

## **Biotecnología en Hongos Superiores.**

### **Parte II. Cultivo de hongos ostra en sustrato a base de cáscara de semilla de girasol.**

Néstor Raúl Curvetto

Licenciado en Química y Bioquímica (UNS), MSc (Can) y Dr. en Bioquímica (UNS). Profesor Titular de Fisiología Vegetal del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur. Contacto: [micouns@criba.edu.ar](mailto:micouns@criba.edu.ar)

En los países en desarrollo el cultivo de los hongos es una alternativa posible por su relativo bajo costo de producción y su alta rentabilidad. Es demandante de mano de obra y puede realizarse en zonas rurales o semi-urbanas. En el Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur y CERZOS (CONICET), el Dr. Nestor Curvetto y su equipo trabajan desde hace varios años en temas relacionados a la biotecnología de producción de hongos comestibles y medicinales.

En la antigüedad, los hongos comestibles se recolectaban, ya que poco se sabía de su biología y manejo. Las culturas orientales iniciaron su cultivo en el 900 AC. En el siglo XVII, Francia estableció el cultivo formal del *Agaricus* (champignon) y 100 años después los ingleses publicaron los primeros trabajos sobre su cultivo. Lentamente el cultivo de los hongos comestibles comenzó a difundirse en el mundo occidental, pero no fue sino hasta mediados del siglo XX que comenzó una nueva era para este cultivo, con la disponibilidad en el mercado de blanco de hongo o “semilla” de buena calidad.

Actualmente, la casi totalidad del consumo de hongos depende de su cultivo, siendo los más difundidos el champignon (*Agaricus*), el shiitake (*Lentinus*) y el ostra (*Pleurotus*), estos dos últimos conocidos como “hongos de especialidad”. En occidente el único hongo recogido en forma silvestre cuyo consumo está muy difundido es el *Boletus*, que se comercializa en estado seco.

El cultivo de los hongos ofrece seguridad al consumidor y le permite incorporar a la dieta un producto altamente beneficioso para la salud. Es un alimento de excelente valor nutricional. También poseen importantes propiedades farmacológicas, algunas ya demostradas y otras en estudio.

La actividad productora de hongos comestibles sobre desechos o residuos agroindustriales propone una utilización ecológica de los mismos. La disposición o eliminación de estos residuos suele constituir un problema para el medio ambiente. El sustrato gastado (sustrato que queda luego de la cosecha de los hongos) es un producto que puede ser utilizado para enmiendas de suelos, y para incluirlos en dietas de rumiantes por haber mejorado su contenido en sustancias orgánicas biodegradables o digeribles.

Finalmente, pero no menos importante, el cultivo de hongos es una actividad socioeconómica de excelentes perspectivas para países en desarrollo que necesitan diversificar su producción agrícola en el área más rentable de cultivos intensivos y en expansión.

En el ámbito del Departamento de Agronomía y del CERZOS, trabajamos desde hace varios años en temas relacionados a la biotecnología de producción de hongos comestibles y medicinales. En esta segunda entrega sobre el tema, presentamos la factibilidad de cultivar hongos ostra utilizando como sustrato cáscara de semilla de girasol. Esta metodología fue patentada (Curvetto, 1999) y está incluida en el manual de distribución mundial Mushroom Growers' Handbook (Curvetto *et al.*, 2004).

#### **Qué es un hongo?**

A pesar que los hongos se han mostrado tradicionalmente como plantas, poseen características muy diferentes, incluyendo algunas propias del reino animal. La clasificación moderna colocó a

los hongos en un grupo diferente al de las plantas y los animales, asignándole el reino Mycetea. Los hongos no tienen clorofila y no pueden fabricar su alimento directamente desde CO<sub>2</sub> y agua utilizando la energía solar como lo hacen las plantas verdes. Para alimentarse, el micelio (cuerpo vegetativo del hongo) libera al medio enzimas que digieren los carbohidratos complejos, lípidos y proteínas del sustrato para formar moléculas más simples y fáciles de absorber. El micelio va así penetrando y transformando el sustrato, proceso que se conoce como “corrida del micelio”. En esta fase, el hongo crece y almacena energía hasta que las condiciones ambientales y nutricionales determinan la formación de los cuerpos de fructificación en el comienzo de la reproducción. Y son estos cuerpos o frutos el objetivo final de todo cultivo de hongos.

### **La cáscara de la semilla del girasol**

Una porción importante de la energía invertida en la producción de las semillas de una planta está dirigida a la producción de su cobertura o “cáscara”. Ésta es muy estable en la naturaleza ya que su función es proteger la semilla de la humedad, proveerle aislamiento térmico y defensa contra patógenos.

La cobertura o cáscara de la semilla de girasol (CSG) es un residuo abundante, producto de la industria del aceite comestible. La CSG no se usa en nutrición humana. A pesar de que su composición en sustancias orgánicas y minerales podría proporcionar una fuente para propósitos nutritivos, la presencia de un alto contenido de lignina hace que esta cáscara no pueda comercializarse como un suplemento dietético para nutrición animal u otros usos de valor. Entonces, disponemos de un producto residual abundante, de escaso valor económico y cuya disposición normalmente implica la quema o entierro en suelos lo que supone un problema de contaminación ambiental.

Durante el procedimiento de extracción del aceite la semilla del girasol se transforma en aceite y harina. La cáscara es un subproducto del proceso y constituye aproximadamente el 18-20% de las semillas procesadas. Los macronutrientes orgánicos principales de la CSG son lípidos, hidratos de carbono y proteínas. Su contenido en celulosa y hemicelulosa es muy alto y la lignina alcanza el 20-25% del peso total de la cáscara (Dorrel y Vick, 1997). Los azúcares reductores también son una parte importante llegando al 25% mientras que la proteína y los lípidos constituyen el 4% y 5%, respectivamente, con el 3% de los lípidos como ceras (Cancalon, 1971). Esta composición química convierte a la CSG en un material apropiado para el crecimiento de microorganismos. Sin embargo, el alto contenido en lignina limita la posibilidad de una rápida biodegradación. Y aquí juegan un rol importante los hongos basidiomicetos de la “pudrición blanca” que son considerados los agentes primarios en la naturaleza para la degradación de la lignina (Buswell y Oider, 1987)

### **¿Podría utilizarse la cáscara de girasol para el cultivo de los hongos ostra?**

La composición de la cáscara de girasol (4% proteína, 5% lípidos y 50% hidratos de carbono) resulta tan apropiada como la de otros sustratos normalmente usados para el cultivo de estos hongos: pajas del cereal, hojas de té, residuos de algodón y de maíz, cuyas composiciones oscilan en 2-5 % de proteínas, 0.4-2.2 % de lípidos y 32-37 % de hidratos de carbono. Las especies de hongos *Pleurotus* poseen un sistema de enzimas extracelulares y una estrategia vía radicales libres que los hacen capaces de degradar los altos contenidos de material lignocelulósico presentes en la CSG o en cualquier otro sustrato.

En la primera etapa de nuestra investigación, estudiamos si la CSG contenía compuestos solubles en agua que pudieran afectar el crecimiento del micelio de este hongo, y encontramos que el agregado de un extracto acuoso de la CSG al medio de cultivo no lo afectaba negativamente. Al contrario, cuando el micelio se cultivaba previamente en un medio que contenía el extracto acuoso de la cáscara, su crecimiento aumentaba significativamente. Estos resultados demostraron que bajo condiciones de cultivo adecuadas, la CSG podía utilizarse para el crecimiento micelial. Este fenómeno de estimulación del mismo en respuesta a la presencia de algunas sustancias provenientes del sustrato en el medio de agar podría proporcionar una

herramienta útil para obtener una adaptación ventajosa del hongo ante un sustrato en particular (Chang, 1978).

Para el cultivo de *P. ostreatus*, es común enriquecer los sustratos y el suplemento más utilizado para ello es el salvado de cereal, una sustancia rica en proteína que se conoce estimula el crecimiento del micelio y el rendimiento del hongo (Kinugawa et al., 1994). Pero con la CSG como sustrato, el crecimiento de *P. ostreatus*, en términos de colonización de micelio, respondía pobremente a este aditivo. El agregado de mayores porcentajes de salvado de trigo al sustrato final no influía en la proporción de colonización. En esta etapa de las experiencias, los resultados sugirieron que la cáscara de semilla de girasol sin suplementar podía considerarse como un sustrato nutritivo completo para ser colonizado por *P. ostreatus* (Darjania et al., 1997).

### **El tamaño de la cáscara**

Ensayamos diferentes tamaños de cáscara para determinar si el crecimiento del micelio era afectado por este parámetro. No se encontraron diferencias significativas con los tres tamaños utilizados - 7, 10 y 12 mm en promedio - siendo el mayor tamaño el de la cáscara según sale de la fábrica de aceite. La colonización del sustrato fue completa en todas las bolsas después de 18 días de la siembra del inóculo. Sin embargo, se observaron marcadas diferencias en la fructificación y el rendimiento: este hongo creció mejor en el sustrato compuesto por el mayor tamaño de cáscara, dando lugar a aproximadamente el 65% de eficiencia biológica (EB: Kg hongo fresco / Kg sustrato seco x 100) en la primera cosecha, y representando el 85% del total acumulado en 3 cosechas. Concluimos que el tamaño de la cáscara no afectaba la proporción de colonización de este hongo, por lo cual la molienda adicional de la misma - que implica un costo extra - era innecesario (Darjania et al., 1997).

### **¿Constituye la cáscara de la semilla de girasol un sustrato adecuado?**

Los primeros acercamientos para introducir este nuevo sustrato indicaron que la CSG - tal como sale de las fábricas de aceite y sin el agregado de suplementos nutritivos - podía utilizarse como un sustrato adecuado para el cultivo de los hongos ostra. La eficiencia biológica para la primera cosecha estaba dentro del rango aceptable comercialmente y se obtenía un aumento de un 15% de la misma en la segunda y tercer cosechas. Así, una prolongación del tiempo de cosecha no producía un aumento notable en la EB, y sólo se lograba una baja del rendimiento en el ciclo de producción. Por consiguiente, para este tipo de sustrato de muy bajo costo no resulta económicamente rentable mantener el cultivo de *Pleurotus ostreatus* más allá de la primer cosecha, principalmente debido al alto costo de la energía necesaria para mantener las condiciones ambientales aptas para este cultivo.

### **Resumiendo:**

- 1) La cáscara de girasol puede utilizarse como sustrato para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*, usando una fórmula simple que contiene 37,5 % CSG, 2 % SO<sub>4</sub>Ca, 0.5% CO<sub>3</sub>Ca y 60% H<sub>2</sub>O, pH 6.
- 2) Bajo las condiciones aquí descritas para el crecimiento del micelio, no es necesario el agregado de salvado del trigo.
- 3) El tamaño de cáscara de semilla de girasol tal como sale luego del proceso de extracción de aceite comestible produce la máxima EB en fructificación, comparado con los tamaños menores, luego de moler la cáscara.
- 4) La primera cosecha produce un 85% del total de la EB acumulada en tres cosechas.

### **Un protocolo simple para la producción *Pleurotus ostreatus* en un sustrato a base de cáscara de semilla de girasol**

**Preparación y decontaminación del sustrato.** Hemos desarrollado una técnica eficiente y económica, utilizando una hormigonera y un mechero, la cual que describiremos en detalle en un próximo artículo. En resumen, para una masa de 36 Kg de sustrato, los componentes (37,5 % CSG, 2 % SO<sub>4</sub>Ca, 0,5 % CO<sub>3</sub>Ca y 60% agua) se introducen en el tambor de la hormigonera y se inicia el proceso de decontaminación, siempre con el mechero de gas encendido y el tambor en posición estacionaria, durante los primeros 15 min. Se suministra el calentamiento durante 2,5 h con el tambor rotando durante 15 min y en posición estacionaria durante 15 min, en forma alternada.

**Inoculación y corrida del micelio.** Luego de la decontaminación, se permite que la temperatura del sustrato disminuya a 35-40 °C con el tambor rotando durante 2 h. Entonces se agrega el blanco de hongos (\*) al sustrato en una proporción de 5-8 % (p/p), y manteniendo la boca del tambor cubierta, se continúa la rotación durante 15-20 min de manera de lograr una mezcla homogénea del sustrato inoculado. Cuidadosamente, y usando guantes de latex desinfectados, el operador llena bolsas de plástico de 25-30 cm de diámetro con 4 a 10 Kg de sustrato. Estas bolsas se golpean repetidamente sobre el piso para comprimir su contenido hasta una densidad de 0,5 kg L<sup>-1</sup> y luego se cierran muy bien.

Para asegurar un correcto intercambio gaseoso y adecuadas concentraciones de O<sub>2</sub> y de C O<sub>2</sub>, las bolsas se perforan asépticamente en toda su superficie utilizando un rodillo con puntas (nosotros usamos un dispositivo *ad hoc* hecho con alfileres que produce aproximadamente 7000 micro-agujeros por metro cuadrado, separados 1,2 cm unos de otros).

Las bolsas se colocan a 24 ± 1 °C, y después de 15-18 días el sustrato está completamente colonizado por el micelio. Durante esta etapa, las bolsas se observan diariamente para detectar una posible contaminación.

(\*) Presentaremos el procedimiento para la producción de blanco de hongos (inóculo o “semilla”) en un próximo número de AgroUNS.

**Fructificación.** Una vez que el sustrato está completamente colonizado con el micelio, las bolsas (también llamadas “bloques o troncos sintéticos”) se transfieren a un cuarto de fructificación. La bolsa plástica que cubre el sustrato colonizado se perfora uniformemente, generalmente utilizando un dispositivo fabricado con puntas de flecha (Stamet, 1993) de manera de exponer una superficie de fructificación de aproximadamente el 1% de la superficie total de la bolsa a las siguientes condiciones ambientales: 20 ± 1 °C, 80-90 % RH, y 12 h de fotoperíodo (1500-2000 lux).

En esta etapa también se hacen observaciones para detectar posible contaminación. La aparición de los primordios y el crecimiento subsiguiente de los cuerpos fructíferos para la primer cosecha ocurre a los 15-20 días. Una segunda cosecha se obtiene 10-15 días después de la primera, y normalmente para esta segunda fructificación se deben realizar nuevas perforaciones en la superficie de las bolsas.

### Otros hongos

Este sustrato a base de CSG también es adecuado para cultivar otros hongos. La fórmula basal (37,5 % CSG, 2 % SO<sub>4</sub>Ca, 0,5 % CO<sub>3</sub>Ca y 60% agua) produjo un rendimiento mayor de shiitake (*Lentinula edodes*) en un ciclo más corto de producción que el informado para otros sustratos: 2 Kg de hongo / 100 Kg sustrato seco por día durante un ciclo de producción de 55 días, con una eficiencia biológica acumulada de 108% (Curvetto *et al.*, 2002). También se obtuvieron buenos resultados con *Ganoderma lucidum* en sustratos a base de CSG complementado con 2,5 o 5,0% de salvado del trigo o 5,0% de malta, con una productividad similar o aun más alta que la informada en la literatura (González Matute *et al.*, 2002).

En la actualidad, estamos desarrollando protocolos para usar CSG para la producción de otros hongos de interés comercial, entre ellos *Trametes versicolor*, *Hericiium erinaceus*, *Stropharia rugoso-annulata*, *Coprinus comatus*, *Flammulina velutipes* y *Agaricus bisporus* marrón (Portobello).

## Agradecimientos

El autor agradece el financiamiento otorgado por CONICET y la UNS y el apoyo brindado por las empresas Cargill y Virgilio manera (Bahía Blanca).

## Referencias

- Buswell, J.A., Oider O. 1987. Lignin biodegradation. *Crit Rev Biotechnol* 6, 1-60.
- Cancelon, P. 1971. Chemical composition of sunflower seed hulls. *J Amer Oil Chem Soc* 48, 629-632.
- Chang S.T. 1978. *The biology and cultivation of edible mushrooms*. Academic Press, New York.
- Curvetto, N.R., 1999. Cáscara de girasol como ingrediente energético principal de un sustrato para el cultivo de hongos comestibles *Pleurotus*. *Boletín de Marcas y Patentes*, 29-09-1999, p.48. Instituto Nacional de la Propiedad Industrial (INPI)
- Curvetto, N.R.; Figlas, D., Devalis, R.J., Delmastro, S.E. 2002. Sunflower seed hulls as substrate for the cultivation of shiitake (*Lentinula edodes*) mushrooms. *HortTechnology* 12 (4), 652-655.
- Curvetto, N.R., R. Gonzalez Matute, D. Figlas and S. Delmastro. Cultivation of oyster mushrooms on sunflower seed hull substrate. 2004. Pp. 101-106. A low cost technological proposal: from mixing and spawning to bagging. Pp. 153-154. En: *Mushroom Growers' Handbook 1: Oyster Mushroom Cultivation*, MushWorld, Corea.
- Dorrel, D.G., Vick, B.A. 1997. Properties and process of oilseed sunflower. In: A.A. Schneiter (ed.). *Sunflower biotechnology and production*. *Agron. Monogr.* 35: 709-745.
- Darjania, L., Curvetto, N.J., Schapiro, M., Figlas, D., Curvetto, D. 1997. Sunflower seed hulls as a substrate for cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mushroom News* 45, 6-10.
- González Matute, R., Figlas, D., Devalis, R.J., Delmastro, S.E., Curvetto, N.J. 2002. Sunflower Seed Hulls as a Main Nutrient Source for Cultivating *Ganoderma lucidum*. *Micologia Aplicada International* 14 (2), 19-24.
- Kinugawa, K., Phusawang, W., Chinbenjaphol, S., Fukada, S., Tanesaka, E., Okada, M., Tsutsui, H. 1994. Progress Report (1991-1993) of joint research program of Kinki and Chiang Mai Universities on the promotion of mushroom research. *Mem Fac Agr Kinki Univ* 27, 93-113.
- Stamet, P. 1993. *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Barkeley, CA: Ten Speed Press Ltd. p. 352-369.

## **Leyendas fotos**

**Figura 1:** Semilla de girasol y su cáscara

**Figura 2:** Perforación de las bolsas para un adecuado intercambio gaseoso durante la corrida del micelio del hongo

**Figura 3:** Colonización del sustrato a los 3, 5 y 14 días después de la inoculación

**Figura 4:** Dispositivo armado con puntas de flecha para exponer la superficie del sustrato previo a la fructificación

**Figura 5:** Hongos ostra cultivados en “troncos sintéticos” a base de cáscara de girasol



**Figura 1:** Semilla de girasol y su cáscara



**Figura 2:** Perforación de las bolsas para un adecuado intercambio gaseoso durante la corrida del micelio del hongo



**Figura 3:** Colonización del sustrato a los 3, 5 y 14 días después de la inoculación



**Figura 4:** Dispositivo armado con puntas de flecha para exponer la superficie del sustrato previo a la fructificación



**Figura 5:** Hongos ostra cultivados en “troncos sintéticos” a base de cáscara de girasol