fermentación, fueron similares, detectándose 0,015±0,003 mg_{quitina}/g_{micelio} y 0,017±0,005 mg_{quitina}/g_{micelio} para las CCEBI 3024 y CCEBI 1001, respectivamente.

Evaluando el contenido específico de quitina con respecto a la biomasa seca, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las especies de hongos estudiadas (p=0,076); pero sí hubo diferencias, referidos al contenido total de este componente comparativamente en los diferentes medios de cultivo, resultando proporcional a la cantidad de biomasa crecida en el medio (p=0,004). Esto avala su uso como medida del crecimiento fúngico, siendo posible estimar la biomasa a partir de estos datos, pues el rango de error no sobrepasa el 5 % según su CV de 4,17 % para los datos en general.

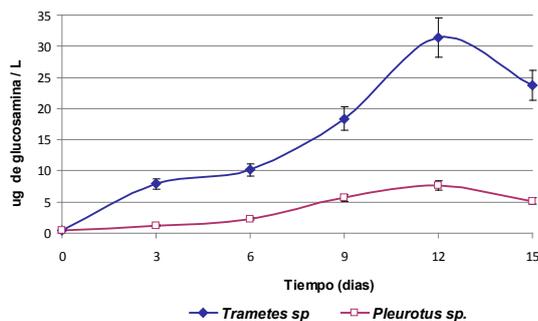


Figura 4. Evaluación del crecimiento microbiano de *P. ostreatus* CCEBI 3024 y *T. maxima* CCEBI 1001 mediante la cuantificación de quitina (expresada como glucosamina) en Fermentación Sumergida.

Con relación al porcentaje de quitina en base a biomasa seca, los valores obtenidos en este trabajo son inferiores a los descritos para diferentes hongos crecidos sobre sustratos naturales; los que varían de 1.29% – 3.11% promedio [9]. Por otro lado, en un medio como Agar Extracto de Malta el *Trametes* sp. exhibe de 0.33 % a 0.53 % y en Agar Papa Dextrosa hasta de 1.31 %, superiores al porcentaje cuantificado en este trabajo¹⁴. Esto corrobora la probable afectación del crecimiento fúngico debido a limitación de nutrientes, anteriormente referida.

Los valores del crecimiento microbiano, obtenidos por ambos métodos, fueron estadísticamente procesados mediante un análisis de correlación producto-momento, evaluando posteriormente el ajuste a una regresión lineal. Teniendo en cuenta la totalidad de los datos de la concentración de biomasa (ambos hongos sin distinción) observados a lo largo de toda la curva de crecimiento, se obtuvo un coeficiente de correlación (r) entre ambas determinaciones analíticas de 0,65 ($p < 0,05$), no existiendo correlación serial ($E_{\text{Durbin-Watson}} = 1,1909$; $p = 0,288$).

Para el análisis particular con cada organismo, se escogió la fase de crecimiento exponencial hasta los 12 días, por ser la de mayor interés en el estudio del crecimiento según nos muestra las figuras 3 y 4. Los resultados comparativos de ambos métodos analíticos, para la evaluación del crecimiento de *Pleurotus* sp. CCEBI 3024, indican una fuerte correlación, estadísticamente significativa, entre los valores de biomasa por quitina (Pl-Q) y peso seco (Pl-G) con un coeficiente de correlación $r = 0,99$ ($p < 0,01$) (Figura 5).

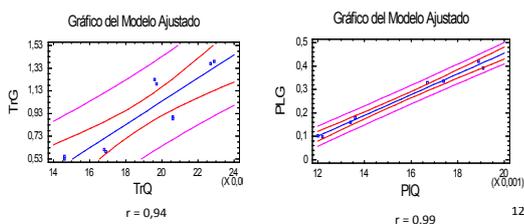


Figura 5. Gráficos de correlación entre las determinaciones de biomasa de *Trametes maxima* CCEBI 1001 (Tr) y *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3024 (Pl) por el método gravimétrico (G) y el espectrofotométrico (Q) en FS. Las unidades de medición de la biomasa son $g\ L^{-1}$ y $mg\ L^{-1}$, respectivamente.

Realizando el ajuste a un modelo lineal, para la predicción de la concentración de biomasa a partir del contenido de quitina en el micelio seco, se obtuvo la ecuación:

$$Pl-G (g\ L^{-1}) = 44,29 * Pl-Q (mg\ L^{-1}) - 0,43 \quad \text{Ecuación 1}$$

$$R^2 = 98\ %; \text{ error estándar de la estimación} = 0,015$$

En caso de la determinación de biomasa para *Trametes maxima* CCEBI 1001, igualmente es estadísticamente significativa la correlación entre los valores de biomasa por ambos métodos, mostrando un valor de $r = 0,94$ ($p < 0,05$) (Figura 5). La ecuación lineal que permite predecir la concentración de biomasa, relacionando ambos métodos, es la siguiente:

$$Tr-G (g\ L^{-1}) = 97,89 * Tr-Q (mg\ L^{-1}) - 0,98 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$R^2 = 88\ % \text{ y un error estándar de la estimación} = 0,129$$

G: por gravimetría

Q: por espectrofotometría (determinando quitina)

En consideración al comportamiento observado en el crecimiento de ambos hongos (Figuras 3 y 4), se sugiere ensayar tiempos entre 6-12 días de fermentación para obtener resultados más fiables en las predicciones de la concentración de biomasa a partir de la estimación espectrofotométrica del contenido de quitina. De esta forma se evitarían las fases de latencia o adaptación, donde es más probable que ocurran cambios apreciables en la composición macromolecular de los microorganismos, lo cual incide de forma adversa en las estimaciones indirectas del crecimiento microbiano.

Evaluación del crecimiento fúngico en Fermentación en Estado Sólido

La FES consiste en el crecimiento de microorganismos sobre materiales sólidos húmedos. Desde el punto de vista ingenieril, las características de las FES permiten el desarrollo de procesos biotecnológicos en condiciones no estériles, resultando procesos escalables, de bajo consumo de agua y energía, donde pueden utilizarse residuos agrícolas como soportes, además de la invasión rápida de este último por el microorganismo, cuestiones estas que las hacen más atractivas frente a la FS. El cultivo en sustratos sólidos naturales conlleva la ventaja de que estos proveen de múltiples nutrientes esenciales para el crecimiento fúngico, facilitando así su desarrollo¹⁵.

Al evaluar el crecimiento de los hongos estudiados en la FES sobre pulpa de café, a los 20 días se tuvo un mayor crecimiento para *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3024 (Tabla 1). Esta es una cepa comercial que ha sido tradicionalmente crecida sobre este sustrato, en la tecnología de setas comestibles promovida por el CEBI de la Universidad de Oriente www.cebi.uo.edu.cu; por lo cual presenta una mejor adaptación a sus componentes y logra una mayor biodisponibilidad de estos para su crecimiento. Un extracto de pulpa de café se ha ensayado como medio para FS, una vez pasteurizado, alcanzándose concentraciones de biomasa

de 0,26 g/L cercanos al 0,40±0,02 g/L obtenido en medio caldo peptona en este trabajo¹³.

Tabla 1. Datos de la evaluación del crecimiento microbiano en FES por medida directa (gravimetría) e indirecta (espectrofotometría).

Biomasa/Hongo	Pleurotus ostreatus CCEBI 3024	Trametes maxima CCEBI 1001
Peso seco (mg/g _{pulpa}) – gravimetría	300,50 ± 2,38 ^a	200,00 ± 1,58 ^b
Quitina (mg/g _{pulpa}) – espectrofotometría	1,100 ± 0,012 ^a	0,770 ± 0,003 ^b

^aLetras diferentes en los superíndices para la misma fila, indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

En Cuba, el género *Pleurotus* ha sido cultivado sobre residuos agroindustriales como el follaje y el bagazo de caña de azúcar, la pulpa de café, la cáscara de coco y la cáscara de cacao. Otros sustratos que han sido utilizados para el crecimiento vegetativo (micelial) de este género son el trigo y el sorgo, pero presentan el inconveniente de ser granos con valor económico y no residuales¹⁶. La utilización de la FES como biotécnica para el crecimiento de los hongos ensayados permite aprovechar la pulpa de café como sustrato, que es un residual abundante en la región oriental de Cuba, previendo un impacto económico–ambiental favorable.

El contenido promedio de quitina en biomasa seca es similar para ambos organismos, resultando de 3,7 ± 0,1 mg_{quitina}/g_{biomasa}, muy superior al 0,023 ± 0,001 mg_{quitina}/g_{biomasa} de valor máximo para la FS y superando igualmente (~ 38 %) el rango de los valores descritos de 6,6 – 23,9 % para 13 hongos degradadores de madera¹⁷. Los medios de cultivos con alto contenido de humedad no favorecen la producción de cantidades eficientes de quitosano por los hongos filamentosos, la cual se encuentra estrechamente relacionada con la biomasa producida, causado por una reducida o nula porosidad para adhesión, pérdidas de estructuras de las partículas, incremento de la viscosidad, mayor dispersión y dificultades en el acceso al oxígeno y los nutrientes¹⁸. Por su parte, la mayor cantidad de compuestos nitrogenados presentes en la pulpa de café puede favorecer las rutas de incorporación de nitrógeno, entre ellos la N-acetilación de glucosa y con ello el enriquecimiento de glucosamina en la pared celular; superando los valores tradicionalmente cuantificados en el crecimiento sobre otros sustratos¹⁹.

Desde el punto de vista analítico, la técnica de monitoreo del crecimiento micelial del hongo por medida directa, usando el método gravimétrico (peso seco), resulta inapropiado especialmente cuando se trata de la cuantificación en FES. Esto se debe a que en el proceso de separación del micelio del sustrato existe una alta probabilidad de que se produzca arrastre en el sustrato, debido que está fuertemente unida, resultando en la pérdida de la biomasa fúngica a estimar, e introduciéndose de esta forma errores en la cuantificación. Es posible reducir estos errores empleando un método basado en la determinación espectrofotométrica, lo cual también mejora la rapidez de dicha evaluación.

Para resolver tal situación, han sido estudiados diferentes métodos indirectos tales como: velocidad de respiración, la determinación de la actividad biológica como ATP, actividad enzimática, proteínas, detecciones inmunológicas de componentes específicos, el análisis de los componentes de la pared celular como quitina/glucosamina o ergosterol, entre otros^{5,9,20}.

El contenido de quitina puede variar según la fase morfológica del hongo, representando el 1-2% del peso seco de la pared celular de las levaduras, mientras que en los hongos filamentosos puede llegar al 10-20 %. La medida de la quitina como componente de la pared celular es un indicador apropiado para la estimación del crecimiento del hongo pues, como se había planteado anteriormente, este es un componente característico y mayoritario^{16, 17}.

Los resultados comparativos de ambos métodos analíticos para la evaluación del crecimiento de *Pleurotus sp.*, y *Trametes sp.*, en FES, indican una fuerte correlación estadísticamente significativa entre los valores de biomasa determinada por quitina y peso seco, con $r = 0,98$ y $p < 0,01$ (Figura 6). Esto confirma la correlación observada en la FS (Figura 5).

Teniendo en cuenta un modelo de dependencia lineal, como en análisis anteriores, se puede utilizar la ecuación siguiente para la predicción del contenido de biomasa fúngica en FES:

$$FES_G \text{ (g/L)} = 276,61 * FES_Q \text{ (}\mu\text{g/L)} - 7,04 \text{ Ecuación 3}$$

$$R^2 = 98 \% \text{ y un error estándar de la estimación de } 7,78.$$

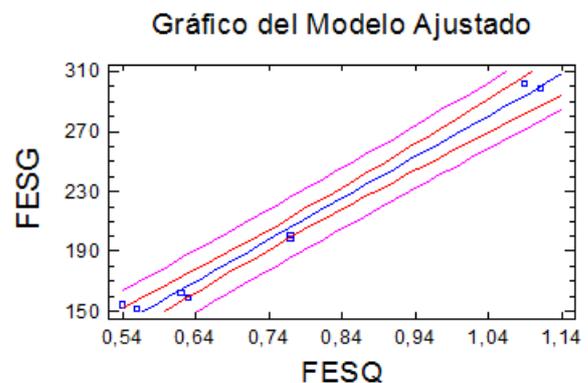


Figura 6. Gráfico de correlación entre las determinaciones de biomasa en FES de ambos hongos, por el método gravimétrico (G) y el espectrofotométrico (Q), ($r = 0,98$, $p < 0,01$). Las unidades de medición de la biomasa es g L^{-1} y $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Por lo que incorporando en la ecuación anterior del modelo ajustado, valores cercanos a los de quitina real cuantificados en las muestras obtenidas en la experimentación, se obtuvo valores de peso seco similares a los descritos; sobre todo cuando se trabaja con *Pleurotus sp.* CCEBI 3024, el hongo con mejor correlación entre ambas determinaciones en FS (Tabla 2).

Tabla 2. Ejemplo de estimaciones de biomasa en FES realizadas a partir de las ecuaciones del modelo lineal según describe la Ecuación 3.

Valores predichos		95 % Límites de predicción		95 % Límites de Confianza	
X	Y	Inferior	Superior	Inferior	Superior
0,54	142,32	120,92	163,73	132,57	152,81
1,11	299,99	276,93	323,06	286,99	312,99

X: mg/g_{sustrato} de Quitina Y: g/ g_{sustrato} biomasa seca

En los resultados de la cuantificación de quitina se obtuvieron valores de desviación estándar inferiores a los de la cuantificación directa de la biomasa por gravimetría. La comparación de medias del total de las determinaciones mediante la prueba *t-Student* arrojó una $t = -6,6103 < t_{\text{tab}}$ con una $p < 0,05$. En tanto, el análisis de varianza presentó una $F = 1916,91 < F_{\text{tab}}$ y un valor $p < 0,01$, indicando diferencias en la sensibilidad de las determinaciones a favor del método espectrofotométrico. Por otro lado, se escoge como la mejor variante analítica la que presenta más estrecho su intervalo de confianza, que resultó igualmente la determinación espectrofotométrica de quitina (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de los intervalos de confianza para ambas determinaciones analíticas de biomasa en FES: Q, espectrofotométrica (quitina); G, gravimétrica.

Para un 95 %, el intervalo de confianza para la media (X) y la varianza (δ) son:
FES_Q -- $[0,0138 \leq X \leq 0,0176]$ y $[0,0019 \leq \delta \leq 0,0069]$ ***
FES_G -- $[0,1775 \leq X \leq 0,3458]$ y $[0,0729 \leq \delta \leq 0,2690]$

Los resultados obtenidos en esta investigación, donde los valores de quitina en el micelio de ambos basidiomicetos oscilan entre 0,55 - 1,10 mg/g sustrato para los diferentes tratamientos, son similares a los reportados por otros autores en estudios de FES con otros hongos (Tabla 1). Por ejemplo, se describen valores de 0,78 - 1,46 mg/g en *Aspergillus niger* crecido en diferentes residuos agrícolas y con *Agaricus bisporus* de 0,65-1,15 mg/g. Por otro lado, estudios realizados anteriormente en los cuerpos fructíferos de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes* (shiitake) indicaron que el contenido de quitina es una característica estable de la especie y no existen diferencias significativas entre diferentes variedades^{17,18,21}.

CONCLUSIONES

El crecimiento fúngico en la FS mostró un máximo a los 12 días, resultando tres veces mayor la producción de biomasa para la cepa de *Trametes máxima* CCEBI 1001 con respecto a lo observado en *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3024. Sin embargo, la cepa *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3024 mostró un mejor crecimiento en FES, por tener una mejor adaptación al medio de cultivo empleado (pulpa de café) con $300,5 \pm 2,38$ mg/g a los 20 días de fermentación.

La determinación de biomasa fúngica en ambos tipos de fermentaciones, mediante la cuantificación de quitina, resulta un método rápido, sensible y confiable; por cuanto muestra una fuerte correlación con la determinación gravimétrica de biomasa (peso seco) como medida directa, con $r > 0,94$ $p < 0,01$, ajustándose a un modelo de regresión lineal para las estimaciones de las determinaciones ($R^2 > 80\%$, $p < 0,05$).

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo del proyecto JEADI ABF071014-05, en el desarrollo de las investigaciones referidas.

REFERENCIAS

- Evans G. M.; Furlong J. C. Environmental Biotechnology: Theory and Application. Ed. John Wiley & Sons Ltd **2003**, England, 235-254.
- Subramaniam R.; Vimala R. Solid State and Submerged Fermentation for the Production of Bioactive Substances: A comparative Study. *Int. J. S. N.* **2012**, 3 (3), 480-486.
- Pérez-Guerra N.; Torrado-Agrasar A.; López-Macias C.; Pastrana L. Main characteristics and applications of solid fermentation". *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 2(3), 343-350.
- Jones H.L.; Worrall J.J. Fungal biomass in decayed wood. *Mycologia* **1995**, 87 (4), 459-466.
- Chen G.C.; Johnson B.R. Improved Colorimetric Determination of Cell Wall Chitin in Wood Decay Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, 46 (1), 13-16.
- Jurado M.; Saparrat M.; Martínez Á.T.; Martínez M. J. Application of White-Rot Fungi in Transformation, Detoxification, or Revalorization of Agriculture Wastes: Role of Laccase in the Processes. *Comprehensive Biotechnology (2nd Edition)* **2011**, 595-603.
- Orberá T.; Camacho M.; Lebeque Y.; Serrano M.; Rodríguez S. The Industrial Biotechnology Study Centre Wild Type Culture Collection. *WFCC Newsletter* **2011**, July (50), 15-18.
- APHA. "Standard Methods for the examination of water and wastewater". 20th Edition **1998**, Washington D.C, USA, p. 1124.
- Matcham S. E.; Jordan B. R.; Wood D. A.; Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1985**, 21, 108-112.
- Patel S.; Goyal A. Recent developments in mushroomms as anti-cancer therapeutics: a review. *Biotechnology* **2012**, 2, 1-15.
- Adebayo-Tayo B.; Emeka-Ugwu E. Influence of Different Nutrient Sources on Exopolysaccharide Production and Biomass Yield by Submerged Culture of *Trametes versicolor* and *Coprinus* sp. *AU J.T.* **2011**, 15 (2), 63-69.
- Horincar V.; Popa A.; Parfene G.; Balaes T. Study of Preliminary Biotechnological Conditions for

- Pleurotus Ostreatus* Cultivation on Submerged System. *Innov Rom Food Biotechnol* **2014**, 15, Issue of November, 58-62.
13. Rodríguez S.; Garcia N.; Bermúdez R.C.; Fernández M.; Augur CH. Decolourisation of mushroom farm wastewater by *Pleurotus ostreatus*. *Biodegradation* **2008**, 19, 519–526.
 14. Mario E.; Rapanà P.; Tomati U. Galli E. Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, 43 (1), 8–12.
 15. Krishna C. Solid state fermentation systems: an overview. *Crit Rev Biotechnol.* **2005**, 25 (1), 1–30.
 16. Bermúdez R.C.; García N.; Gross P.; Serrano M. Cultivation of *Pleurotus* on agricultural substrates in Cuba. *Micol. Appl. Int.* **2001**, 13 (1), 25-29.
 17. Maghsoodi V.; Yaghmaie S.; Razavi J. Production of chitosan by submerged fermentation from *Aspergillus niger*. *Scientia Iranica* **2009**, 16 (2), 145-148.
 18. Maghsoodi V.; Yaghmaei S; Comparison of Solid Substrate and Submerged Fermentation for Chitosan Production by *Aspergillus niger*. *Chemistry and Chemical Engineering* **2010**, 17 (2), 153-157.
 19. Araki, Y.; Ito, E. A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*. *Eur. J. Biochem.* **1975**, 55, 71-78.
 20. Schnurer, J. Comparison of Methods for Estimating the Biomass of Three Food-Borne Fungi with Different Growth Patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, Feb., 552-555.
 21. Vette J. Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. *Food Chem.* **2007**, 102 (1), 6–9.