



XVI CONGRESO CYTAL®

Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Certificamos que

**María Belén Buglione, Marcela Viviana Filippi, Daniel Alfredo Martínez, Marta
Susana Agüero, Gustavo Rodríguez**

ha participado en calidad de

***AUTOR DEL TRABAJO: "CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ORUJO DE PERA SOMETIDO A
BIOTRANSFORMACIÓN POR *Pleurotus ostreatus*"***

XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos | CYTAL 2017

7º Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías

Vº Simposio Latinoamericano sobre Higiene y Calidad de Alimentos

3º Simposio de Innovación en Industrias Alimentarias.

18 – 20 de Septiembre | Sheraton Hotel | Mar del Plata

Dra. Paula Salas
Vicepresidente CYTAL 2017
Presidente AATA Central

Ing. Qca. María Isabel Yeannes
Presidente CYTAL 2017
Presidente AATA Filial Mar del Plata

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ORUJO DE PERA SOMETIDO A BIOTRANSFORMACIÓN POR *Pleurotus ostreatus*

Buglione, M. B.¹; Filippi, M. V.²; Martínez, D. A.¹; Agüero, M.S.¹ Rodríguez, G.³

¹Escuela de Veterinaria y Producción Agroindustrial. UNRN, ²Escuela de Producción, Tecnología y Medio Ambiente. UNRN, ³Laboratorio de Hongos Comestibles y Medicinales. FACA-UNCo. e-mail: mbuglione@unrn.edu.ar

El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios en la composición química de residuos (orujo) de las industrias procesadoras de peras de la región del Valle Medio de Río Negro durante la etapa de crecimiento vegetativo de *Pleurotus ostreatus*.

Se analizó la composición química del orujo de pera luego de permitir el desarrollo micelial de dos cepas de *P. ostreatus* (Pl-P y Pl-J) en cajas de Petri, en oscuridad a 28°C durante 2 meses. Se determinó el % de materia seca como índice del % de Bioconversión, contenido de materia orgánica por incineración en mufla, sustancias nitrogenadas por Kjeldahl, fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y lignina en detergente ácido (LDA) por el método de Van Soest y carbohidratos no estructurales con reactivo antrona-ácido sulfúrico.

Si bien el ensayo se prolongó durante 60 días, las cepas de *Pleurotus* estudiadas lograron colonizar en forma completa las cajas de Petri al cabo de 12 días.

Los resultados obtenidos evidenciaron una disminución de la materia seca inicial obteniéndose un 30% de Bioconversión promedio para las cepas analizadas. Estos resultados muestran que el proceso de bioconversión por hongos de pudrición blanca como *P. ostreatus* constituye una metodología alternativa para reducir el impacto ambiental generado por la acumulación de estos residuos agroindustriales.

La caracterización química del orujo de pera biodegradado evidenció una considerable disminución respecto al orujo sin biodegradar en los contenidos netos de materia seca ($16,14 \pm 1,41$ g vs $11,28 \pm 1,03$ g), materia orgánica ($15,79 \pm 1,38$ g vs. $10,93 \pm 0,94$ g) y de carbohidratos no estructurales ($0,71 \pm 0,06$ g vs. $0,31 \pm 0,03$ g), no evidenciándose diferencias asociadas a las cepas estudiadas. Por su parte, los valores correspondientes al contenido neto de sustancias nitrogenadas y fibras (FDN, FDA y LDA) si bien fueron menores con respecto al orujo sin biodegradar, las diferencias fueron menos pronunciadas. Cabe destacar que la expresión de los resultados de la caracterización química en base a porcentaje de materia seca muestra variaciones menos apreciables, dada la marcada disminución de este valor durante la bioconversión.

Palabras claves: *Pleurotus ostreatus*, bioconversión, orujo de pera, composición química.

1. Introducción

Argentina es líder en producción de jugo concentrado de pera y manzana en el hemisferio sur, que se utiliza en gran medida para edulcorar gaseosas. En la región del Alto Valle y Valle Medio de la provincia de Río Negro existe una red de agroindustrias elaboradoras de jugos concentrados, sidra, deshidratados, conservas y licores. Según datos de las industrias, aproximadamente el 20% de la fruta industrializada queda como

residuo sólido—orujo o bagazo— constituido por cáscaras, restos de pulpa, semillas, pedúnculos. Actualmente estos sólidos se disponen inadecuadamente a cielo abierto o se utilizan para enmienda de suelos y en menor medida para alimentación animal. Los principales efectos de la disposición inadecuada incluyen la degradación de materia orgánica con producción de gases de efecto invernadero como CH₄ y CO₂, presencia de contaminantes en el suelo, contaminación de fuentes de agua superficial y subterránea que afectan flora y fauna circundante a los sitios de disposición.

En algunos casos, se realizan tratamientos enzimáticos (de elevado costo) de los residuos (Howard *et al.* 2003) o se elaboran compost por fermentación controlada para reutilizarlos como enmienda orgánica (Arrieché y Mora 2005, Matheus 2004).

Considerando el elevado contenido de fuentes de carbono lignocelulósicas que presentan los desechos agroindustriales, resulta de gran interés analizar las posibilidades de uso de estos residuos como sustrato para el cultivo y producción de hongos comestibles, especialmente hongos de pudrición blanca, debido a que durante su crecimiento y desarrollo degradan celulosa, hemicelulosa y lignina (Chang y Miles 2004, Jaramillo Mejía y Albertó 2012, Nyochembeng *et al.* 2008).

Dentro de este grupo de hongos se encuentra *Pleurotus ostreatus*, especie comestible que se cultiva a escala comercial, conocida con el nombre de “gírgola” u hongo ostra (Chang y Miles 2004, Heredia-Solís *et al.* 2016, Sánchez 2010).

Estudios realizados con hongos del género *Pleurotus* empleando la biomasa vegetal (por ej. tallos, hojas, raíces, vainas, paja, etc) como sustrato para su cultivo, indican que el crecimiento del hongo mejora la composición química de las pajas aumentando el contenido de materia orgánica y modifica la estructura de la fibra, con lo que se incrementa el contenido de carbohidratos solubles (Montañez-Valdez *et al.* 2008, Pandey 2003, Pandey *et al.* 2000, Sánchez *et al.* 2002).

Sin embargo, el empleo de residuos provenientes de la actividad de industrias relacionadas con la extracción de jugos de frutas ha sido menos investigado. Nicolini *et al.* (1987) caracterizaron químicamente el proceso de biodegradación en fase sólida de residuos provenientes de la extracción de jugo de naranja y de la producción de vinos por *Agrocybe aegerita* y *P. ostreatus* verificando un incremento en el valor alimenticio del residuo biodegradado y la factibilidad de su utilización en alimentación animal.

Los resultados obtenidos en esas investigaciones indican efectos variables, dependiendo de la composición del sustrato, duración del tiempo de cultivo y de la cepa

inoculada (Ardón *et al.* 1996, Chang y Miles 2004, Heredia-Solís *et al.* 2016, Sánchez 2009, 2010).

Los autores de este trabajo (Martínez *et al.* 2015) hemos evaluado la capacidad de tres cepas de *Pleurotus ostreatus* y una de *Agrocybe aegerita* para colonizar orujo de pera generado por industrias jugueras de Río Negro, encontrando que *P. ostreatus* presentó un mejor desarrollo sobre orujo de pera que *Agrocybe*.

El objetivo fue evaluar los cambios en la composición química de del orujo de pera durante el desarrollo micelial de las cepas de *P. ostreatus* que presentaron mejor comportamiento al analizar las curvas de crecimiento micelial (Martínez *et al.* 2015).

2. Materiales y Métodos

2.1 Material fúngico

Se emplearon dos cepas de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, depositadas en el Cepario FACA-UNCo, Laboratorio de Hongos Comestibles y Medicinales, cuyas procedencias se describen a continuación:

PI-J: Misiones, Argentina. Colector: Rodríguez G. FACA PI-J 07.

PI-P: Paraje Abra Ancha, Neuquén, Argentina. Colector: Rodríguez G. FACA PI-P 12.

Las cepas fueron conservadas en Agar extracto de malta (10 % p/v), a 4°C en oscuridad. Las cepas se multiplicaron en medio Agar papa glucosado (APG), que se preparó con una infusión de papa, D (+) glucosa y agar-agar (Merck 2005). Para ello se colocaron 20 mL del medio de cultivo en cajas de Petri de 100 mm de diámetro, se inocularon con las cepas mencionadas y se incubaron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ durante dos semanas con el objeto de obtener micelio activo para los ensayos de desarrollo micelial.

2.2 Sustrato

Como sustratos para caracterizar el proceso de biodegradación durante la etapa de desarrollo micelial de *P. ostreatus* se empleó orujo de pera (*Pyrus communis* L.) v. Williams Bon Chetrien provenientes de industrias jugueras. Los bagazos húmedos generados por el procesamiento de peras en la Empresa Jugos S.A., ubicada en la zona del Alto Valle de la provincia de Río Negro se secaron al sol sobre mallas rectangulares y una vez secos se sometieron a un proceso de trituración con una molidora comercial de granos, hasta obtener un tamaño de partícula entre 0,1 a 0,5 mm de diámetro.

2.3 Ensayos de crecimiento en caja de Petri

El orujo de pera seco y molido fue hidratado al 70 % (p/p) con agua destilada. Posteriormente, se dispusieron en cajas de Petri (aprox. 30 g/caja) y se esterilizaron en

autoclave durante 30 minutos a 1 atm de presión. Las cajas estériles se conservaron selladas en heladera, a 4°C hasta ser inoculadas.

Las cajas con orujo hidratado y estéril se inocularon con discos de micelio activo desarrollado sobre medio APG, bajo campana, considerando materiales y ambientes libres de gérmenes. La incubación se realizó en estufa a 28°C, en oscuridad, durante 8 semanas. Las cajas se almacenaron a -20°C hasta realizar la caracterización química.

2.3. Análisis fisicoquímico de los orujos

Se analizó la composición química del orujo de pera, previo a la inoculación con las cepas Pl-P y Pl-J (inicial) y del orujo biodegradado (final), determinando el pH sobre el orujo hidratado. El orujo de cada caja de Petri se llevó a peso seco en estufa, a 65°C y se determinó el contenido de nitrógeno total (N) por el método de Kjeldahl, cenizas totales (Cen) en mufla, fibra detergente neutro y ácido (FDN y FDA) y lignina en detergente ácido (LDA) y digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) de acuerdo a Goering y Van Soest (1970). El contenido de materia orgánica (MO) se obtuvo por diferencia entre materia seca (MS) y Cen (AOAC 2000). Los carbohidratos no estructurales (CHNE) se determinaron por el método Antrona (Koehler 1952).

2.4 Diseño experimental y análisis estadístico

Los ensayos para caracterizar el proceso de biodegradación durante el desarrollo micelial de Pl-P y Pl-J se realizaron con 5 repeticiones para cada cepa. Los resultados se evaluaron mediante un ANOVA por medio del test de Tukey ($p < 0,05$). Previamente se verificó la distribución normal de los datos a través de la prueba de Shapiro-Wilks (Di Rienzo *et al.* 2016).

3. Resultados y Discusión

3.1. Desarrollo de *P. ostreatus* sobre orujo de pera

Inicialmente los autores de este trabajo caracterizaron el crecimiento micelial de las cepas de *Pleurotus ostreatus* (Pl-AA, Pl-P, Pl-J) y *Agrocybe aegerita* (Ag-I) sobre agar extracto de malta (AEM) como medio testigo ya que sus características nutritivas favorecen el crecimiento de la mayoría de hongos. Posteriormente, se evaluó la capacidad de estas cepas para colonizar residuos de las industrias ligadas a la extracción de jugos de pera (Martínez *et al.* 2015).

Las tres cepas de *Pleurotus* estudiadas mostraron capacidad de desarrollar sobre orujo de pera, siendo Pl-J la que evidenció mejor desarrollo ya que logró colonizar la caja completa luego de 12 días, a 28°C (Fig.1).

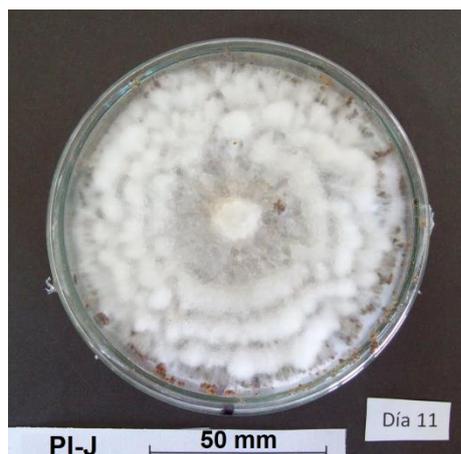


Figura 1: Crecimiento radial del micelio de la cepa PI-J sobre orujo de pera.

3.3. Evaluación del proceso de biodegradación del orujo de pera

Luego de permitir el desarrollo micelial en cajas de Petri de *P. ostreatus* sobre orujo de pera durante 2 meses a 28 °C se evidenció una disminución de la materia seca inicial, obteniéndose un 30% de Bioconversión promedio para PI-P y PI-J (Tabla 1).

Esta disminución indicaría que *P. ostreatus* es capaz de utilizar los componentes del orujo como nutrientes y degradarlos hasta CO₂, lo cual explicaría la disminución no sólo de MS, sino también de materia orgánica, fibras y carbohidratos solubles.

Estos resultados serían consecuencia de la capacidad de estos organismos para producir exoenzimas que degradan eficientemente la celulosa, hemicelulosa y lignina en compuestos de bajo peso molecular que pueden ser asimilados por estos organismos. Existen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: hidrolasas que degradan la celulosa (celulasas) y la hemicelulosa (hemicelulasas) y oxidoreductasas que degradan la lignina (lacasas, peroxidasas y oxidasas) hasta CO₂ y agua (Martínez *et al.* 2005, Pérez *et al.* 2002, Sánchez 2009, ten Have y Teunissen 2001).

Estos resultados respaldan uno de los aspectos planteados en la hipótesis de formulación de esta línea de investigación, en lo referente a que el proceso de bioconversión por hongos de pudrición blanca constituye una metodología alternativa para reducir el impacto ambiental generado por la acumulación de los residuos.

En cuanto a los carbohidratos no estructurales es importante considerar que el método Antrona (Koehler 1952) determina el nivel de azúcares, almidón y fructanos que desde el punto de vista nutricional en rumiantes, poseen un potencial de fermentación rápida y total en el rumen.

Los CHNE fueron los componentes que disminuyeron en mayor medida, lo cual se atribuye a que *P. ostreatus* utiliza inicialmente estos hidratos de carbono no

estructurales del orujo, aproximadamente 60% en promedio para ambas cepas, y posteriormente las fibras, alrededor del 20% para FDN y FDA y un 30% para LDA.

Tabla 1: Composición química del orujo de pera (valores medios y desviación estándar para cinco repeticiones), previa a la inoculación (inicial) y luego de 8 semanas de desarrollo micelial (final) de PI-J y PI-P. Valores con letras distintas para una misma fila y cepa indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

	PI-J inicial	PI-J final	% disminución	PI-P inicial	PI-P final	% disminución
MS, g	15,9 ^a ± 2,5	10,6 ^b ± 1,8	33,2 ± 3,9	16,1 ^a ± 1,4	11,3 ^b ± 1,0	30,1 ± 3,1
MO, g	15,6 ^a ± 2,4	10,4 ^b ± 1,8	33,4 ± 3,9	15,8 ^a ± 1,4	10,9 ^b ± 0,9	30,7 ± 3,1
CHNE, g	0,70 ^a ± 0,11	0,32 ^b ± 0,04	57,9 ± 4,8	0,71 ^a ± 0,06	0,31 ^b ± 0,02	56,5 ± 5,2
FDN, g	11,5 ^a ± 1,8	8,6 ^b ± 1,4	23,6 ± 5,2	11,6 ^a ± 1,0	9,0 ^b ± 0,8	20,5 ± 3,1
FDA, g	8,4 ^a ± 1,3	6,4 ^b ± 1,1	23,6 ± 5,2	8,5 ^a ± 0,7	6,8 ^b ± 0,6	20,5 ± 3,1
LDA, g	3,52 ^a ± 0,5	2,5 ^b ± 0,6	28,8 ± 10,3	3,6 ^a ± 0,3	2,6 ^b ± 0,3	26,8 ± 5,8
PB, g	0,7 ^a ± 0,1	0,5 ^b ± 0,1	24,1 ± 5,7	0,7 ^a ± 0,1	0,5 ^b ± 0,1	26,8 ± 3,0

De acuerdo a lo expresado por diversos autores (Martínez *et al.* 2005, Sánchez 2009, ten Have y Teunissen 2001), los hongos de pudrición blanca, entre los que se encuentra *P. ostreatus*, son los únicos organismos conocidos que pueden descomponer la lignina en dióxido de carbono y agua. Sin embargo, la lignina no puede degradarse como única fuente de esqueletos carbonados y energía. Presumiblemente, la actividad ligninolítica facilitaría el acceso a la celulosa y hemicelulosa que constituyen su fuente real de carbono y de energía.

El mayor grado de utilización de CHNE en relación a la degradación de los distintos tipos de fibras podría estar relacionado con los mecanismos de regulación de las enzimas que metabolizan estos compuestos ya que las enzimas lignocelulolíticas son inducibles y se expresan cuando disminuyen los carbohidratos solubles (Elisashvili *et al.* 2002, Rouches *et al.* 2016).

Cabe destacar que la expresión de los resultados de la caracterización química en base a porcentaje de materia seca muestra variaciones menos apreciables, dada la notable disminución de materia seca de cada repetición.

La magnitud de la desaparición *in vitro* de las fracciones FDN y FDA en base materia seca es un indicador de la digestibilidad de los componentes de la pared celular de los alimentos. La determinación del porcentaje de digestibilidad *in vitro* empleando líquido ruminal mostró que durante la etapa de desarrollo micelial se produce una disminución en la digestibilidad desde 38,8% en el orujo inicial a 24,5% en el

biodegradado. Estos resultados se relacionan con la escasa variación del % de fibras en base MS (datos no mostrados).

Por otro lado, el pH se mantuvo en el orden de 4,4 a 4,8 sin cambios significativos luego de la biodegradación de los sustratos.

4. Conclusiones

La bioconversión de residuos sólidos provenientes del procesamiento de pera, es posible utilizando hongos del género *Pleurotus*. Esto es valorable y podría impactar sobre la actividad industrial ya que podría desarrollarse como una tecnología emergente “end-of-pipe” (al final del proceso), que incluye tecnologías y aplicaciones tendientes a reducir el impacto negativo de la actividad industrial sobre el medioambiente.

5. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por Consejo de Investigación, Desarrollo y Transferencia de Tecnología, UNRN, Res. 290/2015, PI 40-A-411 y por Secretaría de Investigación, UNCo, Res. 750/11, PI 04/A107. Los autores agradecen a la empresa JUGOS S.A. por la provisión del orujo empleado en los ensayos.

6. Referencias

- AOAC. 2000. Official methods of analysis Association of Official Analytical Chemists 17th Ed. Washington, D.C.
- Ardón, O.; Kerem, Z.; Hadar, Y. 1996. Enhancement of laccase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *J. Biotechnol.* 51: 201-207.
- Arrieche, I. y Mora, O. 2005. Efecto de la aplicación de residuos orgánicos sobre el cultivo de maíz en suelos degradados del estado de Yaraguy, Venezuela. *Bioagro* 17(3): 155-159.
- Chang S. T. y Miles P. G. 2004. *Mushrooms. Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact.* 2nd Ed. CRC PRESS. 451 pp.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., González L., Tablada M. y Robledo C. W. 2016. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Elisashvili V., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Khardziani T. y Bakradze M. 2001. Physiological regulation of Basidiomycetes lignocellulolytic enzyme activity. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 4: 159-166.
- Heredia-Solís A., Esparza-Ibarra E. L., Romero-Bautista L., Cabral-Arellano F. J., Echavarría-Chairez F. G. y Bañuelos-Valenzuela R. 2016. Evaluación de mezclas para sustrato y producción de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kumm. *Agroproductividad* 9(6) 67-72.
- Goering, H.R. and Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analysis: apparatus, reagents, procedures and some applications. *Agric. Handb.* 379. Agric. Res. Serv. USA, Washington D.C
- Howard R. L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E. L. y Howard S. 2003. Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversión and enzyme production (Review). *African Journal of Biotechnology* 2 (12): 602-619.

- Jaramillo Mejía S. y Albertó E. 2012. El despunte de caña de azúcar, sustrato altamente eficiente para la producción de *Pleurotus ostreatus*. En Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica: investigación y desarrollo en un entorno multicultural (Sánchez J.E. y Mata G., eds.). Tapachula. Editorial El Colegio de la Frontera Sur México, pp. 155-161.
- Koehler L.H. 1952. Differentiation of carbohydrates by antrone reaction, rate and color intensity. Analytical Chemistry 24 (10): 1576-1591.
- Martínez A.T., Speranza M., Ruiz-Dueñas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M.J., Gutiérrez A. y del Río J.C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. International Microbiology 8: 195-204.
- Martínez D.A., Buglione M.B., Filippi M.V., Reynoso L., Rodríguez G.E. y Agüero M.S. 2015. Evaluación del crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* y *Agrocybe aegerita* sobre orujos de pera. Anales de Biología 37: 1-10.
- Matheus J. 2004. Evaluación agronómica del uso de compost de residuos de la industria azucarera (biofertilizante) en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). Bioagro 16 (3): 219-224.
- Merck. 2005. Microbiology Manual. Darmstadt: Merck KgaA.
- Montañez Valdez, O. D.; García Flores, E. O.; Martínez García, J. A.; Salinas Chavira, J.; Rojo Rubio, R.; J. Peralta Ortiz, J. G. 2008. Use of *Pleurotus pulmonarius* to change the nutritional quality of wheat straw. I. Effect on chemical composition. Interciencia 33 (006): 435-438.
- Nicolini L., von Hunolstein C. y Carilli A. 1987. Solid state fermentation of orange peel and grape stalks by *Pleurotus ostreatus*, *Agrocybe aegerita*, and *Armillariella mellea*. Applied Microbiology and Biotechnology 26: 95-98.
- Nyochembeng L.M., Beyl C.A. y Pacumbaba R.P. 2008. Optimizing edible fungal growth and biodegradation of inedible crop residues using various cropping methods. Bioresource Technology 99: 5645-5649.
- Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. Biochem. Engin. J. 13: 81-84.
- Pandey, A.; Selvakumar, P.; Carlos, R. S.; Poonam, N. 2000. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. J. Basic Microbiol. 40: 187-197.
- Pérez J., Muñoz-Dorado J., de la Rubia T. y Martínez J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. International Microbiology 5(2): 53-63.
- Rouches E., Zhou S., Steyer J. P. y Carrere, H. 2016. White-Rot Fungi pretreatment of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion: Impact of glucose supplementation. Process Biochemistry 51(11): 1784-1792.
- Sánchez C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. Biotechnology Advances 27: 185-194.
- Sánchez, C. 2010. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms (Mini-Review). Appl Microbiol Biot 85(5): 1321-1337.
- Sánchez, A.; Ysunza, F.; Beltrán-García, M.; Esqueda, M. 2002. Biodegradation of viticulture wastes by *Pleurotus*: A source of microbial and human food and its potential use in animal feeding. J. Agric. Food Chem. 50: 2537-2542.
- ten Have R. y Teunissen P.J.M. 2001. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. Chemical Reviews 101(11): 3397-414.