

Cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer sobre orujo de pera: Evaluación de la productividad y composición química del sustrato biodegradado

Gustavo Enrique Rodríguez¹, Daniel Alfredo Martínez², María Belén Buglione², Marcela Viviana Filippi³ & Marta Susana Agüero²

1 Laboratorio de Hongos Comestibles y Medicinales. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue. Ruta Nacional 151, km. 12,5. C.C. 85. (8303) Cinco Saltos, Río Negro, Argentina.

2 Escuela de Veterinaria y Producción Agroindustrial, Sede Alto Valle y Valle Medio, Universidad Nacional de Río Negro. Pacheco 460. (8360) Choele Choel, Río Negro, Argentina.

3 Escuela de Producción, Tecnología y Medio Ambiente. Sede Alto Valle y Valle Medio, Universidad Nacional de Río Negro. Tacuarí 669 – (8336) Villa Regina, Río Negro, Argentina.

Resumen

Correspondencia

M.S. Agüero

E-mail: maguero@unrn.edu.ar

Recibido: 17 agosto 2017

Aceptado: 2 febrero 2018

Publicado on-line: 26 febrero 2018

El objetivo de este trabajo fue evaluar la factibilidad de emplear orujo de pera como sustrato para el cultivo comercial de dos cepas de *Pleurotus ostreatus* (PI-P y PI-J) y analizar la variación de la composición química del orujo biodegradado. La cepa PI-J presentó 98,3% de Eficiencia Biológica, 35% de Rendimiento y 45 días de Período Productivo, mientras que para PI-P los valores fueron 62,3%, 21,8% y 35 días, respectivamente. La actividad metabólica de ambas cepas sobre el sustrato provocó una disminución relativa del contenido de materia seca y materia orgánica del 20 al 30% y de un 60% para los carbohidratos solubles ($p < 0,05$). Al finalizar el Período Productivo, las fibras (FDN, FDA y LDA) disminuyeron 10 a 20% mientras que el contenido de proteína bruta no se modificó significativamente.

Palabras clave: Hongos comestibles, Biodegradación, Residuos lignocelulósicos, Desechos agroindustriales.

Abstract

Cultivation of Pleurotus ostreatus (Jacq. : Fr.) Kummer on pear pomace: Evaluation of productivity and chemical composition of the biodegraded substrate

The aim of this work was to evaluate the feasibility of using pear pomace as a substrate for the commercial cultivation of two strains of *Pleurotus ostreatus* (PI-P and PI-J) and to analyze the variation of the chemical composition of the biodegraded pomace. The PI-J strain presented 98,3% of Biological Efficiency, 35% of Yield and 45 days of Productive Period, while for PI-P the values were 62,3%, 21,8% and 35 days respectively. The metabolic activity of both strains on the substrate led to a relative decrease in dry matter and organic matter content of 20 to 30%, and 60% for soluble carbohydrates ($p < 0,05$). At the end of the Productive Period, the fibers (FDN, FDA and LDA) decreased 10 to 20% while the crude protein content was not significantly modified.

Key words: Edible fungi, Biodegradation, Lignocellulosic wastes, Agroindustrial wastes

Introducción

La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas y representa cerca del 40 % de la de la biomasa vegetal producida por la fotosíntesis. Estos materiales están compuestos básicamente por tres tipos de polímeros (celulosa, hemicelulosa y lignina) y presentan una organización estructural compleja que constituye un factor limitante para su biodegradación (Commanday & Macy 1985, Pérez *et al.* 2002, Sánchez 2009).

A excepción de la biomasa que se utiliza como subproducto en la agricultura o la silvicultura, la mayor parte se considera residuo que carece de valor económico en el contexto en que se producen y su acumulación suele provocar problemas ambientales (Ravera *et al.* 2008, Sánchez 2009, Al-Momany & Ananbeh 2011, Laos 2013). La biodegradación de los residuos de naturaleza lignocelulósica constituye una de las herramientas biotecnológicas con la que es factible disminuir la contaminación ambiental.

Muchos microorganismos presentan un sistema enzimático que les permite degradar y utilizar la celulosa y hemicelulosa como fuente de carbono y energía para su crecimiento y multiplicación. Sin embargo, la lignina, por su naturaleza química, sólo puede ser degradada por un número limitado de bacterias y hongos. En particular, los hongos de pudrición blanca, la mayoría de los cuales pertenecen al grupo de Basidiomycetes, se caracterizan por su capacidad de 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. Presumiblemente, el objetivo metabólico de la degradación de lignina por este grupo de hongos sería acceder a la celulosa y hemicelulosa, las cuales representan su fuente de carbono y energía (ten Have & Teunissen 2001, Pérez *et al.* 2002, Martínez *et al.* 2005, Sánchez 2009).

Los hongos de pudrición blanca son considerados agentes primarios de descomposición porque son capaces de utilizar los desechos agrícolas en su forma original sin que hayan sido sujetos previamente a algún proceso de degradación bioquímico o microbiológico (ten Have & Teunissen

2001, Pérez *et al.* 2002, Martínez *et al.* 2005, Sánchez 2010). Desde el punto de vista nutricional, son organismos heterótrofos que utilizan como nutrientes los compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en los diferentes sustratos. Los residuos agroindustriales utilizados para el cultivo y producción de hongos comestibles proveen las fuentes de carbono, nitrógeno, azufre y fósforo necesarias para el desarrollo adecuado de la biomasa fúngica. El carbono, que generalmente está en exceso en los sustratos lignocelulósicos, es utilizado en los esqueletos carbonados de compuestos orgánicos y para obtener energía. El nitrógeno, que suele estar presente en cantidades limitadas, es esencial para la síntesis de aminoácidos, proteínas, nucleótidos, vitaminas, etc. (Chang & Miles 2004, Rizki & Tamai 2011, Anike *et al.* 2016, Heredia-Solís *et al.* 2016).

Entre los hongos de pudrición blanca se encuentran especies comestibles que se cultivan a escala comercial. En particular, la producción de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, conocida con el nombre de “gírgola” u hongo ostra ocupa el segundo lugar de los hongos cultivados a nivel mundial, después de *Lentinula edodes* (Berk.) Sing, “shiitake”. Entre las ventajas del cultivo de *Pleurotus* spp., es factible mencionar la calidad organoléptica y propiedades nutraceuticas de los cuerpos fructíferos, además del requerimiento de tecnologías de producción relativamente sencillas (Chang & Miles 2004, Rodríguez 2007, Sánchez 2010, Ali *et al.* 2013, Deepalakshmi & Sankaran 2014, Heredia-Solís *et al.* 2016, Royse & Sánchez 2017).

Diversos autores han demostrado la capacidad de este grupo de hongos para desarrollar sobre una gran variedad de residuos lignocelulósicos mediante fermentación en fase sólida, caracterizando las etapas de crecimiento micelial y producción de carpóforos. Cabe destacar, sin embargo, que la mayoría de los trabajos estudiaron este proceso de bioconversión empleando subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales, solos o mezclados con otros sustratos, como aserrín de madera de acacia, mazorca de maíz y bagazo de caña de azúcar (Jaramillo-Mejía & Albertó 2012, Hoa *et al.* 2015), paja de trigo, residuos de algodón y cáscara de maní (Philippoussis *et al.* 2001, Ravera *et al.* 2008), orujo y residuos de tomate (Nyochembeng *et al.* 2008, Sánchez *et al.* 2008, Al-Momany & Ananbeh 2011) y de la industria cervecera (Wang *et al.* 2001) y olivarera (Pardo-

Giménez *et al.* 2008). En estos dos últimos casos el sistema de producción de *P. ostreatus* implica un tratamiento previo de fermentación bacteriana y extracción con solventes, respectivamente.

Por su parte, el empleo de residuos provenientes de la actividad de industrias relacionadas con la extracción de jugos de frutas ha sido menos investigado. Sánchez *et al.* (2002) evaluaron la biodegradación por *Pleurotus* de desechos de la vitivinicultura, encontrando que los mejores sustratos para el crecimiento del micelio y fructificación se obtenían adicionando una elevada proporción de residuos de cosecha de la vid al orujo de uva. 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* (V. Brig.) Sing y *P. ostreatus* verificando un incremento en el valor alimenticio del residuo biodegradado y la factibilidad de su utilización en alimentación animal.

En Argentina, la producción de peras y manzanas en 2015 fue de 1,8 millones de toneladas, de la cual el 78% corresponde a la provincia de Río Negro. En relación a la pera, el 72% se destina al consumo en fresco, del cual se exporta el 58% y el resto, 28% (240.000 t), se emplea en la producción de jugos concentrados y otras bebidas. El 60% (140.000 t) de la pera destinada a industria se descarta como orujos o bagazos (Laos 2013, Storti 2016).

Previamente, los autores de este trabajo evaluaron la capacidad de *P. ostreatus* y *A. aegerita* para colonizar la biomasa generada por las industrias jugueras de pera y caracterizaron las curvas de crecimiento en la etapa de desarrollo micelial. Los resultados obtenidos mostraron que las cepas de *P. ostreatus* estudiadas presentaron una mayor velocidad de colonización que la de *A. aegerita* (Martínez *et al.* 2015).

El objetivo de este trabajo fue evaluar alternativas que permitan la utilización del orujo que producen las industrias jugueras de peras como sustrato para el cultivo y producción de *P. ostreatus* y analizar la factibilidad de emplear el sustrato biodegradado en alimentación animal.

Metodología

Material fúngico

Se emplearon dos cepas de *P. ostreatus*, deposi-

tadas 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, febrero 22, 2008.
- PI-P: Paraje Abra Ancha, Neuquén, Argentina. Colector: Rodríguez G. FACA PI-P 12, febrero 23, 2003.

Las cepas fueron conservadas en Agar Extracto de Malta (AEM) a 4 °C en oscuridad. El medio de cultivo fue preparado al 10% p/v, de acuerdo a las indicaciones del fabricante (AEM BritaniaR B0100406).

Elaboración de inóculo y preparación de sustrato

El inóculo se elaboró con semillas de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) de acuerdo a la metodología descrita por Mata & Savoie (2007).

Como sustrato para el crecimiento y fructificación de *P. ostreatus* se empleó orujo de pera (*Pyrus communis* L.) var. Williams Bon Chretien, proveniente de una industria juguera ubicada en la localidad Villa Regina, provincia de Río Negro (Argentina). El orujo o bagazo, constituido por cáscara, semillas y restos de pulpa, fue secado al aire y triturado con una moladora comercial de fardos (LUSQTOFF, modelo CHP113, Industria Argentina) a un tamaño de partícula de 0,1 a 5 mm de diámetro.

Inoculación del sustrato

El orujo se hidrató al 70% por inmersión en agua por un período de una hora; se dispuso en bolsas de polipropileno de 20 x 30 cm (aproximadamente 500 g de orujo húmedo) y se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1 atm de presión durante 20 min. Al alcanzar la temperatura ambiente, y en condiciones de asepsia, el sustrato se inoculó con las cepas seleccionadas PI-P y PI-J (5% p/p de inóculo).

Cultivo y fructificación

La producción de hongos se realizó en un cuarto de cultivo equipado con aire acondicionado frío-calor (ELECTRA, potencia 2400 Watts frío/2500 Watts calor, Industria Argentina), humidificador con flotante (SPRAYtec SRL, modelo H-19, Industria Argentina), extractor de aire (OTEC, 1500 rpm, caudal de aire de 1750 m³/h, Industria Argentina), sistema de iluminación mediante tubos fluorescentes de 36 Watts luz fría, que proporcio-

nan 600 lux a 1 m del nivel del piso y sistemas de automatización para control de temperatura, humedad e iluminación.

La etapa de incubación, para ambas cepas, se realizó en el cuarto de cultivo, donde se mantuvo una temperatura de 26 ± 2 °C, en oscuridad, hasta que el micelio cubrió totalmente el sustrato. Durante esta etapa se realizaron monitoreos diarios, para verificar el estado sanitario del sustrato inoculado.

Cuando el micelio colonizó completamente el sustrato (aprox. 15 días), se retiró completamente la bolsa y se modificaron las condiciones ambientales para inducir la fructificación: iluminación por medio de tubos fluorescentes (600 lux), fotoperiodo de 12 h, temperatura 20 ± 2 °C, humedad 80-85% y ventilación para mantener el nivel de CO₂ ambiental inferior al 0,6%.

Indicadores de rendimiento y productividad

La cosecha de los hongos se realizó en su etapa madura (exposición de sus láminas y el margen del púleo totalmente extendido) y se registró el peso fresco (PF) y la fecha de inicio y finalización del cultivo.

Para evaluar la eficacia del sistema productivo se emplearon los siguientes parámetros cuantitativos (Chang & Miles 2004, Gaitán-Hernández 2005):

- Eficiencia Biológica (EB): PF de las fructificaciones/Peso Seco inicial del sustrato, expresada en porcentaje.
- Ciclo de cultivo o Período Productivo (PP): tiempo transcurrido desde la inoculación del sustrato hasta la última cosecha.
- Tasa de Producción (TP): EB/PP
- Rendimiento (R): PF de los carpóforos cosechados/PF del sustrato, expresado en porcentaje.

Composición química del orujo sin biodegradar y biodegradado

Con el objeto de caracterizar el proceso de biodegradación del orujo de pera por las cepas de *P. ostreatus* evaluadas Pl-J y se determinaron los contenidos netos de materia seca, la composición química del sustrato y la relación C/N previo a la inoculación (inicial) y posterior a la fructificación y cosecha (final).

Se tomaron muestras del sustrato previo a la inoculación con *P. ostreatus* y del biodegradado

(cuatro repeticiones/cepa) para análisis de materia seca a 65°C (MS), ceniza (Cen), proteína bruta (PB) por el método de Kjeldahl ($PB = N \times 6,25$), materia orgánica ($MO = MS - Cen$) y carbono ($C = MO/1,724$) (AOAC 2000), fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA), lignina ácido detergente (LAD) por el método secuencial de Van Soest *et al.* (1991), en un baño procesador (Ankom Technology Corp., Fairpoint, NY, USA). Los carbohidratos solubles (CHS) se determinaron por el método Antrona (Koehler 1952).

Los contenidos netos de celulosa (CEL) y hemicelulosa (HCEL) se obtuvieron como (Van Soest *et al.* 1991):

$$CEL = FDA - LAD; HCEL = FDN - FDA$$

La disminución del contenido neto de MS, MO, FDN, FDA, LDA, PB y CHS se calculó como la diferencia porcentual de los valores determinados en orujo biodegradado y sin biodegradar.

Las concentraciones porcentuales en base materia seca de celulosa (%CEL) y hemicelulosa (%HCEL) se obtuvieron como (Van Soest *et al.* 1991):

$$\%CEL = \%FDA - \%LDA; \%HCEL = \%FDN - \%FDA$$

Donde %FDN, %LDA y %FDA son las concentraciones porcentuales en base materia seca de FDN, LDA y FDA.

La digestibilidad de materia seca (% DMS) se estimó a partir de la ecuación propuesta por Goering y Van Soest (Trevisño & González 1973):

$$\%DMS = (100 - \%FDN) \times 0,98 + \%FDN \times (1,473 - 0,798 \times \log_{10} ((\%LDA / \%FDA) \times 100)) - 12,9$$

Análisis estadístico

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 empleando el programa estadístico InfoStat versión 2016 (Di Rienzo *et al.* 2016).

Resultados y Discusión

Biodegradación del orujo de pera

El análisis comparativo de la composición química del orujo al inicio y al finalizar del proceso de biodegradación por las cepas de *P. ostreatus* analizadas, mostró una disminución significativa de la materia seca, materia orgánica y de todos los componentes químicos analizados, con excepción de PB que se mantuvo prácticamente constante (Ta-

bla 1). La cepa PI-P fue más eficiente en degradar las distintas fracciones de fibras presentes en el orujo de pera, evidenciado por una disminución significativa de los valores de FDN, que corresponde a las fibras de la pared celular (lignina, celulosa, y hemicelulosa), FDA, LDA (lignina), celulosa (CEL) y hemicelulosa (HCEL) (Goering & Van Soest 1970).

Efectos semejantes fueron informados por Anike *et al.* (2016) al caracterizar el efecto de la degradación de sustratos preparados con distintas proporciones de cáscara de maní y mazorca de maíz durante la etapa de desarrollo micelial de *P. ostreatus*. Estos autores informan que los elevados niveles de lignina presentes en cáscara de maní limitan el proceso de biodegradación, el cual se ve favorecido por la inclusión de mazorca de maíz como co-sustrato. Por su parte, Ravera *et al.* (2008) caracterizaron la dinámica de desarrollo de *P. ostreatus* y su influencia sobre la degradación de lignina y la producción de setas comestibles empleando cáscara de maní como sustrato. Estos investigadores comprobaron que el hongo durante la fase de desarrollo micelial consume compuestos más simples o fáciles de degradar como hemicelulosa, oligosacáridos y proteínas incrementando el porcentaje relativo de lignina presente. Durante la etapa de fructificación, informan una disminución del porcentaje relativo de pectinas, oligosacáridos y lignina, si bien la variación de ésta es poco apreciable (32,60 % inicial vs 32,08 % post-fructificación).

Es importante destacar que en este trabajo se empleó el orujo de pera sin la adición de otros residuos o sales inorgánicas para mejorar la relación C/N. El sustrato para el cultivo de *P. ostreatus* presentó valores de 0,75% \pm 0,04% de nitrógeno y una relación C/N 76,1 \pm 4,5. Algunos autores indican que los sustratos más adecuados para el cultivo y fructificación de *Pleurotus* spp., son los que poseen un contenido de nitrógeno superior al 0,5% y una relación C/N menor a 50 (Philippoussis *et al.* 2001, Nyochembeng *et al.* 2008, Sánchez *et al.* 2008, Rizki & Tamai 2011). Sin embargo, de acuerdo a la información aportada por Poppe (2004) en su revisión, el contenido de N y la relación C/N del sustrato no es determinante de la producción de setas comestibles de *Pleurotus* spp.

El cultivo y fructificación de la cepa PI-P provocó una disminución significativa de la relación C/N, mientras que PI-J prácticamente no modificó

	PI-J inicial,g	PI-J final,g	PI-P inicial,g	PI-P final,g
MS	178 ^a \pm 14	142 ^b \pm 15	180,1 ^a \pm 1,5	128,2 ^b \pm 2,7
MO	174 ^a \pm 14	134 ^b \pm 15	176,0 ^a \pm 1,3	121,6 ^b \pm 2,4
CHS	7,46 ^a \pm 0,59	2,81 ^b \pm 0,40	7,55 ^a \pm 0,07	3,14 ^b \pm 0,40
FDN	123,9 ^a \pm 5,6	108 ^a \pm 11	124,6 ^a \pm 4,3	95,7 ^b \pm 4,5
FDA	87,8 ^a \pm 4,0	77,2 ^b \pm 7,7	88,0 ^a \pm 2,7	67,2 ^b \pm 3,0
LDA	36,6 ^a \pm 1,4	31,7 ^a \pm 4,1	37,1 ^a \pm 2,2	27,6 ^b \pm 1,6
CEL	51,2 ^a \pm 3,0	45,5 ^a \pm 3,8	50,9 ^a \pm 0,5	39,6 ^b \pm 1,4
HCEL	36,2 ^a \pm 1,8	33,0 ^a \pm 4,0	36,6 ^a \pm 1,7	28,5 \pm 1,9
PB	8,3 ^a \pm 1,1	7,06 ^a \pm 0,77	8,60 ^a \pm 0,43	7,81 ^a \pm 0,36
C/N	76,1 ^a \pm 4,5	69,0 ^a \pm 4,7	76,1 ^a \pm 4,5	55,8 ^b \pm 3,3

Tabla 1: Composición química del sustrato orujo de pera expresada en gramos (valores medios y desviación estándar para cuatro repeticiones), previa a la inoculación (inicial) y posterior a la fructificación (final) de PI-J y PI-P. MS: materia seca; MO: materia orgánica; CHS: carbohidratos solubles FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácido; LDA: lignina en ácido detergente; CEL: celulosa; HCEL: hemicelulosa; PB: proteína bruta; relación C/N: relación carbono-nitrógeno (sin unidad). Valores con letras distintas para una misma fila y la misma cepa indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Table 1: Chemical composition of pear pomace substrate expressed in grams (mean values and standard deviation for four replications), prior to inoculation (initial) and after (final) fruiting of PI-J and PI-P. MS: dry matter; MO: organic matter; CHS: soluble carbohydrates FDN: neutral detergent fiber; FDA: acid detergent fiber; LDA: lignin in detergent acid; CEL: cellulose; HCEL: hemicellulose; PB: crude protein; C/N: carbon-nitrogen ratio (no unit). Values with different letters for the same row and the same strain indicate significant differences ($p < 0,05$).

esta variable (Tabla 1). Estos resultados están en concordancia con la mayor degradación de materia orgánica por PI-P que proporcionaría sustancias solubles requeridas para el metabolismo fúngico. Esta reducción de la relación C/N podría estar asociada a una disminución del contenido de carbono del sustrato, ya que es utilizado por el metabolismo celular durante el desarrollo del cultivo para la formación de las estructuras propias de los hongos comestibles y parte se pierde como CO₂ (Sánchez *et al.* 2002, Nyochembeng *et al.* 2008, Sánchez 2009, Rizki & Tamai 2011, Anike *et al.* 2016).

Con el objeto de analizar la magnitud de la variación de la composición química del orujo de pera durante el cultivo y fructificación de las cepas de *P. ostreatus* estudiadas, los resultados se expresaron como disminución relativa porcentual respecto de los contenidos iniciales de MS, MO y componentes químicos analizados (Tabla 2), de manera similar a los resultados publicados por Rolz *et al.* (1986) y Anike *et al.* (2016).

El porcentaje de bioconversión (% pérdida de MS) fue de 20,1% y 28,8% para PI-J y PI-P, respectivamente, que se corresponden con la pérdida de MO (22,8% para PI-J y 30,9% para PI-P). Sán-

chez *et al.* (2002) informan valores similares de pérdida de MS al analizar el proceso de biodegradación de orujo de uva por dos cepas de *P. ostreatus* (19,4% a 20,1%).

El análisis químico de los componentes del sustrato durante el proceso de bioconversión del orujo de pera por *P. ostreatus* evidencia que en el tiempo en que se desarrollaron los ensayos, las cepas evaluadas utilizan inicialmente los CHS del orujo, aproximadamente 60 % en promedio para ambas cepas, y en menor medida las fibras, alrededor del 20 % para las distintas fracciones de fibras. Estos resultados evidencian que la disminución de compuestos simples como los CHS favorece la actividad de enzimas lignocelulolíticas. Como todo organismo, las cepas de *P. ostreatus* analizadas, utilizan inicialmente los compuestos más simples y fácilmente accesibles y retrasa la degradación de las sustancias más complejas, en este caso celulosa y lignina, para utilizarlos cuando los simples se consuman. Análisis similares fueron realizados por diversos autores (Philippoussis *et al.* 2001, Ravera *et al.* 2008, Hoa *et al.* 2015, Heredia-Solís *et al.* 2016).

Por otra parte, en relación a la utilización de fibras de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y lignina) por los hongos de pudrición blanca es importante considerar las características y mecanismos de regulación de las enzimas lignocelulolíticas. Diversos autores informan que altas concentraciones de hidratos de carbono fácilmente metabolizables reprimen la expresión de enzimas ligninolíticas (Elisashvili *et al.* 2002, Rouches *et al.* 2016). En relación a la síntesis de celulasa y xilanas, la represión génica por fuentes de carbono fácilmente metabolizable es una característica generalizada en los hongos de pudrición blanca y de la mayoría de los hongos dentro de este grupo, con síntesis de enzimas inducibles (Elisashvili *et al.* 2002).

En síntesis, la degradación de los diferentes componentes del sustrato y en particular de los

componentes de las fibras de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y lignina), dependen de la cepa y el tiempo de incubación. Desde esta perspectiva, no es posible generalizar que los hongos lignocelulolíticos, entre los que se encuentran *Pleurotus* spp., utilizan celulosa y lignina de manera similar, ya que esta actividad metabólica depende de exoenzimas cuya expresión está regulada por diversos factores entre los que es posible mencionar: disponibilidad de oxígeno, niveles de hidratos de carbono sencillos e interacción del micelio con el sustrato.

Análisis del orujo biodegradado como alimento para rumiantes

Considerando que la digestibilidad del sustrato biodegradado se correlaciona principalmente con la concentración porcentual de lignina, en base a materia seca, se analizó la composición de fibras del orujo de pera sometido al proceso de biodegradación por las cepas de *P. ostreatus* seleccionadas y se estimó la digestibilidad de materia seca (% DMS).

En la Tabla 3 se muestran los valores obtenidos. En todos los casos se observó un aumento del porcentaje de fibras respecto del sustrato inicial en base a materia seca, significativo para % FDN y % FDA. El % PB también se incrementó, aunque sólo en forma significativa para la cepa PI-P.

El % DMS calculada con la fórmula (1) disminuyó respecto del orujo sin biodegradar de 30,2% a 25,7% y 27,5% para PI-J y PI-P, respectivamente, con una reducción significativa ($p < 0,05$) para PI-J. Resultados similares fueron informados por Wang *et al.* (2001) quienes emplearon como sustrato para el cultivo de *P. ostreatus* mezclas de desechos provenientes de la industria cervecera con salvado de trigo. Estos autores observaron un incremento en las concentraciones porcentuales de celulosa, lignina y PB luego de la biodegradación. La acumulación de PB en el sustrato biodegradado la atribuyen al crecimiento del micelio.

Cepa	% de pérdida en el sustrato durante biodegradación						
	MS	MO	CHS	FDN	FDA	LDA	PB
PI-J	20,1 ^a ±2,8	22,8 ^a ±2,9	62,4 ^a ±2,6	12,8 ^a ±6,1	12,2 ^a ±5,5	13,6 ^a ±8,0	14,7 ^a ±7,1
PI-P	28,8 ^b ±1,9	30,9 ^b ±1,7	58,4 ^a ±5,6	23,2 ^b ±1,1	23,7 ^b ±2,1	25,6 ^a ±2,2	9,2 ^a ±0,4

Tabla 2: Pérdida relativa porcentual respecto de los contenidos iniciales de materia seca (MS), materia orgánica (MO), carbohidratos solubles (CHS), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), lignina en ácido detergente (LDA), y proteína bruta (PB). Valores con letras distintas para una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Table 2: Relative loss (percentage) with respect to initial contents of dry matter (MS), organic matter (MO), soluble carbohydrates (CHS), neutral detergent fiber (FDN), acid detergent fiber (FDA), detergent acid lignin (LDA), and crude protein (PB). Values with different letters for the same column indicate significant differences ($p < 0,05$).

	% PB	% FDN	% FDA	% LDA	% CEL	% HCEL	% DMS
T	4,67 ^a ±0,28	69,9 ^a ±2,6	49,5 ^a ±1,8	20,7 ^a ±1,0	28,8±1,2	20,4±0,8	30,2 ^a ±2,3
PI-J	4,98 ^a ±0,35	76,2 ^b ±2,1	54,35 ^b ±0,96	22,3 ^a ±1,1	32,1±1,1	21,9±1,2	25,7 ^b ±2,2
PI-P	6,11 ^b ±0,33	74,2 ^{ab} ±1,8	52,3 ^b ±1,1	21,3 ^a ±0,8	31,0±0,5	21,9±0,8	27,5 ^{ab} ±1,9

Tabla 3: Valores medios y desviación estándar de la concentración porcentual en base materia seca de proteína bruta (% PB); fibra detergente neutro (% FDN); fibra detergente ácido (% FDA); lignina en ácido detergente (% LDA); celulosa (% CEL); hemicelulosa (% HCEL) y digestibilidad de materia seca estimada (% DMS) del orujo de pera previo a la inoculación (T) y posterior a la fructificación de PI-J y PI-P. Valores con letras distintas para una misma columna y la misma cepa indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Table 3: Mean values and standard deviation of the percentage concentration based on dry matter of crude protein (% PB); neutral detergent fiber (% FDN); acid detergent fiber (% FDA); detergent acid lignin (% LDA); cellulose (% CEL); hemicellulose (% HCEL) and digestibility of dry matter estimated (% DMS) of the pre-inoculated fruit (T) and after fruiting of PI-J and PI-P. Values with different letters for the same column and the same strain indicate significant differences ($p < 0,05$).

El %DMS calculada con la ecuación propuesta por Goering y Van Soest, disminuyó respecto del orujo sin biodegradar de 30,2% a 25,7% y 27,5% para PI-J y PI-P, respectivamente, con una reducción significativa ($p < 0,05$) para PI-J. Resultados similares fueron informados por Wang *et al.* (2001) quienes emplearon como sustrato para el cultivo de *P. ostreatus* mezclas de desechos provenientes de la industria cervecera con salvado de trigo. Estos autores observaron un incremento en las concentraciones porcentuales de celulosa, lignina y PB luego de la biodegradación. La acumulación de PB en el sustrato biodegradado la atribuyen al crecimiento del micelio.

De esta forma, si bien el proceso de biodegradación se evidencia por el consumo de fibras y CHS (Tablas 1 y 2), al disminuir en mayor grado el contenido neto de MS que el de fibras y de PB, las concentraciones porcentuales referidas a MS aumentan (Tabla 3). Como consecuencia de estos argumentos, diferimos de la interpretación realizada por Wang *et al.* (2001) e Inácio *et al.* (2015) quienes atribuyen el aumento del porcentaje de fibras en base materia seca a la no utilización de estos compuestos por parte de *Pleurotus* spp.

En relación a la factibilidad de emplear el sustrato biodegradado en alimentación animal, la modificación en la cantidad y calidad de las fibras (Tabla 3), no permitiría utilizar el orujo de pera degradado en alimentación de rumiantes.

Eficiencia biológica y fructificación

Otra de las posibilidades de utilización de los residuos agroindustriales, considerando el elevado contenido de fuentes de carbono lignocelulósicas que contienen, es su empleo como sustrato para el cultivo de hongos comestibles, entre los que se encuentra *P. ostreatus*; que se produce a escala comercial.

En estudios anteriores, hemos evaluado el potencial biológico de diferentes cepas de *P.*

ostreatus para desarrollar sobre residuos de las industrias jugueras de peras y manzanas, constituidos por cáscara, semillas y restos de pulpa, observándose que sólo el bagazo de pera permite la obtención de carpóforos (Filippi *et al.* 2015).

En la figura 1 se muestran los resultados de ensayos de fructificación realizados con dos cepas de *P. ostreatus* empleando orujo de pera como sustrato. Los parámetros de productividad (EB, R y TP) corresponden a la totalidad de la cosecha luego de permitir dos fructificaciones.

La EB de las cepas PI-J y PI-P fueron de 98,3% y 62,3%, respectivamente, valores superiores a los informados por otros autores para *P. ostreatus* sobre otros sustratos. En grano de cebada adicionado con germen de trigo se informó 12,3% en una única cosecha (Wang *et al.* 2001), 37 a 41% sobre mosto proveniente de la vitivinicultura (Sánchez *et al.* 2002); 10 a 33% sobre bagazo de la agroindustria del mezcal (Heredia-Solís *et al.* 2016), 72% sobre paja de cebada (Salmones *et al.* 1997). Es relevante mencionar que

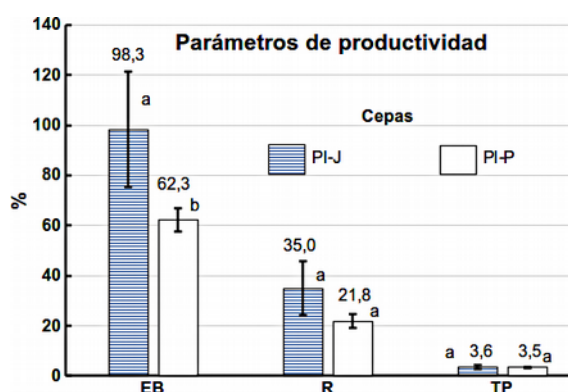


Figura 1. Parámetros de productividad: Eficiencia Biológica (EB), Rendimiento (R) y Tasa de Producción (TP) para las cepas PI-J y PI-P ensayadas. Letras distintas para el mismo parámetro indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figure 1. Productivity parameters: Biological Efficiency (EB), Yield (R) and Production Rate (TP) for PI-J and PI-P strains tested. Different letters for the same parameter indicate significant differences ($p < 0,05$).

esta comparación de EB se realizó considerando información de publicaciones en donde se empleó *P. ostreatus* y residuos agroindustriales, aunque difieren en la metodología de preparación del sustrato, incubación, fructificación y recolección del hongo.

El rendimiento obtenido (35% para PI-J y 22% para PI-P), también fue mayor que el reportado en la bibliografía con otros residuos agroindustriales. Así, por ejemplo, se informó un rendimiento de sólo 3% con cáscara de maní (Ravera *et al.* 2008), 15% con paja de arroz, y 11% con hojas de plátano (Obodai *et al.* 2003).

Es de destacar que el cálculo de rendimiento (“yield”) no se realiza del mismo modo en las publicaciones consultadas. En nuestro caso se determinó como se indica en la sección Materiales y Métodos, de acuerdo a lo informado por Gaitán-Hernández (2005). Por su parte, Ali *et al.* (2013) informan el rendimiento del hongo como el peso de las setas cosechadas de bolsas con 1 kg de sustrato húmedo; Jaramillo-Mejía & Albertó (2013) indican los rendimientos obtenidos en g, pero no especifican el peso de sustrato húmedo. Royse & Schisler (1987) y Royse & Sánchez (2012) consideran el rendimiento como la producción de hongos en kg/m².

Los valores de Tasa de Producción (TP) fueron de 3,6 y 3,5% para PI-J y PI-P, respectivamente, semejantes a los obtenidos sobre otros sustratos. Así, por ejemplo, la TP de *P. ostreatus*, fue de 2,9% sobre rastrojo de tomate (Sánchez *et al.* 2008), 1,5% sobre hoja de plátano deshidratada (Romero *et al.* 2010) y 1,4% sobre paja de cebada (Salmones *et al.* 1997).

Si bien PI-P provoca una disminución significativa de la relación C/N luego del cultivo y fructificación, la EB y R fue menor en relación a PI-J. Esta cepa, que no modifica significativamente la relación C/N evidenció parámetros de productividad significativamente mayores lo cual indicaría que el valor de C/N del orujo de pera sería el óptimo para esta cepa de *P. ostreatus*. Un análisis similar de la relación entre C/N y el rendimiento y EB de diferentes especies de *Pleurotus* fue realizado por Hoa *et al.* (2015).

Teniendo en cuenta que en la evaluación de un sistema productivo es importante considerar no sólo el rendimiento y la eficiencia biológica, sino también el período en que el cuarto de cultivo está en uso, por su relación con el costo energético y los riesgos de contaminación microbiana, se ana-

lizó además la duración del Período Productivo y las Tasas de Producción para las cepas ensayadas.

Desde esta perspectiva, considerando que las Tasas de Producción (EB/PP) fueron similares para ambas cepas (3,6% para PI-J y 3,5% para PI-P) y que el Período Productivo para PI-J fue de 45 días y de 35 días para PI-P, es factible señalar a la cepa PI-P como la más adecuada para la producción comercial sobre orujo de pera ya que implica un menor tiempo de uso de las instalaciones para el cultivo de hongos comestibles (Fig. 1).

Como conclusión, es posible indicar que los resultados que se presentan permiten afirmar que *P. ostreatus* puede utilizar los componentes del desecho generado por la agroindustria productora de jugos de pera para su crecimiento vegetativo (desarrollo micelial) y reproductivo (producción de carpóforos comestibles). Desde el punto de vista ambiental, la bioconversión del orujo de pera a través de la producción de hongos comestibles podría constituir una herramienta biotecnológica para reciclar estos residuos lignocelulósicos.

Agradecimientos

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

Referencias

- Ali N, Tabi AN, Zakil FA, Fauzai WN & Hassan O. 2013. Yield performance and biological efficiency of empty fruit bunch (EFB) and palm pressed fibre (PPF) as substrates for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)* 64(1): 93–99.
- Al-Momany A & Ananbeh K. 2011. Conversion of agricultural wastes into value added product with high protein content by growing *Pleurotus ostreatus*. In *Survival and Sustainability, Environmental Earth Sciences*. (Gökçekus H *et al.* eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1483-1490.
- Anike FN, Yusuf M & Isikhuemhen OS. 2016. Co-substrating of peanut shells with cornstalks enhances biodegradation by *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Bioremediation & Biodegradation* 7: 327. doi: 10.4172/2155-6199.1000327
- AOAC. 2000. Official methods of analysis Association of Official Analytical Chemists 17th Ed. Washington, D.C.

- Chang ST & Miles PG. 2004. Mushrooms. Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. 2nd Ed. CRC Press. 451 pp.
- Commanday F & Macy JM. 1985. Effect of substrate nitrogen on lignin degradation by *Pleurotus ostreatus*. *Archives of Microbiology* 142: 61-65.
- Deepalakshmi K & Sankaran M. 2014. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *Journal of Biochemical Technology* 5(2) 718-726.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M & Robledo CW. 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, & Bakradze M. 2002. Physiological Regulation of Basidiomycetes Lignocellulolytic Enzyme Activity. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 4: 159-166.
- Filippi MV, Martínez DA, Buglione MB, Reynoso LC, Rodríguez GE & Agüero MS. 2015. Bioconversión de orujo de pera y manzana por *Pleurotus ostreatus*. CD de resúmenes del 3º Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos SAProBio 2014. Resúmenes / Carolina Veronica Attallah y otros; compilado por Guillermina Forno; Ricardo Kratje; Alejandro Trombert. 1ra Ed. Santa Fé: Ediciones UNL. E-Book. ISBN 978-987-657-967-4.
- Gaitán-Hernández R. 2005. Evaluación in vitro del hongo comestible *Pleurotus eryngii*: Efecto de diferentes suplementos orgánicos en el crecimiento micelial y producción de cuerpos fructíferos. *Revista Mexicana de Micología* 21: 77-84.
- Goering MK & Van Soest PJ. 1970. Forage fiber analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications). *Agricultural Handbook* N° 379, Washington D.C.
- Heredia-Solís A., Esparza-Ibarra EL, Romero-Bautista L, Cabral-Arellano FJ, Echavarría-Chairez FG. & Bañuelos-Valenzuela R. 2016. Evaluación de mezclas para sustrato y producción de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kumm. *Agroproductividad* 9(6): 67-72.
- Hoang HT, Wang CL, & Wang CH. 2015. The effects of different substrates on the growth, yield, and nutritional composition of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology* 43(4): 423-434.
- Inácio FD, Ferreira RO, de Araujo CAV, Peralta RM. & de Souza CGM. 2015. Production of enzymes and biotransformation of orange waste by oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. *Advances in Microbiology* 5: 1-8.
- Jaramillo-Mejía S & 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 JE & Mata G, eds.). Tapachula. Editorial El Colegio de la Frontera Sur México, pp. 155-161.
- Koehler LH. 1952. Differentiation of carbohydrates by antrone reaction, rate and color intensity. *Analytical Chemistry* 24 (10): 1576-1591.
- Laos F. 2013. Tratamiento de residuos orgánicos; su mejor destino. III Jornadas Nacionales de GIRSU, Rawson Chubut. Disponible en <http://www.inti.gov.ar/jornadasgirsu2013/pdf/presentacionesDisertantes/2921.pdf> (accedido el 11-VI-2017).
- Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A & del Río JC. 2005. Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8: 195-204.
- Martínez DA, Buglione MB, Filippi MV, Reynoso L, Rodríguez GE & Agüero MS. 2015. Evaluación del crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* y *Agrocybe aegerita* sobre orujos de pera. *Anales de Biología* 37: 1-10.
- Mata G & Savoie JM. 2007. Producción de semilla y conservación de cepas de *Agaricus bisporus*. En *Cultivo, mercadotecnia e inocuidad alimentaria de Agaricus bisporus* (Sánchez EJ, Royse DJ & Leal Lara H, eds.) Tapachula: Editorial ECOSUR, pp 37-48.
- Nicolini L, von Hunolstein C & 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 LM, Beyl CA & Pacumbaba RP. 2008. Optimizing edible fungal growth and biodegradation of inedible crop residues using various cropping methods. *Bioresource Technology* 99: 5645-5649.
- Obodai M, Cleland-Okine J, & Vowotor KA. 2003. Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 30(3): 146-149.
- Pardo-Giménez A, Perona-Zamora MA & Pardo-Nuñez J. 2008. Utilización de fibra de kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) en la elaboración de sustratos específicos para cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer. *Revista Iberoamericana de Micología* 25: 57-61.
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, Martínez J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* 5(2): 53-63.
- Philippoussis A, Zervakis G & Diamantopoulou P. 2001. Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17(2): 191-200.
- Poppe J. 2004. Agricultural Wastes as Substrates for Oyster Mushroom. En *Mushroom Growers Handbook 1* (Gush R, ed.). Seoul. Editorial MushWorld, pp. 80-99.
- Ravera C, Bettera C, Fernández MA, Estive E & Piñeda H. 2008. Aprovechamiento de los residuos agrícolas. Procesamiento de la caja del maní, su conversión biológica y productos. I Simposio Iberoamericano de Ingeniería de Residuos. Castellón, 23-24 de julio de 2008. Disponible en <http://www.redisa.net/doc/artSim2008/tratamiento/A22.pdf> (accedido el

- 23-VI-2017).
- Rizki M & Tamai Y. 2011. Effects of different nitrogen rich substrates and their combination to the yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (7): 1695-1702.
- Rodríguez G. 2007. Cultivo de hongos comestibles. *INTA Fruticultura & Diversificación* 522007: 10-15.
- Rolz C, De Leon R, De Arriola MC & De Cabrera S. 1986. Biodelignification of lemon grass and citronella bagasse by white-rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 52(4): 607-611.
- Romero O, Huerta M, Damián MA, Macías A, Tapia AM, Parraguirre JF & Juárez J. 2010. Evaluación de la capacidad productiva de *Pleurotus ostreatus* con el uso de hoja de plátano (*Musa paradisiaca* L., cv. Roatan) deshidratada, en relación con otros sustratos Agrícolas. *Agronomía Costarricense* 34(1): 53-63.
- Rouches E, Zhou S, Steyer JP & Carrere H. 2016. White-Rot Fungi pretreatment of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion: Impact of glucose supplementation. *Process Biochemistry* 51 (11): 1784-1792.
- Royse DJ & Sánchez JE. 2012. Suplementación de la composta después de la primer, segunda o tercera cosecha para mejorar la producción de hongos (*Agaricus bisporus*). En *Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica: Investigación y desarrollo en un entorno multicultural* (Sánchez JE & Mata G, eds.). Editorial El Colegio de la Frontera Sur, Tapachula, Chiapas México, pp. 99-105.
- Royse DJ & y Sánchez JE. 2017. Producción mundial de setas *Pleurotus* spp. con énfasis en países iberoamericanos. En *La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas *Pleurotus* spp.* (Sánchez JE & Royse DJ, eds). Editorial El Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México, pp. 17-25.
- Royse DJ, & Schisler LC. 1987. Yield and size of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* as effected by delayed-release nutrient. *Applied Microbiology and Biotechnology* 26(2): 191-194.
- Salmones D, Gaitán-Hernández R, Pérez R & Guzmán G. 1997. Estudios sobre el género *Pleurotus*. VIII. Interacción entre crecimiento micelial y productividad. *Revista Iberoamericana de Micología* 14: 173-176.
- Sánchez A, Esqueda M, Gaitán-Hernández R, Córdova A & Coronado ML. 2008. Uso potencial del rastrojo de tomate como sustrato para el cultivo de *Pleurotus* spp. *Revista Mexicana de Micología* 28: 17-24.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2537-2542.
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(5): 1321-1337.
- Storti L. 2016. Informes de cadenas de valor 1(13). Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas Presidencia de la Nación. Disponible en http://www.economia.gov.ar/peconomica/docs/Complejo_fruta_pepita.pdf (accedido el 19-VI-2017).
- ten Have R & Teunissen PJM. 2001. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chemical Reviews* 101(11): 3397-414.
- Treviño J & González G. 1973. Efecto del estado de crecimiento y ciclo de vegetación sobre la digestibilidad, estimada por el método químico, del cultivar Aragón (*M. sativa* L.). *Revista Pastos* 3(2): 257-263.
- Van Soest PJ, Robertson JB & Lewis BA. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.
- Wang D, Sakoda A & Suzuki M. 2001. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresource Technology* 78: 293-300.