

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE BIOLOGIA**

**Producción de Hongos Comestibles  
empleando la pulpa de café  
como sustrato**

**INVESTIGACION DIRIGIDA**  
**presentada para optar al grado de**  
**LICENCIADA EN BIOLOGIA**

**MITZI CAMPOS AGUERO**

**1986**

PRODUCCION DE HONGOS COMESTIBLES

EMPLEANDO LA PULPA DE CAFE

COMO SUSTRATO

Trabajo Final de Graduación, presentado a la Facultad de  
Ciencias en la Escuela de Biología  
Universidad de Costa Rica

APROBADO

Ana Victoria L. de Macaya, Ph.D.

Director de Práctica  
Dirigida

Maryssia Nassar, Lic.

Miembro del Tribunal

Julieta Carranza Morse, Ph.D.

Miembro del Tribunal

María Isabel Morales Z., M.Sc.

Miembro del Tribunal

Carlos Villalobos, M.Sc.

Miembro del Tribunal  
Director de la Escuela

Mitzi Campos Agüero

Sustentante

## AGRADECIMIENTO

Mi profundo agradecimiento al I.C.A.I.T.I., y a sus distinguidos profesionales, Ing. Carlos Soliz, Director de la División de Investigación Agrícola, al M.Sc. Roberto De la Cruz, Tutor y guía de esta investigación, al equipo de tutores: Dra. Sireni de Cabrera, M.Sc. Francisco Calzada, Lic. María del Carmen de Armas y Lic. Fátima de Michelis por toda la ayuda que me brindaron durante el tiempo que estuve con ellos, ya que siempre estuvieron dispuestos a compartir conmigo sus conocimientos y experiencias.

Al Ing. Félix Del Berto, representante del I.C.A.I.T.I. en Costa Rica por haberme permitido el Instituto en Colombia y a la U.N.E.S.C.O. que gracias a la Organización Inter-Regional se pudo financiar la mayor parte de esta investigación.

## DEDICATORIA

A mis compañeros de curso y a todo el personal técnico por su gran apoyo y amistad que permitieron hacer realidad este proyecto.

A la Dra. Ana Victoria Lizano de Paraya, de la Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica por su ayuda para obtener la beca, por permitir la fase final de este trabajo y por ampliar mis conocimientos en el campo de la Biología.

A los miembros de mi comité: Lic. Merysela Basso, Dra. Julieta Carranza, M.Sc. María Isabel Amador y M.Sc. Carlos Villalobos por sus sugerencias y revisiones del manuscrito.

Al Dr. Luis Román, M.Sc. y Lic. Doris Fernández por su apoyo y confianza en mí, al Lic. Roberto de la Cruz, M.Sc. y Lic. Fátima de Michelis por su valiosa colaboración.

A toda aquella persona que me apoyó durante la realización de esta investigación.

A mis padres:

Ing. Gilberto Campos S. y

Prof. Ruth Agüero de Campos,

a Evelyn y Alex Francisco,

por su cariño, apoyo y confianza.

## AGRADECIMIENTO

Mi profundo agradecimiento al I.C.A.I.T.I., y a sus distinguidos profesionales, Ing. Carlos Rolz, Director de la División de Investigación Aplicada, al M.Sc. Roberto De León, tutor y guía de esta investigación, al equipo de tutores: Dra. Sheryl de Cabrera, M.Sc. Francisco Calzada, Lic. María del Carmen de Arriola y Lic. Fabiola de Micheo, por toda la ayuda que me brindaron durante el tiempo que estuve con ellos, ya que siempre estuvieron dispuestos a compartir conmigo sus conocimientos y experiencias.

Al Ing. Félix Del Barco, representante del I.C.A.I.T.I. en Costa Rica por presentarme en el Instituto en Guatemala y a la U.N.E.S.C.O., que gracias a su programa INTER - MIRCEN se pudo financiar la mayor parte de esta investigación.

A mis compañeros becarios y a todo el personal técnico por su gran apoyo y amistad que permitió hacer realidad este proyecto.

A la Dra. Ana Victoria Lizano de Macaya, de la Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica por su ayuda para obtener la beca, por dirigir la fase final de este trabajo y por ampliar mis conocimientos en el campo de la micología.

A los miembros de mi comité: Lic. Maryssia Nassar, Dra. Julieta Carranza, M.Sc. María Isabel Morales y M.Sc. Carlos Villalobos por sus sugerencias y revisión del manuscrito.

Al Dr. Luis Fournier, M.Sc. Manuel Chavarría, M.Sc. Rodolfo Ortiz y Lic. Doris Fernández por su guía, apoyo y amistad y al Sr. Misael Boza por su valiosa colaboración.

A toda aquella persona que contribuyó en alguna forma para la realización de esta investigación.

VIII. RECOMENDACIONES

IX. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

X. ANEXOS

## INDICE

	Página
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
III. JUSTIFICACIONES	16
IV. OBJETIVOS	17
1- Objetivo General	17
2- Objetivos Específicos	17
V. MATERIALES Y METODOS	18
1- Medios de cultivo	18
2- Condiciones de cultivo en laboratorio y preparación del inóculo	19
3- Preparación y Manejo del Sustrato	24
4- Prueba con un medio al que se adiciona cafeína	27
5- Métodos Analíticos	27
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	29
1- Preparación del Inóculo	29
2- Etapa de crecimiento en Sorgo	31
3- Preparación del sustrato	33
4- Desarrollo del micelio sobre pulpa de café	42
5- Fructificación	44
6- Fuentes de carbono	46
7- Valor energético de la pulpa de café	48
VII. CONCLUSIONES	50
VIII. RECOMENDACIONES	51
IX. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	53
X. ANEXOS	60

## INTRODUCCION

## RESUMEN

La pulpa de café ha sido sugerida por varios investigadores como un buen sustrato para el desarrollo de hongos comestibles.

En la presente investigación, se trató de encontrar el mejor método para eliminar los compuestos tóxicos de la pulpa, como cafeína y polifenoles. De los tres tratamientos aplicados, el lavar cinco veces con agua a 80°C fue el que dió mejores resultados ya que se obtuvo un porcentaje menor de compuestos tóxicos.

Seis cepas de hongos comestibles se utilizaron: Coprinus fimentarius Fr., Pleurotus cornucopiae (Paul ex Fr.) Gill., Pleurotus flabellatus (Berk & Br.) Sacc., Pleurotus ostreatus (Jacq. ex Fr.) Kummer., Pleurotus sajor-caju (Fr.) Singer y Volvariella volvacea.

De ellas, Pleurotus flabellatus fue la que se desarrollo mejor, y produjo cuerpos fructíferos en aproximadamente un mes y medio.

Muchos especialistas creen que la producción intensiva de hongos comestibles podría ayudar a reducir, en parte, el problema del hambre mundial. A la vez, esta producción actúa como una de las opciones alternativas para emplear desechos vegetales como sustrato, ya que los hongos, al ser heterótrofos, absorben nutrientes ya elaborados para nutrirse.

En América Central uno de los cultivos de más importancia económica es el café. Pero su procesamiento inicial tiene un inconveniente, y es que produce grandes cantidades de pulpa. Este residuo se utiliza sólo en pequeñas proporciones como abono y el resto se convierte en agente contaminante de terrenos y ríos.

## INTRODUCCION

Al principio de la vida humana sobre la tierra, a causa de su número reducido, el Hombre contaba con infinidad de recursos naturales para su subsistencia. Posteriormente la población aumentó y con ello se redujeron los recursos disponibles. Es por esta razón que cualquier acción o trabajo que el ser humano realice hoy, se hace tan notorio y repercute en todos los demás seres de la tierra.

Si el hombre no quiere autodestruirse y destruir la tierra, tiene que buscar un equilibrio con su ambiente. Debe procurar que el proceso de desarrollo sea un medio para progresar y no para perjudicar ó eliminar ecosistemas naturales.

Hacen falta estudios científicos y tecnológicos tendientes a determinar el uso potencial de la tierra, el mejor aprovechamiento de los diversos recursos de la naturaleza y las posibles medidas para convertir los residuos en nuevos recursos.

Algunas veces, como lo expresa Repossi (1979) las innovaciones científicas o técnicas, más o menos relevantes, se presentan como un Jano Bifronte, con dos rostros. Por un lado proporcionan ganancias o adelantos, pero por otro, a veces, provocan destrucción ó contaminación del ambiente.

Muchos científicos creen que la producción intensiva de hongos comestibles podría ayudar a solucionar, en parte, el problema del hambre mundial. A la vez, esta producción actúa como una de las posibles alternativas para emplear desechos vegetales como sustrato, ya que los hongos, al ser heterótrofos, necesitan materiales ya elaborados para nutrirse.

En América Central uno de los cultivos de más importancia económica es el café. Pero su procesamiento inicial tiene un inconveniente, y es que produce grandes cantidades de pulpa. Este residuo se utiliza sólo en pequeñas proporciones como abono y el resto se convierte en agente contaminante de terrenos y ríos.

La presente investigación tiene como propósito llegar a determinar cuál especie de hongo comestible crece en este sustrato, en las mejores condiciones de desarrollo, lo cuál pueda significar que se obtengan producciones a bajo costo económico y, a la vez, se reciclen nutrimentos que existen en el residuo de la pulpa de café y disminuya el problema de la contaminación.

## II. ANTECEDENTES

El término hongo (del latín "fungus", seta o excrecencia de la tierra) fue dado por primera vez por Tournefort en 1694 (Guzmán, 1983).

El estudio sistemático de los hongos cuenta solamente con 250 años, pero las manifestaciones de este grupo de organismos han sido conocidas por el hombre desde hace miles de años (Alexopoulos, 1976). Los primeros indicios de conocimientos micológicos referentes a las enfermedades de las plantas se encuentran ya en "Veda" (1200 A.C.) (Paccioni, 1982).

El médico griego Hipócrates (460-377 A.C.) conocía y utilizaba los hongos como medicina (Nonis, 1982). Los datos relativos a los efectos de los hongos venenosos constituyen el argumento de un epigrama de Eurípides (450 A.C. aprox.) (Paccioni, 1982).

Por su parte, Teofrasto (372-286 A.C.) discípulo de Platón y de Aristóteles, en sus obras: "La historia de las plantas" y "Las causas de las plantas", definió a las setas como vegetales imperfectos, sin raíces, sin hojas, sin flores y sin frutos (Nonis, 1982, 1984).

Ateneo (I y II siglo), en su obra "Dipnosophistai", es decir "Banquete de los sofistas", nos dice que para cultivar las setas hay que enterrar estiércol al pie de las higueras y mantener el terreno húmedo (Nonis, 1984).

Plinio el Viejo (23-79 D.C.) naturalista romano, en la enciclopedia que tituló "Naturalis historias libri XXXVII", dicta normas para distinguir los hongos comestibles de los venenosos, y cita como comestibles los hongos Fistulina hepatica (Huds.) Fr., Lepiota procera Scop. ex Fr. y Terfezia leonis (Tulasne) Tulasne (Nonis, 1982, 1984).

De Dioscórides Pedanio, médico griego del siglo I, aprendemos a curar los intoxicados por hongos o los indigestos con hongos comestibles, con enemas de agua salada (Nonis, 1982).

El médico Claudio Galio (129-201 D.C.), en su obra "De alimentarium facultativus" declara comestibles las oronjas y los boletus, y prácticamente venenosos a todos los demás (Nonis, 1984).

El médico filósofo persa Ibn Sinâ, conocido bajo el nombre de

Avicena (979-1037), asegura que todos los hongos verdes son venenosos, lo que no es cierto, por más que la mortífera Amanita phalloides (Fr.) Quélet. sea verde o verdosa.

San Alberto Magno (1193-1280 D.C.) menciona que una Amanita mata moscas, por lo que será llamada muscarina, y dicta normas para defenderse de su veneno (Nonis, 1982, 1984).

Ernesto Barbaro, abogado veneciano, habla de la posibilidad de cultivar el hongo Agrocybe aegerita (Brig.) Sing., al sembrarlo en troncos de álamos que se mantienen húmedos.

Pedro-Andrés Mattioli (1500-1577), en su obra "Commentarii in Pedanii Dioscoridis Anazarbei de materia medica", afirma por primera vez que las setas que se vuelven azules son venenosas. Y declara que todas las setas lignícolas son comestibles; lo cual no es cierto.

El primer tratado de micología sistemática se debe al médico Andrés Cesalpinio (1519-1603). En él describe varios géneros y especies de hongos. Ulises Aldrovandi (1522-1605) en su "Historia natural" alargó la lista dada por Cesalpinio.

Con el "Opusculum de tuberibus" del médico Alfonso Ciccarelli (1532-1585) la micología sigue progresando. El autor reúne todas las notas populares y científicas sobre las trufas, incluida la forma de cultivarlas y de cocinarlas (Nonis, 1984).

Del francés Clusius (Charles de L' Ecluse, 1525-1609), aparece la primera monografía micológica, ya que él se dedicó al estudio de las setas de Hungría. Describe e ilustra 105 especies; declara 44 especies comestibles y 61 tóxicas (Nonis, 1982, 1984).

Notable impulso tuvo la micología gracias al científico sueco Lineo (Carl von Linné, 1707-1778), autor de más de doscientas obras de botánica sistemática y descriptiva. A él se le debe la introducción de la nomenclatura binomial (Nonis, 1982).

Con el descubrimiento del microscopio los estudios se intensifican. Gracias a este instrumento, el florentino Pier' Antonio Micheli (1679-1737) demuestra que las setas se reproducen por semillas microscópicas, las esporas. A él se debe el cultivo de hongos a partir de esporas (Nonis, 1982, 1984).

También gracias al microscopio, se descubren los ascos por Hedwig (1730-1799) y luego los basidios por L veille (1837), lo que permitirá clasificar las setas en ascomicetes y basidiomicetes (Nonis, 1984).

El fundador de la micología moderna es el holandés Christian Persoon (1755-1837). En su obra "Synopsis methodica fungorum"  l perfecciona la clasificación científica de los hongos. Define, sobre todo para los gasterales, la nomenclatura binómica dada por Lineo.

Elías Fries (1794-1878) destacado micólogo sueco, estudi  los trabajos de sus predecesores y localizó algunos millares de especies bajo nomenclatura hasta entonces heteróclita (irregular o extra a). Clasific  los hongos de acuerdo al color de las masas de esporas y formuló los principios fundamentales de la micología. Su obra se titula "Systema mycologicum" y es considerada por los micólogos como el punto de partida, (1 de enero de 1821), para la nomenclatura de los hongos superiores, excepto para los gasterales, para los que se continúa empleando la clasificación dada por Persoon (Acuerdo del Congreso Botánico de Sidney, 1981) (Nonis, 1982, 1984).

Merecen citarse algunos grandes micólogos como son: el francés L. Quélet (1832-1899), N. Patouillard (1854-1926) y los italianos Pier Andrea Saccardo (1845-1920), autor de "Syloge Fungorum omnium hucusque cognitorum" y Monseñor Giacomo Bresadola (1847-1929). El sistema friesiano fue aceptado casi íntegramente por este estudioso, en su obra "Iconographia mycologica", dada en 24 volúmenes (Nonis, 1982).

En el mundo existe una enorme cantidad de hongos, los últimos cálculos dan una cifra de 200.000 especies (Guzmán, 1981). De esta gran cantidad de hongos que hay a nuestro alrededor, sólo se han estudiado y explotado unas cuantas especies.

El término hongo se emplea para designar a ciertos organismos microscópicos y/o macroscópicos que viven sobre materia orgánica (Guzmán, 1981). Los biólogos emplean este vocablo para incluir a organismos con núcleo, portadores de esporas, con células sin cloroplastos por lo que son aclor filos, por lo general se reproducen sexual y asexualmente.

No poseen tallo, hojas, raíz o un sistema vascular desarrollado y son heterótrofos, saprófitos o parásitos (Alexopoulos, 1976; Font Quer, 1982).

Los hongos son organismos que nos afectan de muchas formas. Unos causan enfermedades a plantas, animales y al hombre; otros son responsables de la descomposición de la materia orgánica. Algunos géneros nos favorecen, ya que se utilizan en la producción de medicinas, como la penicilina (Alexopoulos, 1976). Otros se emplean en procesos industriales de fermentación en los que se preparan vinos, cerveza, pan y quesos. Muchos otros son consumidos como rico alimento.

El consumir hongos comestibles es una práctica antigua. Los romanos conocieron algunos hongos que clasificaban como excelente comida, como el hongo Amanita caesarea (Scop. ex Fr.) Grev., al que llamaron "Boletus" y que era servido en los banquetes imperiales. También gustaron de los Boletus a los que denominaban "Suillus" y de las trufas a las que nombraban como "Tuber" (Argueta, 1983).

Los mayas también los conocían y empleaban como alimento y medicina, prueba de ellos son los hongos piedra que se supone utilizaban para el culto de los hongos (Guzmán, 1983).

Los hongos comestibles presentan menos proteínas que la carne y el pescado, pero se comparan favorablemente con la mayoría de los vegetales frescos en cuanto a contenido proteínico y porque constituyen una buena fuente de vitaminas y minerales. Entre las vitaminas están: tiamina, riboflavina, niacina, biotina y ácido ascórbico (U.S.A.I.D., 1972; Farr, 1983).

Los hongos comestibles se agrupan en dos secciones: los hongos comestibles silvestres o naturales y los que son cultivados por el hombre.

Los hongos comestibles silvestres juegan un papel importante en el área de Mesoamérica, principalmente en las tierras altas, correspondientes a extensiones con bosques de pino y encino. Allí los indígenas se alimentan y comercian con ellos.

Como se anotó antes, los hongos son aclorofilos, por lo que no pueden realizar la fotosíntesis y producir sus propios alimentos, ya que no pueden asimilar el carbono del anhídrido carbónico ( $\text{CO}_2$ ) presente en el aire y utilizarlo con el agua para formar glucosa, almidón y celulosa. Estos organismos deben obtener el carbono necesario para constituir sus tejidos a partir de sustancias orgánicas (Nonis, 1982). Por esto es que deben vivir sobre diversos materiales orgánicos vivos o muertos, según el caso, pero que ya están elaborados. Los necesita para descomponerlos y extraer carbohidratos en cualquier forma - preferiblemente glucosa, sacarosa y maltosa. Además, obtener compuestos inorgánicos nitrogenados para sintetizar sus proteínas y vitaminas (Alexopoulos, 1976; Guzmán, 1981).

La característica de requerir material ya preparado es lo que se aprovecha a la hora de cultivar hongos comestibles, al utilizar desperdicios como sustrato. Generalmente estos materiales son residuos de otros procesos biológicos, por lo que son de bajo costo y fácil obtención. Entre los más utilizados están pajas de cereales como arroz y trigo, hojas de banano o té, ramas de palma de aceite, olotes de maíz, residuos de madera o papel, excremento de pollos o caballos, cáscaras de semilla de algodón y otros materiales vegetales (Chang, *et al.*, 1982; Farr, 1983).

Antes de plantearse esta alternativa, muchos de estos desperdicios agrícolas se botaban o se quemaban. El quemarlos no es una buena solución, ya que lo único que se hace es transformar los residuos sólidos en gaseosos y con esto solo se agrava la contaminación atmosférica (Repossi, 1979). La otra solución, o sea el botarlos, planteaba el problema del espacio, la descomposición y la contaminación del lugar.

El flujo de energía en un ecosistema, en el cual se da movimiento de sustancias orgánicas y minerales, se produce del medio ambiente a los organismos productores y consumidores; después los descomponedores o sea los hongos y las bacterias, reintegran estos elementos al medio ambiente.

Por ello, una de las ventajas de cultivar hongos sobre residuos orgánicos es que éstos son removidos, aprovechados y reintegrados al ecosistema (Zadrazil *et al.*, 1983).

El sustrato en que se planea hacer crecer un hongo comestible debe presentar ciertas características físicas, químicas y biológicas, que faciliten el desarrollo fungal.

Entre los compuestos químicos debe contar con ciertos polímeros naturales tales como: celulosa, lignina, hemicelulosa, algunos azúcares, amino ácidos, nitrógeno, proteínas y otros componentes minerales (Francia, s.f.; Chang *et al.*, 1982).

Su estructura física debe ser suelta, porosa y de textura simple, para que se pueda efectuar el intercambio de gases entre el sustrato y el medio ambiente, y, además, para que las hifas puedan penetrar con facilidad. El material debe presentar un alto grado de retención de humedad, ya que los cuerpos fructíferos constan de 90% de agua.

Una vez seleccionado el posible material, debe ser esterilizado para que quede libre de microorganismos como larvas de insectos, ácaros, gusanos o esporas de otros hongos, ya que éstos pueden actuar como competidores por los nutrimentos o pueden contaminar el sustrato (U.S.A.I.D., 1972; Francia, s.f.).

Entre los cultivos de hongos, el más antiguo no es el conocido champiñón, sino el "Shiitake" (hongo roble) o sea Lentinus edodes (Berk.) Sing., que se ha cultivado durante 2.000 años. Crece en áreas tropicales de países asiáticos como Japón, China y Corea (Zadrazil y Grabbe, 1983). Es un hongo lignícola, por lo cual se cultiva sobre troncos de madera, especialmente de Quercus serrata Thumb. y Quercus acusissima Carruth. (Ito, 1978 citado por Farr, 1983).

Los antiguos griegos y romanos cultivaron el hongo llamado "seta del chopo" (Agrocybe aegerita); ellos esparcían polvo de la corteza del árbol del género Populus, también conocido como chopo sobre un suelo rico en humus. Hoy se cortan discos de los troncos de este árbol y se colocan sobre ellos trozos de laminillas del hongo (Nonis, 1982).

En el mundo hay unas quince o más especies de hongos, agrupadas en varios géneros, que son cultivadas comercialmente a gran escala (Chang y Hayes, 1978). En el Hemisferio Occidental, el cultivo de los hongos cuenta con aproximadamente 400 años (Christensen, 1964).

Filipinas en 1935 (Quimio, 1981). También se cultiva en Madagascar, Indonesia y Malasia.

Con relación a este cultivo, Quimio (1981) anota que en un estudio sobre las necesidades nutricionales de Volvariella volvacea, se llegó a la conclusión de que este hongo crece mejor en un medio de cultivo elaborado a base de jugo de manzana, y presenta un buen desarrollo sobre los sustratos de paja de arroz, hojas de ipil-ipil (leguminosa de zonas tropicales y subtropicales, como Filipinas y el norte de Australia), pedazos de papel, polvo de coco y "palote" u hojas de banano.

Zadrazil y Kurtzman (1982) declaran que Pleurotus ostreatus (Jacq. ex Fr.) Kummer, P. sajor-caju (Fr.) Sing., P. flabellatus (Berk & Br.) Sacc., P. cornucopiae (Paul ex Fr.) Gill., P. sapidus (Schulzer) Kalchbr. y otras especies viven en la naturaleza sobre madera muerta como saprófitos y descomponedores primarios.

El género Pleurotus ostreatus, se cultiva desde principios de siglo en pequeña escala en Europa y en la actualidad sobre todo en Italia, Hungría, Alemania, Europa Oriental y Asia (Morales, 1976; Zadrazil, 1982).

En 1980, Macaya-Lizano, de acuerdo con los resultados de sus investigaciones, indica que es posible realizar en Costa Rica un cultivo artesanal de P. ostreatus y especies afines, empleando como medio de cultivo materiales de desecho como aserrín, bagazo de caña, paja o granza de arroz y desechos de madera.

Chang, et al., 1981 indicaron que es posible cultivar el hongo Pleurotus sajor-caju utilizando como sustrato desechos de algodón, los cuales son utilizados por el hongo para obtener un alto contenido de proteínas.

En ese mismo año (1981) Platt, et al., presentaron un trabajo sobre los medios de cultivo más rápidos para el desarrollo de las especies de Pleurotus. En él anotan que dichas especies mostraron un alto grado de crecimiento, en un sustrato formado a base de grano de sorgo.

En 1982, Morales realizó cultivos de Agaricus bisporus junto con A. bitorquis (Quélet.) Sacc., Pleurotus flabellatus, P. sajor-caju y

Algunos de los hongos cultivados son: las trufas (Tuber ssp.), cultivadas en Francia; el género Clitocybe se cultiva en el sur de Italia. Stropharia rugosoannulata Farlow ex Murr., se cultiva en Alemania, y en *Austria se están perfeccionando los métodos de cultivo de los hongos* Boletus edulis Bulliard ex Fr. y Lepiota procera (Argueta, 1983).

El género Agaricus bisporus (Lange) Imbach., es cultivado en todo el mundo con buenos resultados. En 1707, el francés Tournefort publicó un método para su cultivo y fue aplicado por dos siglos. El cultivo de este hongo, conocido como "Champiñón", comenzó en subterráneos y canteras en los alrededores de París y se empleaba como sustrato estiércol de caballo y paja, como se hace hoy día (U.S.A.I.D., 1972). Este cultivo se puede hacer al aire libre; no obstante, se prefiere cultivarlo en lugares cerrados, en los que es más fácil conservar la humedad, la temperatura y la ventilación necesarias. El estiércol de caballo que se emplea como sustrato, es un material rico en lignina, y para su utilización ha de estar maduro, es decir, haber superado el estado de fermentación. Se considera que la fermentación ha concluido cuando no se detecta amoníaco libre en el sustrato y el pH baja de 8.0-8.5 a 7.0-7.5; además el material debe ser casi inodoro, o sea no detectarse olores rancios (indicadores de restos de fermentación anaeróbica). Durante la fermentación y después de ésta, el material se debe revolver para tener una mezcla homogénea (Leal, s.f.; Nonis, 1982).

Este cultivo se practicó por muchos años en Francia e Inglaterra y no fue sino hasta fines del siglo XIX cuando se introdujo en los Estados Unidos (U.S.A.I.D., 1972).

En México se ha cultivado el champiñón a escala comercial desde hace veinte años (Martínez et al., 1984).

En Costa Rica se inició el cultivo de Agaricus bisporus en 1970 y en 1975 llegó a una producción de 4 millones de libras al año.

Volvariella volvacea (Bull. ex Fr.) Singer, conocida como el hongo de la paja, es muy popular en China, Filipinas y también en Asia. Su cultivo comenzó en China en el siglo XVIII y después fue introducida en

P. ostreatus "Florida". Para producirlos se empleó como medio de cultivo mezclas de paja de trigo, pulpa de café, cascabillo de café (pergamino, Anexo N. 2) y citronella (Cymbopogon nardus (L.) Rendle. Los mejores resultados se presentaron en los agregados de paja de trigo y pulpa de café y en la de citronella con paja de trigo.

Bisht y Harsh, en 1984 señalaron que en una mezcla de Lantana camara L. con desechos de papel, se podía cultivar el hongo Pleurotus ostreatus con buenos resultados.

Martínez, et al. (1984) indican que es posible cultivar P. ostreatus sobre pulpa de café y de esta manera, obtener paralelamente a la producción de hongos comestibles, un alimento no convencional para animales.

Aunque se han realizado numerosos estudios, aún queda mucho por indagar, sobre todo lo concerniente a la comestibilidad de los hongos y a la utilización de diferentes residuos vegetales como sustrato. Además determinar cuales son los más aptos para el buen desarrollo de los hongos.

Entre los materiales disponibles y posibles de seleccionar, se sustenta la idea de utilizar la pulpa de café como sustrato en el cultivo de hongos comestibles.

En Centro América el cultivo de café (Coffea arabica L.) es uno de los que tiene mayor importancia económica, ya que es una fuente de divisas y de trabajo.

El fruto del café se puede procesar de dos formas: por el método seco y el húmedo. En el medio Centroamericano y en Colombia el más comúnmente utilizado es el realizado por la vía húmeda (De León, 1980). En Costa Rica el 90% de los beneficios lo procesan de esta forma (Mora, 1981).

Por vía húmeda se obtienen dos tipos de sub-productos:

- a- desechos líquidos: aguas del despulpe y de la fermentación. Estas aguas van a los ríos y aumentan el contenido de sustancias orgánicas, que al descomponerse matan la flora y fauna acuáticas.
- b- residuos sólidos; pulpa, mucílago y pergamino (ver esquema del fruto, Anexo N. 2). Los residuos son un medio favorable para

el desarrollo de la mosca común y de varios artrópodos.

La pulpa, que es el residuo que nos interesa en esta investigación, y que se conoce también como broza del café, representa un 40% del peso del café cereza. Esto equivale a decir que, de cada 100 kg de fruta de café se obtienen alrededor de 40 Kg de pulpa fresca (Alvarez, 1982).

En el año cafetalero 1980-81 se produjo en Costa Rica aproximadamente 175 mil toneladas de pulpa de café (Alvarez, 1982); en 1985 se informó que la producción nacional de café fue de 450.000 toneladas métricas, de las que se aprovecha escasamente un 15% (Hernández, 1985).

El problema más notorio que se presenta con la pulpa de café son las grandes cantidades que se producen en cada cosecha (Ver cuadro, Anexo N. 3), y la realidad es que se aprovecha en cantidades ínfimas, comparadas con las miles de toneladas producidas.

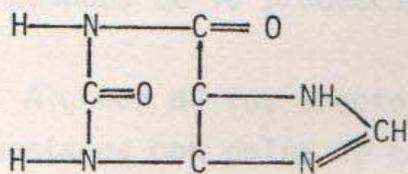
A la vez, el alto contenido de humedad, 76%, según la literatura, dificulta su manejo, almacenamiento o eliminación rápida y económica. Por ello, este residuo generalmente se acumula y se descompone, convirtiéndose en un contaminante.

Mora (1981) realizó una encuesta en 32 beneficios de café en Costa Rica y declara que la práctica más común es amontonar la pulpa de café y rociarla con insecticida y larvicida. Este procedimiento no es el más recomendable, ya que las moscas se adaptan a los pesticidas y lo único que se logra es contaminar el área con pulpa descompuesta y sustancias químicas.

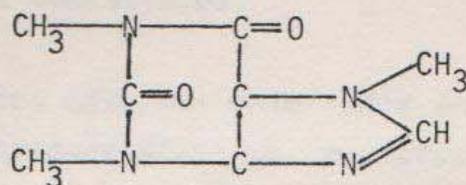
Por éstas y otras muchas razones, desde hace varios años, se han realizado estudios sobre posibles empleos de este material, ya que si se le utiliza adecuadamente, deja de ocupar espacio en los beneficios y de contaminar los ríos y el ambiente en general.

El mayor énfasis en las investigaciones realizadas hasta el momento ha sido la utilización de la pulpa de café como alimento animal, para aprovechar su composición química y su gran disponibilidad (Rodríguez, 1973; Rubio y Pineda, 1973; Murillo, et al., 1975; Morales, 1976; Bressani, 1979 y Mora, 1981).

Posteriormente se han planteado otras alternativas, una de ellas es la que se presenta en este trabajo, es decir, emplear la pulpa como sustrato en la producción de hongos comestibles, aún cuando de antemano se sabe que antes de utilizarla debe ser tratada para extraerle compuestos tóxicos como la cafeína. Este alcaloide, como lo declara Fisher (citado por Arriola, 1972), posee una constitución común de purina:  $C_5H_4N_4O_2$ . Se deriva de la purina denominada xantina, o sea, es un alcaloide del tipo purina metilada, cuya denominación química es: 1,3,7 Trimetilxantina (Arriola, 1972; Bressani, 1979; Von Borstel, 1983).



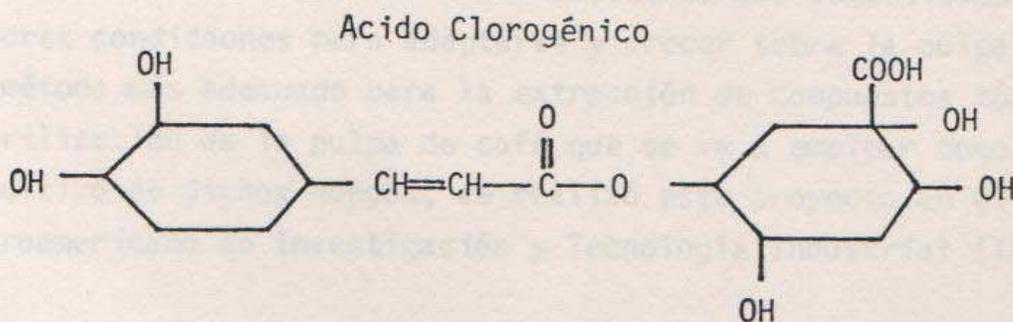
Xantina (purina)



Cafeína (1,3,7 Trimetilxantina)

La cafeína es moderadamente soluble en agua, aún así, también es hidrofóbica, aunque pasa fácilmente a través de las membranas biológicas, probablemente la mayor parte por difusión pasiva (Von Borstel, 1983).

Otros compuestos tóxicos existentes en la pulpa de café son los fenoles libres o monómeros, ácidos clorogénico, caféico y tánico y los fenoles poliméricos, es decir, taninos hidrolizables y los condensados (Bressani, 1979). Uno de los principales componentes de estos compuestos fenólicos, denominados polifenoles, es el ácido clorogénico que está formado por un radical de ácido caféico y uno de ácido quínico (Morales, 1976). Su fórmula es:



Con respecto a los polifenoles, el ácido clorogénico concretamente tiene una actividad antigénica y alergénica (Bariana y col., 1965; citado por Morales, 1976). La característica más importante de los taninos es probablemente su capacidad de ligar proteína, haciéndolas inaccesibles al organismo; también pueden actuar como inhibidores enzimáticos (Bressani, 1979).

Estos compuestos tóxicos no sólo afectan el desarrollo normal del micelio y del cuerpo fructífero del hongo, sino que influyen en una posible utilización de la mezcla de pulpa de café-micelio, como alimento animal, después de la producción de hongos comestibles.

Algunos de los efectos fisiológicos adversos observados en animales alimentados con pulpa de café son: lesiones dérmicas, ampollas en las patas, hemorragias, aumento de la excreción de orina, balance de nitrógeno bajo, nivel de glucosa sanguínea bajo, digestibilidad de la proteína baja, inhibición de la acción de la tiamina, irritación, nerviosismo y otros (Bressani, 1979).

Como los animales que se alimenten con pulpa de café, a corto o largo plazo pasarán a ser alimento humano, se debe tomar en cuenta qué efectos puede causar la cafeína, ya que ésta se acumula en los tejidos. Entre algunos de los efectos que provoca este alcaloide en el ser humano están: falta de sueño, estado de alerta, ansiedad apacible, estimulación respiratoria, efectos cardiovasculares, diuresis y aumento de la secreción gástrica, tensión muscular, convulsiones, disturbios cardiovasculares como la taquicardia y en altas concentraciones puede provocar la muerte (Von Borstel, 1983).

Con la finalidad de determinar cuáles hongos comestibles presentan las mejores condiciones para adaptarse y crecer sobre la pulpa, y obtener el método más adecuado para la extracción de compuestos tóxicos, y la esterilización de la pulpa de café que se va a emplear como sustrato en el cultivo de dichos hongos, se realizó este proyecto en el Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI),

con sede en Guatemala, y se completó en la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica.

Esta investigación se efectuó en tres etapas y tuvo una duración aproximada de 16 meses.

- 1- La falta de alimento de bajo costo en el mundo, incita a investigar la utilización de materiales de desechos vegetales y obtener de ellos nutrientes.
- 2- Conforme se extiende el cultivo del café, aumenta el volumen de paja producida por año. Se le debe buscar una utilización económica y rápida para evitar la contaminación ambiental.
- 3- Como no existen muchos estudios de producción de hongos comestibles que empleen la paja de café como sustrato, es necesario realizar ensayos con diferentes cepas para determinar cuál de ellas se adapta mejor.
- 4- La paja de café posee altos porcentajes de compuestos tóxicos como la cafeína y polifenoles. Estos pueden afectar la germinación del micelio micorrízico y la formación de los cuerpos fructíferos, por ello, se deben diseñar y perfeccionar los mejores tratamientos de extracción y esterilización.

### III. JUSTIFICACIONES

- 1- OBJETIVO GENERAL
- 1- La falta de alimento de bajo costo en el mundo, incita a investigar la utilización de materiales de desechos vegetales y obtener de ellos nutrimentos.
  - 2- Conforme se extiende el cultivo del café, aumenta el volumen de pulpa producida por año. Se le debe buscar una utilización productiva y rápida para evitar la contaminación ambiental.
  - 3- Como no existen muchos estudios de producción de hongos comestibles que empleen la pulpa de café como sustrato, es necesario realizar ensayos con diferentes cepas para determinar cuál de ellas se adapta mejor.
  - 4- La pulpa de café posee altos porcentajes de compuestos tóxicos como la cafeína y polifenoles. Estos pueden afectar la formación del micelio dicariótico y la formación de los cuerpos fructíferos, por ello, se deben detectar y perfeccionar los mejores tratamientos de extracción y esterilización.

## IV. OBJETIVOS

## 1- OBJETIVO GENERAL

Obtener el mejor tratamiento que se le debe aplicar a la pulpa de café, para liberarla de los compuestos tóxicos y para simplificar su estructura, antes de usarla como sustrato para el crecimiento de los hongos comestibles. A su vez, determinar cuál o cuáles cepas presentan mejores características que les permitan adaptarse y crecer en un sustrato hecho a base de pulpa de café.

*Corticium florentinum* Fr.

IMI 3001

*Pleurotus cornucopiae* (Favé ex Fr.) Gill.

IMI 2994

*Pleurotus flabellatus* (Berk. & Br.) Sacc.

8-39

*Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer

3526

## 2- OBJETIVOS ESPECIFICOS

*Volvariella volvacea* (Lévl. ex Fr.) Singer

IMI 3005

- a- Seleccionar las mejores condiciones para la preparación del inóculo en el laboratorio.

## 1. MEDIOS DE CULTIVO

- b- Determinar la concentración de cafeína que perjudica la formación del cuerpo fructífero del hongo.

## 1.1 Medio de cultivo para mantenimiento de cepas

Se utilizó papa, dextrosa y agar al 2%, (PDA). Cuando no se obtuvo PDA preparado por la industria, se elaboró (Anexo 4-4).

## 1.2 Medio de cultivo para ensayos con cafeína

Se formuló en base al medio usado en los ensayos anteriores, o sea PDA al 2%. A este medio se le adicionó diferentes concentraciones de cafeína (0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 y 0.40%). Se llevaron a cabo dos ensayos paralelos, en uno se agregó la cafeína antes y al otro después de autoclavar, para comprobar si este alcaloide no se degrada al esterilizar en autoclave el medio.

## 1.3 Medio selectivo para eliminar contaminación

Para contrarrestar el problema de contaminación, se utilizó el medio recomendado por Maloy (1974), a base de benomil pero modificado (Anexo # 5).

## 1.4 Sustratos

Los sustratos sobre los que se desarrollaron las cepas de hongos comestibles fueron:

- Grano de Sorgo (Incremento del inóculo)
- Pulpa de Café tratada

## 2. CONDICIONES DE CULTIVO EN LABORATORIO Y PREPARACION DEL INOCULO

### 2.1 Selección de las Cepas de Hongos

Con el propósito de obtener los hongos más adecuados, se realizó una escogencia entre las cepas de la colección del ICAITI. Esta pre-selección se basó en la velocidad de crecimiento sobre un medio de cultivo

(PDA), y se determinó trabajar en la fase I con los siguientes hongos: Coprinus fimentarius, Pleurotus cornucopiae, P. flabellatus y Volvariella volvacea. En la fase II del proyecto se decidió trabajar únicamente con: Pleurotus flabellatus, P. ostreatus y Volvariella volvacea, pues las otras dos cepas no dieron resultados satisfactorios. Para la prueba de crecimiento en un medio con cafeína, se utilizaron: Pleurotus flabellatus y Volvariella volvacea; además, se trabajó con una cepa proveniente de Alemania, del género Pleurotus sajor-caju.

Todo ensayo se realizó por duplicado; en Guatemala los trabajos de laboratorio se hicieron en una campana de flujo laminar, y en Costa Rica en un cuarto de siembra estéril. Todo ésto como medidas de prevención contra la contaminación por hongos del ambiente.

## 2.2 Mantenimiento de Cepas

Las cepas se mantuvieron en tubos de ensayo con PDA, a temperatura ambiente (20-22°C) y en presencia de luz natural.

Duplicados de cada hongo se mantuvieron en refrigeración.

## 2.3 Crecimiento micelial en cajas de Petri

Una vez que se desarrolló el micelio en los tubos de ensayo, se preparó más medio y se alistaron seis cajas de Petri por hongo, las cuales fueron inoculadas en el centro. Después se sellaron los bordes con cinta adhesiva, para prevenir la contaminación y pérdida de humedad en los cultivos que se incubaron a sus correspondientes temperaturas óptimas.

Para tener una idea de algunos de los requerimientos de los hongos con que se trabajó, se consultó la literatura y se obtuvieron los siguientes datos sobre temperatura y humedad (ver cuadro # 2).

Cuadro 2. Información sobre la temperatura óptima y el ámbito de humedad necesarias para los hongos con que se trabajó.

HONGOS	Temperatura óptima (°C)	Humedad (%)
Especies de <u>Pleurotus</u>	28-30	70-80
<u>Coprinus fimentarius</u>	35-40	80-90
<u>Volvariella volvacea</u>	30-35	70-80

Chang et al., 1978

#### 2.4 Determinación del tiempo de crecimiento micelial

Para determinar el tiempo (en días) que tardaban las cepas en crecer en el medio de cultivo PDA, se procedió a sembrar los hongos en cajas de Petri y se expusieron a diferentes condiciones ambientales.

##### 2.4.1 Ensayos a temperatura ambiente

Doce ensayos por hongo se colocaron a temperatura ambiente (20-22°C). La mitad de las cajas de esta prueba se pusieron en la oscuridad y la otra mitad en luz natural.

##### 2.4.2 Ensayos a temperatura controlada

Las seis cajas por cepa se inocularon y posteriormente se incubaron en la oscuridad a las temperaturas óptimas, según el hongo (Cuadro # 2).

##### 2.4.3 Medición del crecimiento micelial

A las cepas que presentaron mejor respuesta en su desarrollo micelial,

se les practicó un seguimiento del crecimiento vegetativo diariamente durante una semana. La medición se hizo con una regla graduada en centímetros.

### 2.5 Aumento del inóculo en PDA

Una vez determinados los parámetros y el tiempo requerido para el óptimo crecimiento del micelio en cajas de Petri, se procedió a aumentar el inóculo, para continuar la fase de crecimiento en grano de sorgo.

Se prepararon seis cajas de Petri con PDA por cepa de hongo, se inocularon e incubaron a sus temperaturas óptimas.

### 2.6 Incremento del inóculo en Sorgo

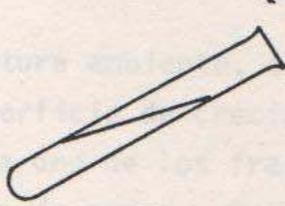
La fase de crecimiento en sorgo tiene como objetivo aumentar el inóculo y a la vez, contar con un material de fácil manejo a la hora de mezclarlo con la pulpa de café.

El sorgo debe ser lavado y secado en horno de aire forzado a 60-80°C, hasta obtener una humedad de 2-5% (determinada con una lámpara de Ohaus). El secado tiene la finalidad de poder almacenar el grano hasta que se le requiera, sin peligro de contaminación.

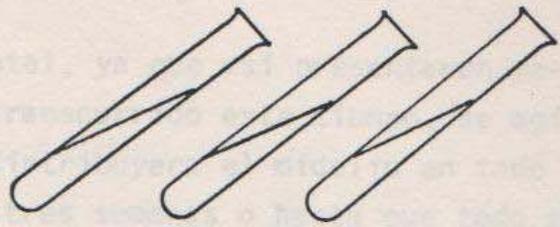
Cuando el micelio cubrió totalmente el medio de las cajas de Petri (métodos, sección 2.5), se procedió a preparar cinco frascos de (20 X 8.5 cm) con sorgo por cepa de hongo.

Se pesaron 225 gm de sorgo seco, más 4 gm de carbonato de calcio (que regula el pH) y se adicionó 180 ml de agua destilada por frasco, después se taparon con papel de aluminio y la tapadera metálica y se esterilizaron a 121°C durante 30 minutos. Al salir de la autoclave, se puso una tela sobre el borde de una mesa y allí se golpearon suavemente los frascos, para aflojar los granos.

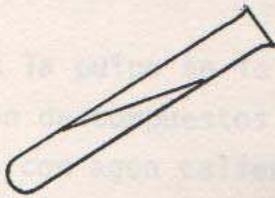
Se inocularon con 3 cm<sup>2</sup> del medio procedente de las cajas de Petri (métodos, sección 2.5). Luego se dejaron reposar durante cinco días a



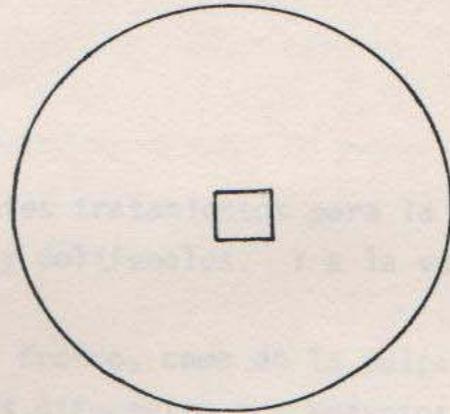
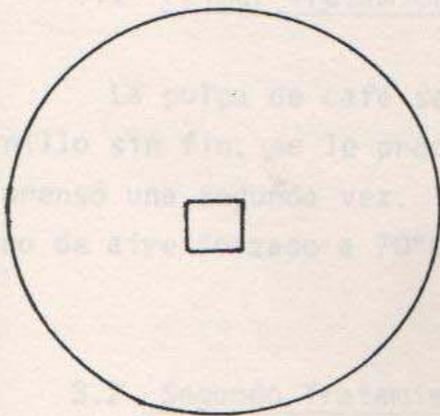
Tubo con PDA, inclinado



Replicación a más tubos con PDA



Tubo con micelio

Placa de Petri con  $2$  Agar. PDA, inoculada con 1 cm<sup>2</sup>

Placa de Petri con micelio

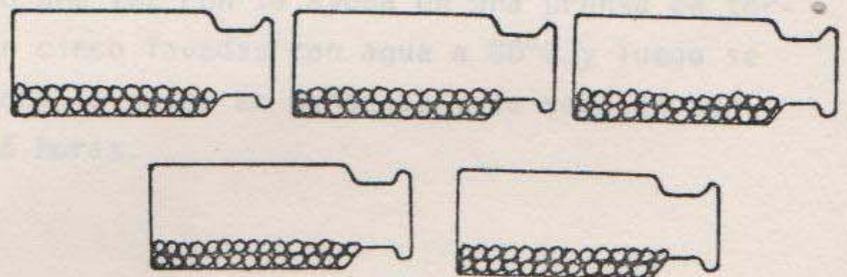
Frascos con 225 gm de sorgo, 4 gm de carbonato de calcio y 180 ml de agua destilada. Inoculados con 3 cm<sup>2</sup>

Fig. # 1

Esquema de la elaboración del inóculo

temperatura ambiente, en posición horizontal, ya que así presentaron mayor superficie de crecimiento. Una vez transcurrido este tiempo, se agitó cada uno de los frascos para que se distribuyera el micelio en todo el grano de sorgo. Se dejaron en reposo tres semanas o hasta que todo el sorgo estuviera invadido por el micelio (Figura # 1).

### 3. PREPARACION Y MANEJO DEL SUSTRATO

A la pulpa se le practicó tres diferentes tratamientos para la extracción de compuestos tóxicos como cafeína y polifenoles. Y a la vez las lavadas con agua caliente la esterilizaron.

Se tomaron muestras tanto del material fresco, como de la pulpa de café obtenida en cada uno de los pasos de los diferentes tratamientos para un análisis posterior.

#### 3.1 Primer Tratamiento

La pulpa de café se prensó una vez con la ayuda de una prensa de tornillo sin fin; se le practicaron cinco lavadas con agua a 80°C y luego se prensó una segunda vez. Se colocó la pulpa en bandejas y se secó en horno de aire forzado a 70°C por 16 horas.

#### 3.2 Segundo Tratamiento

Consistió en prensar la pulpa de café, después colocarla en un recipiente y lavarla sólo una vez con agua a 80°C, manteniéndola en agitación constante durante 30 min. Posteriormente se drenó, se prensó y se secó en horno.

### 3.3 Tercer Tratamiento

La pulpa de café fresca se depositó en bolsas plásticas de 24X36 cm, se cerraron y se les dejó ensilar durante tres semanas (ver definición de ensilaje, Anexo # 1). En este tiempo no se abrieron ni se movieron, a pesar de que se inflaron por la liberación de gases.

Para obtener el pH se escogió una bolsa al azar, se tomo la muestra y se apartó. El pH debe ser cercano a 4 o sea ácido, valor característico de la pulpa ensilada.

Al cumplirse el período de ensilaje, la pulpa de café se prensó, se lavó una vez con agitación (similar al II tratamiento, sección 3.2) y después se prensó por segunda vez. Se secó en horno.

### 3.4 Fumigación del cuarto de incubación

Cuatro días antes de preparar las bolsas con pulpa e inocularlas, se procedió a fumigar el cuarto en que se incubaron.

Para un cuarto de 2.5 X 2.0 m se colocaron 70 ml de agua y 70 ml de formaldehído al 38%. En una gaza dobe se colocaron 70 gm de permanganato de potasio. Una vez en el cuarto, se puso el beaker en el centro de él y se dejó caer la gaza dentro. Se cerró el cuarto por dos días, pues los vapores son tóxicos; luego se dejó ventilar por otros dos días.

### 3.5 Preparación de la Pulpa de Café en bolsas plásticas

Cuando el micelio había crecido totalmente sobre el sorgo, en los frascos (métodos, sección 2.6), se procedió a empacar la pulpa de café en bolsas plásticas de 24 X 36 cm.

#### 3.5.1 Pulpa del Primer Tratamiento (I Fase del Proyecto)

La pulpa del primer tratamiento (métodos, sección 3.1), que estaba

seca, se colocó en un recipiente y allí se le agregó suficiente agua. Luego se dejó drenar el excedente.

Se pesó 5 Kg de la pulpa húmeda para cada bolsa plástica.

### 3.5.2 Pulpa del Segundo y Tercer Tratamiento (II Fase del Proyecto)

En esta fase se varió el protocolo al agregar el agua medida, o sea, sólo la que absorba la pulpa que está seca. Para ello se tomó un kilo de pulpa seca y se le adicionó agua destilada, hasta obtener el volumenn requerido, sin excedentes. El volumen fue de 3 litros.

Para cada bolsa plástica, tanto del segundo como del tercer tratamiento (métodos, secciones 3.2 y 3.3), se pesó un kilo de pulpa seca, y se le agregó los 3 litros de agua destilada. Se obtuvo al final 4 kilos de pulpa húmeda por bolsa.

### 3.5.3 Ensayo con Urea

Con el fin de saber si la urea puede usarse como fuente de nitrógeno, ya que cuenta con 46% de nitrógeno (Bokenfohr, 1974), se hicieron ensayos en los que se agregó 20 gm de urea a los 3 litros de agua, con los cuales se humedeció la pulpa (sección 3.5.2).

Una vez listas las bolsas con la pulpa húmeda, se procedió a inocularlas. Se mezcló con la pulpa de cada bolsa el contenido de un frasco con sorgo y micelio (métodos, sección 2.6). Se cerraron las bolsas para permitir que se concentrara el bióxido de carbono ( $CO_2$ ), cuya concentración en la atmosfera circundante, influye directamente sobre el desarrollo vegetativo del hongo. Se incubaron los cultivos en la oscuridad a  $28^{\circ}C$ , con sistema de ventilación constante.

Cuando el bloque de pulpa estuvo totalmente cubierto por el micelio, más o menos a las 3 semanas, se abrieron las bolsas y se recortaron un

poco para dejar una mayor superficie expuesta para la fructificación. Se regó con agua destilada dos veces al día. En la parte inferior de las bolsas, se abrieron agujeros para que drenara el excedente de agua.

Solamente en la etapa de fructificación se les proporcionó luz a los cultivos. A unos, luz artificial, y a otros, luz natural.

#### 4. PRUEBA CON UN MEDIO AL QUE SE ADICIONA CAFEINA

En uno de los ensayos de cultivo de hongos comestibles sobre pulpa de café (II tratamiento, métodos sección 3.2), se presentó malformación de los cuerpos fructíferos. Martínez, et al., 1984, comentan que se sospecha que la cafeína puede actuar como agente mutagénico, por lo tanto se intentó determinar a qué concentración este alcaloide inducía la formación de carpóforos amorfos.

Para ello se preparó medio de cultivo PDA y se hicieron ensayos en los que se adicionaron diferentes concentraciones de cafeína (métodos, sección 1.2). Se dejaron cultivos testigos libres del alcaloide.

#### 5. METODOS ANALITICOS

Con el fin de obtener datos de la utilización del sustrato por el hongo, se practicaron análisis a la pulpa de café. Otros fueron realizados para determinar cuál tratamiento era más recomendable para eliminar los compuestos tóxicos.

La composición química de la pulpa de café y las variantes presentadas, según los tratamientos aplicados, se determinaron de acuerdo a:

##### 5.1 Contenido de Humedad

Se pesaron 5 gm de la muestra en una cápsula de aluminio (previa-

mente tarada y secada por 30 min a 105°C), y se colocó en un horno a 105°C por 24 horas. Después de transcurrido este tiempo, se sacó la cápsula y se colocó en una desecadora mientras enfriaba. El contenido de humedad se calculó por diferencia de peso de la muestra antes y después del secado, al llevar la muestra a peso constante.

- 5.2 Nitrógeno Total fue determinado por el Método Micro Kjeldahl, (Horwitz, 1975).
- 5.3 Polifenoles fueron detectados por el Método de los Taninos, (Horwitz, 1975).
- 5.4 Cafeína se analizó por el Método Isher-Snell modificado; (Arriola, 1972).
- 5.5 El pH se calculó empleando una relación de uno a diez, o sea, se pesó un gm de la muestra y se le agregó 10 ml de agua destilada. Se homogenizó, filtró y se hizo la lectura del pH, con la ayuda de un electrodo.
- 5.6 Celulosa, Lignina y Hemicelulosa sus análisis se basaron en los procedimientos utilizados por Goering y Van Soest., s.f.
- 5.7 Digestibilidad "in vitro" para su análisis se siguieron las técnicas de Adegbola, 1977; Dowman y Collins, 1982.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSION

## 1. PREPARACION DEL INOCULO

Inicialmente, en la pre-selección, se escogieron los siguientes hongos: Coprinus fimentarius, Pleurotus cornucopiae, P. flabellatus, P. sajor-caju, P. sapidus y Volvariella volvacea. El micelio de cada uno fue repicado a tubos con medio de cultivo fresco.

Se observó que P. sajor-caju y P. sapidus presentaban un desarrollo muy pobre, casi nulo; por lo que se adicionó nuevamente medio de cultivo líquido (caldo), para proporcionarles nutrimentos y tratar de revivir las cepas. De las dos, solo creció un poco P. sapidus, pero al traspasarlo a caja de Petri con medio, se contaminó. Debido a la gran contaminación presente en todos los cultivos, se tomó la medida de sellar las cajas de Petri con cinta adhesiva, y evitar así también la pérdida de humedad al incubar las cajas de Petri y el envejecimiento del micelio.

Del grupo de seis cepas, sólo se trabajó con cuatro (I Fase del proyecto), ya que P. sajor-caju, y P. sapidus no se desarrollaron.

Al mes de sembrados los tubos, se observó que Pleurotus flabellatus, P. cornucopiae y Coprinus fimentarius presentaban buen crecimiento. Sólo Volvariella volvacea mostraba un desarrollo menor, ya que este hongo necesitaba incubación (35°C), como fue demostrado posteriormente.

Para obtener información sobre los parámetros de crecimiento de los hongos empleados, se realizaron varios ensayos. Los cultivos fueron colocados a diferentes condiciones de temperatura y en presencia o ausencia de luz.

Pleurotus cornucopiae y P. flabellatus se incubaron a 30°C, Coprinus fimentarius y Volvariella volvacea a 35 °C.

Los cultivos del ensayo a temperatura ambiente (20-22°C) (métodos, sección 2.4), se dividieron en dos: unos con luz natural y otros en la oscuridad (ver cuadro # 3).

Cuadro 3. Período (en días) que tardan las cepas en obtener un crecimiento de 3 cm ó más (I Fase del proyecto).

HONGOS	TEMPERATURA		
	Con luz (Días)	Ambiente En oscuridad (Días)	Optima Oscuridad (Días)
<u>Pleurotus cornucopiae</u>	6	6	4
<u>Pleurotus flabellatus</u>	4	6	3
<u>Coprinus fimentarius</u>	8	-	3
<u>Volvariella volvacea</u>	9	6	3

Comparado con los otros hongos Pleurotus flabellatus pudo alcanzar un buen desarrollo bajo las tres condiciones. Creció 3 cm en 4 días a temperatura ambiente (con luz), y al estar en la oscuridad a temperatura óptima el tiempo disminuyó a 3 días.

El hongo que tardó más en desarrollarse, bajo condiciones ambientales fue Volvariella volvacea. El tiempo se redujo de 9 a 3 días cuando se colocó en temperatura controlada y en la oscuridad.

En la segunda fase del proyecto se trabajó con Pleurotus flabellatus, P. ostreatus y Volvariella volvacea.

En esta etapa de producción del inóculo se realizó otro seguimiento del crecimiento del micelio, empleando el mismo medio de cultivo (PDA) y temperatura controlada (30 y 35°C).

El desarrollo micelial se midió en cm, diariamente, durante 8 días consecutivos (ver cuadro # 4).

Cuadro 4. Crecimiento de Pleurotus flabellatus, P. ostreatus y Volvariella volvacea en PDA, por una semana (II Fase del proyecto).

HONGOS	Días							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
<u>Pleurotus flabellatus</u> *	1.0	1.5	2.8	4.0	5.3	6.7	8.0	9.5
<u>Pleurotus ostreatus</u>	1.0	1.8	2.8	3.0	3.5	4.1	4.7	6.0
<u>Volvariella volvacea</u>	1.0	2.4	3.9	5.0	7.0	7.6	8.6	8.6

\* crecimiento en cm

En el cuadro N. 4 se observa que la especie que creció más rápido fue Pleurotus flabellatus, el cual al octavo día contaba con un crecimiento micelial de 9.5 cm. Estos datos coinciden con los obtenidos en el cuadro N. 3.

Generalmente P. ostreatus crece bien en medios de cultivo, pero los datos del cuadro anterior contradicen esto. Una posible explicación a estos resultados es que la cepa que se utilizó era muy vieja y había perdido viabilidad. Se decidió emplear este hongo ya que Martínez et al. (1984) lo reportaron como una especie que crece bien sobre pulpa de café. No se desecha la idea de que el micelio a pesar de que creció un poco, puede haber degenerado por falta de nutrimentos y de allí los resultados mediocres.

## 2. ETAPA DE CRECIMIENTO SOBRE SORGO

Para inocular la pulpa de café se necesita abundante micelio, por lo que no es rentable económicamente aumentar el inóculo con base en PDA. Para incrementarlo se utilizó sorgo como sustrato. Este grano es rico en nutrimentos (Platt et al., 1981), de bajo costo y con una ventaja adicional: al crecer el micelio sobre cada uno de los granos, facilita posteriormente la distribución del inóculo en la pulpa de café.

Se llevó a cabo un ensayo en el cuál se observó el efecto de la temperatura en el desarrollo micelial y se midió el crecimiento fungal so-

bre el sorgo. La medición se hizo en cm, a los cinco días de inoculado el grano, justo antes de agitar el contenido de los frascos para que se distribuyeran los granos con micelio.

Cuadro 5. Crecimiento micelial (en cm), medido a los 5 días de inoculado el sorgo.

HONGOS	Desarrollo micelial en cm	
	Temperatura ambiente	Temperatura óptima
<u>Pleurotus cornucopiae</u>	-	5.5
<u>Pleurotus flabellatus</u>	6.0	7.5
<u>Coprinus fimentarius</u>	3.0	3.0
<u>Volvariella volvacea</u>	2.0	12.0

Se comprobó una vez más, la influencia de la temperatura controlada, ya que el mejor crecimiento se obtuvo en los frascos con sorgo que se sometieron a incubación a sus respectivas temperaturas óptimas. Pudo observarse que Pleurotus cornucopiae y Volvariella volvacea requieren temperaturas controladas para su óptimo desarrollo. Vale la pena resaltar que V. volvacea a temperatura ambiente solo creció 2 cm, mientras que en incubadora a 35°C, se logró un desarrollo de 12 cm.

Pleurotus flabellatus y Coprinus fimentarius mostraron poca variación en su crecimiento en ambos ensayos. Esto es importante, pues se puede optar por trabajar con la cepa que necesite menos condiciones controladas, y evitar gastos de energía eléctrica.

El micelio de Pleurotus flabellatus que creció sobre sorgo, pudo ser utilizado aún después de dos meses de inoculado, no así el de otros hongos, que mostraron características de envejecimiento.

El micelio de Volvariella volvacea que creció sobre el sorgo, debió utilizarse antes de las tres semanas posteriores a la inoculación, pues si se dejaba más tiempo, ya no se producía micelio, sino que se reproducía asexualmente dando clamidósporas rojizas (definición, Anexo # 1).

### 3. PREPARACION DEL SUSTRATO

Hay factores que influyen directamente sobre el desarrollo y fructificación de los hongos; algunos de ellos son: estructura del sustrato, composición, permeabilidad y pH. Por eso se decidió analizar la pulpa de café, para contar con información sobre sus características y componentes.

Para facilitar el manejo de las muestras y sus datos al ser analizadas, se empleó la siguiente simbología:

- PF: pulpa fresca
- PP: pulpa prensada
- PL: pulpa lavada
- PE: pulpa ensilada
- PM: pulpa con micelio del hongo

#### 3.1 Contenido de Humedad

Hay dos factores climáticos que influyen en el asentamiento y desarrollo de un hongo: la temperatura y la humedad (De Diego, 1979). Como se contaba con datos sobre las temperaturas que beneficiaban a las cepas con que se iba a trabajar, la investigación se centró, en obtener los porcentajes de humedad de la pulpa durante las diferentes etapas de su procesamiento y utilización como sustrato. El contenido de humedad es un factor de suma importancia por sí solo, y, además, influye en la temperatura que mantendrá el sustrato en el cual se difunde el micelio (ver cuadro # 6).

Cuadro 6. Porcentajes de humedad de las diferentes muestras de pulpa de café y pulpa con micelio.

Fase	Muestra	Porcentaje de Humedad (%)
I Fase	PF	88.26
	PP	84.31
	PL (3 veces)	85.90
	PL (5 veces)	85.41
	PM de <u>Pleurotus flabellatus</u>	73.15
	PM de <u>P. flabellatus</u> después de fructificar	72.60
	PM de <u>Volvariella volvacea</u>	74.20
	PM de <u>Coprinus fimentarius</u>	76.47
II Fase	PM de <u>Pleurotus cornucopiae</u>	76.20
	PF	87.18
	PP	81.78
	PL	89.74
	PP (II vez)	80.20
	PE	95.72
	PE y tratada	84.56

De los datos del cuadro N. 6, se deduce que la pulpa fresca posee un promedio de 87-88% de humedad y al pasarla por la prensa de tornillo sin fin, pierde más o menos un 4-6% de esta humedad. Este análisis permitió saber si la pulpa contaba con la humedad necesaria para el desarrollo de los hongos.

Las especies del género Pleurotus requieren 70-80% de humedad (Chang y Hayes, 1978). El micelio de P. cornucopiae creció en la pulpa con 76.20% de humedad y el de P. flabellatus a 73.15%. Al fructificar esta especie, la pulpa tenía un porcentaje de 72.60%. Coprinus fimentarius necesita una humedad entre 80-90%, sin embargo, su micelio se desarrolló en el sustrato con 76.47%. La cepa de Volvariella volvacea precisa un porcentaje de 70-80% de humedad (Chang y Hayes, 1978); su micelio creció con 74.20%.

Los cultivos se regaron dos veces al día, ya que la parte superior del sustrato se secaba rápidamente y esto perjudica al micelio. Se optó por hacer orificios para que drenara el exceso de agua depositado en el fondo de las bolsas (métodos, sección 3.6).

La información de la humedad es importante al calcular los datos en base seca de otros análisis practicados.

### 3.2 Esterilización del sustrato

La esterilización del sustrato es necesaria para combatir hongos dañinos como Trichoderma spp., Mucor spp. y Penicillium spp.; insectos como los dípteros; ácaros y nemátodos.

Los nemátodos destruyen el micelio, unas veces mediante la punción y extracción de la sustancia interna de las hifas y otras por la secreción de toxinas. Los ácaros provocan picaduras sobre los cuerpos fructíferos, que facilitan la entrada de bacterias ó detienen el desarrollo del carpóforo al cortar las hifas en la base del estípote del hongo (definición, Anexo # 1). Estos organismos pueden morir si se les somete a tratamientos con temperaturas superiores a los 50°C (Leal, s.f.; Francia, s.f.)

La esterilización obtenida en la primera fase del proyecto, en la cual se le practicaron cinco lavadas a la pulpa con agua a 80°C, resultó muy efectiva, ya que eliminó los microorganismos. En cambio la esterilización aplicada en la segunda fase, o sea, lavado de la pulpa sólo una vez y con agitación durante 30 min, fue deficiente, ya que tanto en el sustrato como en las fructificaciones, se presentaron nemátodos.

El lavado, además de esterilizar, extrae materiales que pueden servir de nutrimentos a organismos competidores de los hongos cultivados.

### 3.3 Extracción de cafeína y polifenoles

Las lavadas practicadas al sustrato, no sólo esterilizan, sino que

extraen cafeína y polifenoles que están presentes en la pulpa.

Generalmente los porcentajes de estos compuestos son altos, aunque se pueden presentar variantes, debidas a la variedad del café y a las prácticas agrícolas.

### 3.3.1 Extracción de la cafeína

La extracción de este alcaloide en el tratamiento I aplicado a la pulpa de café (métodos, sección 3.1), permitió que de 0.42% de concentración de cafeína se bajara a 0.03%. En el tratamiento II (métodos, sección 3.2), de 0.71% disminuyó a 0.28%. Y en el tratamiento III (métodos, sección 3.3), de 0.80% se obtuvo una concentración final de 0.18% (cuadro # 7).

Cuadro 7. Porcentajes de concentración y pérdida porcentual de cafeína en la pulpa fresca y tratada.

Tratamiento	Muestra	Porcentaje de concentración (%)	Pérdida porcentual (%)
I	PF	0.42	
	PP	0.38	92.86
	PL (5 veces)	0.03	
II	PF	0.71	
	PP	0.61	60.56
	PL (una vez)	0.26	
III	PP (por II vez)	0.28	
	PE	0.80	
	PE y tratada	0.18	77.50

Con el fin de comparar la efectividad de los tratamientos, los datos de concentración de cafeína se refirieron a una presentación en porcentajes (pérdida porcentual). De esta información se deduce que el tratamiento más eficaz para la extracción de cafeína fue el primer tratamiento, en el cuál se lavó cinco veces la pulpa con agua a 80°C y se extrajo

un 92.86% de cafeína. La pulpa de este ensayo al usarla como sustrato permitió la formación de fructificaciones normales de Pleurotus flabellatus.

En cambio, en el segundo tratamiento en el que se lavó solo una vez con agitación constante por 30 min, se extrajo un 60.56% de cafeína. A pesar de que la pérdida porcentual es mayor al 50%, la concentración residual se considera alta, ya que este alcaloide puede actuar como agente mutagénico. Actualmente se está evaluando el efecto de la cafeína en la cantidad y calidad de las fructificaciones, así como en la dicariorización del micelio (Martínez, et al., 1984). La influencia del compuesto se comprobó en los cultivos sobre la pulpa de café y en la prueba en la que se adicionó este alcaloide a un medio de cultivo inoculado posteriormente (resultados, sección 3.3.2).

En el tercer tratamiento la pérdida porcentual fue un poco mayor que en el segundo tratamiento. El ensilaje y el lavado redujeron considerablemente la cafeína a 77.50%. La extracción daría mejores resultados, si después de ensilarla se le practicaran cinco lavadas en vez de una.

La concentración de cafeína no se modificó con el crecimiento micelial ni con la fructificación de los hongos sobre la pulpa (Cuadro # 8).

Cuadro 8. Porcentajes de concentración de cafeína en la pulpa de café, después del desarrollo vegetativo y fructificación de los hongos.

MUESTRA	Porcentaje de concentración (%)
PM de <u>Pleurotus flabellatus</u>	0.06
PM de <u>P. flabellatus</u> después de fructificar	0.07
PM de <u>Volvariella volvacea</u>	0.03
PM de <u>Coprinus fimentarius</u>	0.05
PM de <u>Pleurotus cornucopiae</u>	0.05

### 3.3.2 Prueba del medio de cultivo con cafeína

Los cultivos de hongos en los que se utilizó como sustrato pulpa de café del tratamiento II (métodos, sección 3.2), produjeron carpóforos amorfos. Al analizar las posibles causas, se concluyó que el único factor que difería con respecto a los otros cultivos (tratamientos I y III; métodos, secciones 3.1 y 3.3), fue el porcentaje de cafeína (Cuadro # 7).

Esto motivó a realizar una prueba de crecimiento de las cepas en un medio de cultivo con diferentes porcentajes del alcaloide (métodos, sección 4), y así determinar la concentración que influía en el desarrollo del micelio y en la formación del cuerpo fructífero.

Antes de este ensayo y durante él se presentó mucha contaminación con levaduras, bacterias y posteriormente con Penicillium spp. Para purificar las cepas se utilizó agar-malta con benomil (medio recomendado por Maloy, 1974). Para los hongos empleados, este medio resultó ser deficiente en nutrimentos, lo que se tradujo en un retardo del desarrollo micelial. Se optó por modificarlo (ver Anexo # 5). El medio modificado sí permitió un buen crecimiento y después de varios repiques se eliminó la contaminación.

La cafeína no se degrada al esterilizar en autoclave el medio, esto se comprobó con los ensayos paralelos (métodos, sección 1.2), los que dieron resultados similares.

Los cultivos testigos (medio sin cafeína), mantenidos a temperatura ambiente o controlada (28°C), presentaron un crecimiento normal de 4-5 cm de diámetro, a los cinco días de inoculados. Uno ó dos días después fructificaron Pleurotus flabellatus y P. sajor-caju, pero Volvariella volvacea no fructificó. En los cultivos sobre pulpa de café del tratamiento I (con 0.03% de cafeína), las fructificaciones fueron normales.

En los ensayos con 0.10% de cafeína, los micelios crecieron en forma parecida a los de los cultivos testigos, ya que a bajas concentraciones los hongos pueden metabolizar cualquier compuesto que contenga carbono y producir material celular (Ainsworth, 1965, 68; en Morales, 1976).

Los cultivos con 0.15% y 0.20% de cafeína se desarrollaron pobre y lentamente, pues al aumentar los porcentajes se retardó y dificultó la

asimilación del alcaloide, resultado de la demetilación progresiva del grupo purina de la cafeína (Schwimmer y Kurtzman, 1972; en Morales, 1976). (Ver diagrama de la estructura de la cafeína, Pág. 13).

En los cultivos sobre pulpa de café, del tratamiento III (pulpa ensilada), el sustrato tenía 0.18% de cafeína, en él la fase de fructificación fue lenta, pero se produjeron cuerpos fructíferos normales. En cambio en los cultivos que se utilizó pulpa del tratamiento II, que contenía 0.28% de cafeína se dio malformación de los carpóforos.

En la prueba de laboratorio, los cultivos que contaban con una concentración a partir de 0.25% hasta 0.40% de cafeína, no se observó crecimiento, aún después de mes y medio de inoculados los medios. O sea que la concentración del alcaloide que detiene el crecimiento del micelio e induce malformación del carpóforo está de 0.25% en adelante.

Estos resultados se deben a que la cafeína provoca rupturas cromosomales e inhibe la citocinesis (división celular) al bloquear la formación de la placa celular. Esta droga no altera la producción ni la acumulación de las vesículas de Golgi (que contienen los precursores de la placa celular), pero impide su ordenación o arreglo (López *et al.*, 1966; Giménez *et al.*, 1980; López *et al.*, 1982).

Al inhibirse la citocinesis se demora o elimina la producción de nuevas células, por lo que el micelio no puede crecer ni desarrollarse, y en caso de acrecentarse lo hace irregularmente, lo que explica la deformación de los cuerpos fructíferos en los cultivos con pulpa del tratamiento II.

### 3.3.3 Extracción de Polifenoles

Se obtuvieron mejores resultados en la extracción de la cafeína que en la de polifenoles. El primer tratamiento extrajo 92.86% de cafeína y tan solo 55.83% de polifenoles (Ver cuadros # 7 y 9).

Los dos análisis coinciden en señalar el procedimiento más efectivo para la extracción de estos compuestos tóxicos. La mayor pérdida porcentual de polifenoles se presentó con el primer tratamiento, que extrajo, como se anotó antes, 55.83%. El que resultó menos eficaz, fue el segundo tratamiento que dio una pérdida porcentual de 45.86% de polifenoles. (Cuadro # 9).

Cuadro 9. Porcentajes de concentración y pérdida porcentual de los polifenoles, obtenidos mediante 3 diferentes tratamientos a la pulpa de café.

Tratamiento	Muestra	Porcentaje de concentración (%)	Pérdida porcentual (%)
I	PF	1.63	
	PP	1.38	55.83
	PL (5 veces)	0.72	
II	PF	1.33	
	PP	1.05	45.86
	PL (una vez)	0.98	
	PP (por II vez)	0.72	
III	PE	1.94	
	PE y tratada	1.03	46.91

El desarrollo del micelio y la formación de los carpóforos afectaron la concentración de polifenoles existentes en la pulpa de café. (Ver cuadros # 9 y 10).

La pulpa y las cepas que se analizaron corresponden a la primera fase del proyecto, ya que éstos fueron observados y analizados. Los demás no se pudieron estudiar en su totalidad, por falta de tiempo.

Cuadro 10. Porcentajes de concentración de polifenoles en la pulpa de café, después del desarrollo micelial y fructificación de los hongos.

MUESTRA	Porcentaje de concentración (%)
PM de <u>Pleurotus flabellatus</u>	0.56
PM de <u>P. flabellatus</u> después de fructificar	0.29
PM de <u>Volvariella volvacea</u>	0.67
PM de <u>Coprinus fimentarius</u>	0.34
PM de <u>Pleurotus cornucopiae</u>	0.52

Como se observa en el cuadro # 8, la pulpa de café (del I tratamiento) después de ser tratada, quedó con 0.72% de concentración de polifenoles. Al consultar el cuadro # 9 se nota que al crecer los micelios la concentración de 0.72% pasa a 0.56% con el desarrollo del micelio de Pleurotus flabellatus y al fructificar éste se reduce aún más, hasta 0.29%.

En las otras tres cepas, la concentración de polifenoles también baja. Esto se puede deber a que el hongo emplea los polifenoles como fuente de carbono (Ainsworth, 1965, 68; en Morales, 1976), o que los descompone, por lo que no son detectados al analizarlos.

### 3.4 El Factor pH

Los tratamientos de lavado-extracción y esterilización no alteran el pH de la pulpa. Pero si lo hacen el ensilaje y el crecimiento de los hongos.

#### 3.4.1 Relación del pH con el ensilaje

El pH de la pulpa fresca fue de 5.6, al ensilarla por tres semanas, el valor del pH bajó a 4.4, debido a que la pulpa al fermentarse se torna ácida (ver definición de ensilaje, Anexo # 1).

El pH, junto con el contenido de ácidos, son dos factores que influyen en la calidad de un ensilado. La American Dairy Science Association da algunas normas para estimar la calidad de un ensilado. En lo que respecta al pH, un ensilado "excelente" debe tener un valor entre 3.5 y 4.2, uno "bueno" entre 4.2 y 4.5 y uno "regular" un pH mayor de 4.8 (Bolton, 1962, en Rodríguez, 1973; Watson y Smith, 1965, en Murillo, 1979).

Si nos basamos en estos datos, la pulpa ensilada obtenida después de tres semanas, fue de buena calidad, ya que su pH fue de 4.4 y la literatura da 4.3 o un ámbito de 4.2 a 4.5.

Cuadro 11. Valores del pH de la pulpa de café fresca, tratada y con micelio de Pleurotus flabellatus.

MUESTRA	pH
PF	5.6
PL y PP	5.8
PE	4.4
PM de hongos amorfos de <u>Pleurotus flabellatus</u>	6.8
PE con micelio de <u>P. flabellatus</u>	6.7

### 3.4.2 Influencia del pH en el desarrollo de los hongos

Este factor es determinante para la selectividad del sustrato. La mayoría de los hongos se desarrollan en sustratos con valores de pH que oscilan entre 4 y 6, o sea, ligeramente ácidos. Pero ésta no es una regla general (De Diego, 1979)

El pH óptimo para el crecimiento de las especies de Pleurotus está entre 5-6 (Chang y Hayes, 1978), pero si el sustrato presenta un pH diferente, el micelio del hongo generalmente se encarga de modificarlo a su conveniencia (Burnett, 1976, en Zadrazil, 1983). Los datos del cuadro # 10 demuestran esto, ya que la pulpa ensilada tenía un pH de 4.4 y una vez que creció el micelio de Pleurotus flabellatus cambió a 6.7.

## 4. DESARROLLO DEL MICELIO SOBRE LA PULPA DE CAFE

El hongo que presentó un desarrollo más rápido fue Pleurotus flabellatus; al cuarto día de inoculada la pulpa ya se observaba crecimiento micelial. Esto se puede deber a que es la cepa que requiere menos condiciones controladas para su desarrollo. Las otras cepas, Pleurotus cornucopiae, P. ostreatus, Coprinus fimentarius y Volvariella volvacea co-

menzaron a mostrar crecimiento a los 5 o 6 días.

El micelio de los hongos comienza a crecer en forma de pequeños focos que tienen como núcleo los granos de sorgo inoculados previamente y dispersos por todo el sustrato durante la inoculación.

La oscuridad es un factor de importancia durante la incubación de Volvariella volvacea y Coprinus fimentarius. Para verificar su influencia en los cultivos sobre pulpa de café, se cubrió con papel aluminio una bolsa con cultivo de cada uno de estos hongos. La respuesta fue un incremento mayor en el desarrollo micelial que el observado en el resto de los cultivos de las mismas cepas.

Después de tres semanas, más o menos, el micelio ya había invadido el sustrato y se abrieron las bolsas, pues la concentración de CO<sub>2</sub> favorece el desarrollo del micelio, pero influye negativamente sobre el proceso de fructificación (Zadrazil, comunicación personal, 1984).

En esta etapa se debe tener mayor cuidado al manejar y regar los cultivos, ya que es durante este período cuando se presentan más problemas de contaminación. Los géneros que pueden ocasionar daños a los cultivos de hongos comestibles son: Trichoderma spp., Fusarium spp., Mucor spp., Penicillium spp. y Sclerotinium spp. (Kurtzman y Zadrazil, 1982).

En algunos de los ensayos se desarrollaron mohos verdes, y se identificó como organismo causante a Trichoderma viride Pers. y Penicillium spp.

Las bolsas contaminadas se sacaron del cuarto de incubación y se eliminaron. Sólo unas cuantas que presentaban poca contaminación se dejaron en observación para verificar la respuesta del hongo. En estos casos el micelio no se desarrolló normalmente, más bien se detuvo y presentó características de senescencia y ninguno llegó a fructificar.

En los cultivos puros el micelio creció sobre la pulpa formando un bloque compacto, se recortaron los bordes de las bolsas que los contenían. Las bolsas no se eliminaron totalmente, pues si se hacía, el micelio se secaba rápidamente y se retrasaba o detenía la fase de fructificación, ya que los hongos están constituidos en un 90% de agua.

Por otra parte, el exceso de agua que se acumuló en la parte inferior de la bolsa, se drenó, ya que de lo contrario se formaba una área anaeróbica como consecuencia de los pocos espacios libres y de la dificultad de intercambio de gases. En esta zona no crece o profundiza el micelio, pues éste necesita oxígeno. El promedio de penetración del micelio en el sustrato fue de 10-15 cm.

#### 4.1 Ensayo con Urea

En los ensayos en los que se adicionó urea como posible fuente de nitrógeno, se observó un desarrollo micelial pobre y ningún cultivo produjo fructificaciones. Zadrazil recomienda utilizar nitrato de amonio (comunicación personal, 1984). Al adicionar el nitrato de amonio se aumenta la descomposición de la materia orgánica del sustrato, con lo que se favorece el crecimiento del hongo (Zadrazil, 1980; Zadrazil y Brunnert, 1980).

### 5. FRUCTIFICACIONES

Los hongos, por ser heterótrofos, no requieren luz para su crecimiento micelial, pero sí la necesitan en su fase de fructificación.

En la práctica se notó que la luz acelera la formación de los cuerpos fructíferos. Los ensayos colocados en luz artificial directa (luz a 50 cm sobre los estantes con cultivos) crecieron vertiginosamente, pero se resecaron. En cambio, los que estaban en presencia de luz natural, se desarrollaron un poco más lentamente, pero eran más carnosos.

Pleurotus cornucopiae y Coprinus fimentarius mostraron durante todo su cultivo un micelio escaso que no llegó a cubrir la pulpa por completo y no fructificaron. En los cultivos de laboratorio, P. cornucopiae produjo tinción del micelio y del medio. En comunicación personal, Zadrazil, 1984, declaró que los hongos que presentan esta característica, generalmente han mutado y no son aptos para cultivos, pues no llegan a fructificar.

Volvariella volvacea presentó un crecimiento micelial vigoroso, pero la composición del sustrato debió afectarle pues no fructificó. Generalmente crece sobre paja de arroz o desperdicios de algodón y fructifica después de 10 a 14 días de inoculado el sustrato (Chang, 1978, en Farr, 1983; Farr, 1983).

Pleurotus ostreatus creció muy bien y formó primordios de 2 cm, pero éstos detuvieron su crecimiento. Se supone que la cepa era muy vieja y además estaba degenerada por múltiples traspasos y largos períodos con pocos nutrimentos.

El único género que dio cuerpos fructíferos bien desarrollados fue Pleurotus flabellatus, con una humedad en la pulpa de 72.60%. La literatura da un ámbito de 70-80% para las especies de Pleurotus (Chang et al., 1978).

En la primera fase del proyecto, Pleurotus flabellatus creció sobre la pulpa esterilizada y tratada con cinco lavadas. Tardó en fructificar un mes y 16 días y produjo, más o menos, 15 hongos por bloque de pulpa.

En la segunda etapa, esta especie fructificó en la pulpa ensilada, lavada una vez y sin urea. Este tratamiento permitió que la estructura de la pulpa se simplificara, lo que facilitó la colonización hifal y la extracción de nutrimentos requeridos por los hongos. El crecimiento duró un mes y 19 días, en esta cosecha se obtuvieron sólo tres fructificaciones, 15 días después, en la segunda cosecha, se produjeron 65 fructificaciones.

La explicación de la tardanza (3 días de diferencia con el ensayo anterior) podría ser que la pulpa del I tratamiento (métodos, sección 3.1), después de tratada, quedó con 0.03% de cafeína. En cambio, la pulpa ensilada (métodos, sección 3.3) quedó con 0.18% (Cuadro # 7). Durante la prueba del cultivo de hongos en un medio con cafeína, se observó que este alcaloide en bajas concentraciones no afecta el desarrollo micelial, pero después de 0.15%, el micelio crece más lentamente que los testigos. A partir de 0.25% no se desarrolla (resultados, sección 3.3.2).

## 6. FUENTES DE CARBONO

Los hongos que se utilizan en este proyecto, en su mayoría, se nutren de sustratos ricos en celulosa, lignina y hemicelulosa. Pleurotus spp. es fácilmente cultivado y requiere muy poco o ningún suplemento de nutrimentos cuando se utiliza una fuente natural celulósica (Morales, 1982). Estos compuestos además de ser nutrimento para los hongos comestibles, podrían ser bien digeridos y utilizados como fuente de energía por rumiantes que se alimenten con la mezcla de pulpa-micelio, después de la producción de hongos. Por ello se determinó analizar el sustrato antes y después del crecimiento y fructificación de Pleurotus flabellatus. El análisis se realizó por el método conocido como "Van Soest" ó Método Detergente de Análisis. Con él se analiza la fibra de la pulpa (Rubio y Pineda, 1973; Goering y Van Soest, s.f.).

Cuadro 12. Contenidos de polímeros naturales en la pulpa de café, antes y después de crecer Pleurotus flabellatus.

MUESTRA	Celulosa (%)	Lignina (%)	Hemicelulosa (%)
PP	22.51	29.05	8.82
PL (5 veces)	29.32	27.08	14.97
PM de <u>P. flabellatus</u>	24.41	16.58	15.40
PE (*)	19.40	20.50	3.00

(\*) Murillo, 1979

Los porcentajes de celulosa 22.51% y hemicelulosa 8.82% de la pulpa prensada, parecen contradecir los datos obtenidos con la misma pulpa después de lavarla cinco veces, o sea 29.32% y 14.97% respectivamente, ya que en lugar de disminuir aumentaron. La posible explicación de estos resultados es que a veces el sustrato fresco tiene una estructura muy compacta,

Las sustancias o componentes que lo forman no están en forma libre, al analizarlos existen otros compuestos que bloquean el ataque de los reactivos y, por consiguiente los primeros resultados son menores que los siguientes, obtenidos después de que la estructura de la pulpa se simplificó con los tratamientos (Calzada, comunicación personal, 1984).

Después del desarrollo del micelio, se dio una disminución de estas sustancias, lo que indicó que el organismo estaba degradando el sustrato para nutrirse. Los hongos poseen la habilidad de descomponer los materiales que contienen celulosa y lignina (Leong, 1982).

Otros análisis que corroboran lo anterior, o sea, el empleo de los componentes de la pulpa de café por los hongos, es la prueba de digestibilidad "in vitro" y el análisis de sólidos solubles.

Cuadro 13. Datos sobre la digestibilidad "in vitro" y de los sólidos solubles en agua a las 96 horas, a 40°C.

MUESTRA	Digestibilidad "in vitro" (%)	Sólidos solubles (%)
PP	41.98	16.99
PL (5 veces)	46.47	6.90
PM de <u>P. flabellatus</u>	37.32	18.10
PM <u>P. flabellatus</u> después de fructificar	29.25	26.83

Se entiende como digestibilidad "in vitro" la porción de materia orgánica perdida en la digestión.

La pulpa fresca presentó una digestibilidad "in vitro" de 41.98%, este porcentaje aumenta al ser lavada a 46.47% (quizá porque la estructura de la pulpa se simplificó al lavarla). Posteriormente el porcentaje disminuye al crecer el micelio, y aún más al fructificar el hongo (29.25%).

Los sólidos solubles en agua a las 96 horas, a 40°C, nos mostraron también resultados representativos, pues de 16.99% en la pulpa fresca y

prensada, el porcentaje aumenta a 26.83%, después del desarrollo del carpóforo. Esto nos demuestra que conforme actúan las enzimas con el crecimiento del hongo, se va destruyendo la estructura del sustrato y aumenta el material soluble.

Los cambios notados en estos análisis se deben a un mejor aprovechamiento de la pulpa de café. El hongo se nutre de los componentes del sustrato.

## 7. VALOR ENERGETICO DE LA PULPA DE CAFE

El valor energético del sustrato fue calculado por medio del valor de la proteína cruda que al ser multiplicada por un factor establecido (6.25) da un valor aproximado del nitrógeno proteico de las muestras.

Los análisis de nitrógeno total y de nitrógeno proteico se realizaron con la finalidad de saber si el desarrollo del micelio del hongo sobre la pulpa de café, la enriquece proteínicamente (Cuadro # 14).

Cuadro 14. Contenido de nitrógeno total y aproximación del nitrógeno proteico de la pulpa de café, y de la pulpa con micelio.

MUESTRA	N <sub>2</sub> total	N <sub>2</sub> proteico (N <sub>2</sub> X 6.25)
I Fase		
PP	0.10	0.63
PL (5 veces)	0.26	1.63
PM de <u>Pleurotus flabellatus</u>	0.32	2.01
PM <u>P. flabellatus</u> después de fructificar	0.34	2.14
PM de <u>Volvariella volvacea</u>	0.50	3.13
PM de <u>Coprinus fimentarius</u>	0.11	0.67
PM de <u>Pleurotus cornucopiae</u>	0.40	2.50
II Fase		
PF	0.24	1.49
PP	0.25	1.55
PL (una vez)	0.27	1.69
PP (por II vez)	0.29	1.81

El cuadro 14 muestra que el sustrato se enriquece al crecer el micelio de Pleurotus flabellatus ya que de 0.63% de nitrógeno proteico, pasa a 2.01%, y aumenta a 2.14% después de la fructificación.

Las dos cepas que proporcionaron un enriquecimiento mayor al sustrato fueron Pleurotus cornucopiae y Volvariella volvacea. Del 1.63% de la pulpa lavada llegaron a tener 2.50% y 3.13% respectivamente.

Tanto en la primera fase como en la segunda etapa del proyecto se notó que la pulpa fresca, después de ser tratada, aumenta su porcentaje de nitrógeno total y proteico. Esto se da posiblemente al quedar más expuesto el nitrógeno cuando se simplifica la estructura de la pulpa de café.

## VII. CONCLUSIONES

- 1- Para reducir el tiempo de preparación del inóculo, lo más recomendable es incubar los cultivos en sus respectivas temperaturas óptimas. Se debe determinar qué es más factible, si gastar tiempo o recursos económicos.
- 2- El hongo que presenta mejores condiciones, o sea, el que tiene la plasticidad genética que le permite adaptarse, crecer y fructificar sobre la pulpa de café es Pleurotus flabellatus. Este hongo se puede desarrollar tanto en condiciones ambientales naturales como controladas.
- 3- El alto contenido de cafeína actúa como agente mutágeno, ya que propicia la malformación de las fructificaciones.
- 4- El ensilaje de la pulpa de café es un proceso recomendable, ya que contrarresta el problema de la producción estacional de este material. Con el ensilaje y el prensado la estructura de la pulpa sufre un ablandamiento y desfibrilado, lo que simplifica la estructura del sustrato y facilita la penetración micelial y extracción de nutrimentos. La ligera acidificación de la pulpa ensilada aumenta la decafeinización.
- 5- El tratamiento más efectivo para esterilizar y extraer compuestos tóxicos como cafeína y polifenoles es lavar cinco veces con agua a 80°C. Cuando solo se realizó una lavada con agitación constante por 30 min, se presentaron nemátodos en el sustrato, y después actuaron como depredadores de los cuerpos fructíferos. Esto demuestra que el tratamiento no es recomendable para una buena esterilización.
- 6- La mezcla de pulpa de café-micelio es más rica proteínicamente como componente de dietas para rumiantes, que solo la pulpa.

## VIII. RECOMENDACIONES

- 1- Realizar ensayos paralelos, uno empleando Pleurotus flabellatus y otro con una cepa fresca de P. ostreatus, para comparar cuál es más apropiada para el cultivo sobre pulpa de café.
- 2- Colectar en Costa Rica material del género Pleurotus, para contar con especies autóctonas y después probar cuál de ellas se desarrolla mejor en un sustrato con base en pulpa de café.
- 3- Ensilar la pulpa de café, cuando se requiera, esterilizarla con el tratamiento de cinco lavadas con agua a 80-90°C. Para un buen ensilado se requiere drenaje, los orificios hechos con ese fin, después de la salida del agua, se pueden tapar con adhesivo o con tapón para evitar la entrada del aire.
- 4- Para una verdadera pasteurización, después del tratamiento y drenaje del agua caliente, se le debe agregar agua bien fría, para terminar de eliminar los microorganismos por choque térmico.
- 5- Para extraer los compuestos tóxicos, en una de las primeras lavadas se puede utilizar una mezcla de agua, alcohol y/o ácido ascórbico ó agua y sal, lo que aumenta la solubilidad de la cafeína. El ácido ascórbico y la sal se eliminan con las lavadas posteriores.
- 6- Las bolsas plásticas empleadas en los cultivos pueden ser un poco más pequeñas que las utilizadas en este experimento (24 X 36 cm), ya que el crecimiento vertical, o sea, la profundización del micelio tiene un promedio de 15 cm.
- 7- Para un drenaje más efectivo del excedente de agua, a la hora de preparar la pulpa (antes de inocularla), se puede poner en el fondo de la bolsa unos 3 cm de pulpa revuelta con arena estéril, pedazos de

"dura port" o paja de arroz.

8- El micelio que creció sobre la pulpa se debe regar como mínimo dos veces diarias; y cuando está en la fase de fructificación, hay que rociar el agua con cuidado de no mojar constantemente los carpóforos, ya que se descomponen.

9- Hacer una prueba agregando nitrato de amonio a la pulpa de café (como fuente de nitrógeno), para observar si los resultados son similares a los cultivos sin la sustancia.

Ainsworth, G.S. *Ainsworth & Sibly: Dictionary of the Fungi*. Commonwealth Phyto. Inst. New Zealand. 1973. pp. 453.

Alexopoulos, C. *Introducción a la micología*. II ed. Editorial Universitaria. Santiago de Chile. 1973. p. 113.

Alibon, F.V. *Mushrooms production technology*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. National Institute of Science and Technology. Manila. 1973. p. 10.

Alvarez, X. *Producción acelerada de champiñón a partir de la pulpa de café*. Diseño de una planta productora. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos, Guatemala. 1982.

Argueta, H. *Estudio de los microorganismos de la Ciudad de Guatemala*. In: *Actas del Simposio de San Carlos*. Universidad de San Carlos, Guatemala. 1977. pp. 50-51.

Arriola, Delia. *Caracterización química de la pectina obtenida de diferentes variedades de café*. Tesis de Licenciatura en Química. Universidad de San Carlos, Guatemala. 1985. p. 30.

Arriola, Norma. *Determinación espectrofotométrica de cafeína en café soluble*. Tesis de Licenciatura en Química. Universidad de San Carlos, Guatemala. 1977. pp. 4-57.

Bisht, K. y N. Bhand. *Utilization of Pleurotus ostreatus for mushroom production on coffee pulp and waste paper*. *Journal of Food Science*. 1978. pp. 103-104.

Bloch, J. *Production of mushrooms from coffee pulp*. *Journal of Food Science*. 1978. pp. 103-104.

Bloch, J. *Survey comparing for mushroom production*. *Journal of Food Science*. 1978. pp. 103-104.

## IX. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Adegbola, A. y O. Paladines. Prediction of the digestibility of the dry matter of tropical forage from their solubility in fungal cellulase solutions. *J. Sci. Fd. Agric.* 28: 775-785. 1977.
- Aguirre, F. La utilización industrial del grano de café y de sus subproductos. *Investigaciones técnicas del ICAITI.* N. 1, 1966. Pp: 33.
- Aidoo, K., R. Hendry y B. Wood. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12: 6-9. 1981.
- Ainsworth, G.C. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi.* Commonwealth Myc. Inst. Kew. 1971. Pp: 663.
- Alexopoulos, C. *Introducción a la Micología.* II ed. Editorial Universitaria de Buenos Aires. Argentina. 1976. 615 p.
- Alibusan, R.V. *Mushrooms production technology for rural development.* National Institute of Science and Technology, National Science Development Board. Manila Philippines s. f. Pp: 99-103.
- Alvarez, W. *Producción acelerada de abono orgánico a partir de la pulpa de café. Diseño de una planta productora.* Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos, Guatemala. 1982.
- Argueta, H. *Estudio de los macromicetos de la Ciudad de Guatemala-Mixco y Sn Juan Sacatepéquez.* Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos, Guatemala. 1983. 86 p.
- Arriola, Delia. *Caracterización química de la pectina obtenida de desechos del beneficiado del café.* Tesis de Licenciatura en Ouímica. Universidad de San Carlos, Guatemala. 1985. 99 p.
- Arriola, Norma. *Determinación espectrofotométrica de cafeína en café soluble.* Tesis de Licenciatura en Química. Universidad de San Carlos, Guatemala. 1972. Pp: 8-57.
- Bisht, N. y N. Harsh. *Cultivation of Pleurotus ostreatus (Jacq.) Fr. by utilizing Lantana camara L. and waste paper.* *Agricultural Wastes* 11: 99-103. 1984.
- Block, S. *Production of mushrooms from sawdust.* Department of Chemical Engineering. University of Florida. Vol. 6, N. 12. 1958.
- Block, S.S. *Garbage composting for mushroom production.* *Appl. Microbiol.,* Jan, 13: 5-9. 1965.

- Bokenfohr, B. *Ensilado de pulpa de café utilizando la urea, el carbonato de calcio y el fosfato dicalcico como aditivos. Tesis de Licenciatura en Agronomía. Universidad de Costa Rica. 1974. 69 p.*
- Bold, H., C. Alexopoulos y T. Delevoryas. *Morphology of plants and fungi. IV ed. Editores Harper y Row. New York. 1980. 819 p.*
- Braham, J. E. y R. Bressani. *Pulpa de cafe: Composición, tecnología y utilización. Bogotá, Colombia. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP). 1979. 152 p.*
- Bressani, R., R. Jarquín, V. Estrada y R. Gómez. *Composición química de la pulpa de café. Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA). 6: 113-114. 1971.*
- Bressani, R. *Factores Antifisiológicos en la pulpa de café. In: Pulpa de café: Composición, tecnología y utilización. Bogotá, Colombia. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá. 1979. Pp: 19-24.*
- \_\_\_\_\_. *Posibles usos de los sub-productos del grano de café. In: Pulpa de café: Composición, tecnología y utilización. Bogotá, Colombia. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá. 1979. Pp: 31-43.*
- Cochrane, V. *Physiology of fungi. John Wiley & Sons, INC. New York. 1958. 524 p.*
- Corella, Zaira. *Tratamientos de los desechos de la industrialización del café. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Universidad de Costa Rica. 1978. 76 p.*
- Chang, S.T. *Volvariella volvacea. In: Chang, S.T. y W.A. Hayes. The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic Press. 1978. Pp: 573-603.*
- Chang, S.T. y W.A. Hayes. *The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic Press. USA. 1978.*
- Chang, S.T., O.W. Lau y K. Y. Cho. *The cultivation and nutritional value of Pleurotus sajor-caju. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12: 58-62. 1981.*
- Chang, S.T. y T. Quimio. *Tropical mushrooms. Biological nature and cultivation methods. The Chinese University Press. Hong Kong. 1982. 493 p.*
- Chinbenjaphol, S. *Cultivation of Pleurotus mushrooms in Thailand. Department of Agricultural Extension Faculty of Agriculture. Chiangmai University. Thailand. s.f.; s.p.*

- Christensen, C. Los hongos y el hombre. II ed. Editorial Interamericana. AID. México. 1964. 209 p.
- \_\_\_\_\_. Contaminación por hongos en granos almacenados. Ediciones de la AID. México. 1976. 199 p.
- De Diego Calonge, F. Setas (Hongos). Guía Ilustrada. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 1979. 309 p.
- De León, O. Evaluación de la producción de biogas a partir de desechos derivados del beneficiado del café. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos, Guatemala. 1980. Pp: 10-45.
- Dickinson, C. y J. Lucas. Encyclopedia of Mushrooms. Ediciones Putman. New York. 1979. 280 p.
- Dowman, Mary G. y F.C. Collins. The use of enzymes to predict the digestibility of animal feeds. J. Sci. Food. Agric. 33: 689-696. 1982.
- Eger, G. Biology and breeding of Pleurotus. In: Chang, S.T. y W.A., Hayes. The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic Press. 1978. Pp: 497-517.
- Elías, L. Composición Química de la pulpa de café y otros subproductos. In: Pulpa de café: Composición, tecnología y utilización. Bogotá, Colombia. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá. 1979. Pp: 19-24.
- Farr, D. Mushroom industry: diversification with additional species in the United States. Microbiología. 75 (2): 351-360. 1983.
- Font Quer, P. Diccionario de Botánica. 8a. reimpresión. Editorial Labor. España. 1982. 1244 p.
- Foth, H.D. Fundamentos de la Ciencia del Suelo. Editorial Continental, Cía. México. 1975. 527 p.
- Fournier, L. Fundamentos de Ecología Vegetal. Universidad de Costa Rica. (Edición provisional). 1970. 140 p.
- Francia, Institut National de Vulgarisation. El Champiñón. Título original: Le Champiñón. Editorial Acribia. Zaragoza, España. s.f. Pp: 20-86.
- Garner, E. Principios de Genética. Ediciones de la Agencia para el Desarrollo Internacional (AID). México. 1964. 444 p.
- Giménez, G., I. Mesa, J.F. López y A. González. Kinetics of binucleate cell production by caffeine. Cytología. 34: 95-104. 1980.

- Goering, H.K. y P.J. Van Soest. Forage fiber analyses. Agricultural Research Service. s.f. Pp: 1-15.
- Gormley, T.R. y F.O' Riordain. Quality evaluation of fresh and processed oyster mushrooms (Pleurotus ostreatus). Lebensm. Wiss. U. Technol. 9: 75-78. 1976.
- Guzmán, G. Identificación de los Hongos: comestibles, venenosos y alucinógenos. II reimpresión. Editorial Limusa, S.A. México. 1980. 452 p.
- \_\_\_\_\_. Hongos. I reimpresión. Editorial Limusa, S.A. México. 1981. 194 p.
- \_\_\_\_\_. Los hongos de Mesoamérica. Instituto Nacional de Investigaciones sobre recursos bióticos. Veracruz, México. 1983. Pp: 45-53.
- Guzmán, G. y A. Sampieri. Nuevos datos sobre el hongo comestible Cantharellus odoratus en México. Bol. Soc. Mex. Mic. 19: 201-205. 1984.
- Hernández, M. Pulpa de café. Ministerio de Educación Pública; Centro de Investigación y perfeccionamiento para la Educación Técnica (CIPET). Boletín Agropecuario. Alajuela, Costa Rica. 1985. 14 p.
- Horwitz, W. (Editor). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Washington, Published by The Association of Official Analytical Chemists. Pp: 164-165; 927-928. 1975.
- Kalberer, P. y U. Künsch. Amino acid composition of the oyster mushroom (Pleurotus ostreatus). Lebensm. Wiss. U. Technol. 7(4): 242-243. 1974.
- Khanna, P. y H.S. Garcha. Utilization of paddy straw for the cultivation of Pleurotus spp. Department of Microbiology, Punjab Agricultural University, Ludhiana. India. s.f.; s.p.
- Kurtzman, R.H. Coprinus fimentarius. In: Chang, S.T. y W.A., Hayes. The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic Press. 1978. Pp: 393-407.
- \_\_\_\_\_. Metabolism and culture of Pleurotus the oyster mushrooms. Taiwan Mushrooms. 3 (1): 1-13. 1979.
- Kurtzman, R.H. y F. Zadrazil. Physiological and taxonomic considerations for cultivation of Pleurotus mushrooms. In: Chang, S.T. y T. Quimio. Tropical mushrooms biological nature and cultivation methods. The Chinese University Press. Hong Kong. 1982. P: 3-35.
- Leal Lara, H. Producción de hongos comestibles (Fotocopia) s.f. Pp: 157-176.

- Nonis, U. Setas. Descripción, toxicidad y valor culinario. Trad. Diorki. Ediciones DAIMON, Barcelona España. 1982. 229 p.
- \_\_\_\_\_. Setas comestibles. Trad. de Ediciones DAIMON. Ediciones DAIMON. Barcelona, España. 1984. 189 p.
- Pacioni, G. Guía de Hongos. Ediciones Grijalbo. España. 1982. 523 p.
- Platt, M., Y. Bashan, I Chet y Y. Henis. Two media for the rapid growth of *Pleurotus* species. Mushroom Newsletter for the Tropics. 1(4): 2-5. 1981.
- Quimio, Tricita. Nutritional studies on *Volvariella volvacea*. Mushroom Newsletter for the Tropics. 2(1): 9-15. 1981.
- Ramires, M<sup>o</sup> Eugenia. Selección de un microorganismo para la producción de proteína unicelular utilizando desechos agroindustriales.. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos, Guatemala. 1976.
- Repossi, G. Cuestión de vida o muerte. Círculo de lectores. Barcelona, España. 1979. 187 p.
- Rivera, K. Estudio de factibilidad para la deshidratación de la pulpa del café. Sub-productos de café, S.A. Costa Rica. 1977.
- Roberts, H. y J. Barones. Biological effects of caffeine; History and use. Food Technology. 37(9): 32-39. 1983.
- Rodríguez, J. Efecto de diferentes períodos de exposición ambiental sobre la pulpa de café y cáscara de cacao previo a su ensilado. Tesis de Licenciatura en Agronomía. Universidad de Costa Rica. 1973. 55p.
- Rubio, J. y P. Pineda. Composición química y digestibilidad in vitro de la pulpa de café. CENICAFE (Centro Nac. de Investigaciones del café). Colombia. 24(3): 61-74. 1973.
- Sussman, A. The fungi. Editado por Ainsworth, G.C. Academic Press. Vol. II. New York. 1966. Pp: 56-57.
- U.S.A.I.D. El cultivo del champiñón en los Estados Unidos. Agencia para el Desarrollo Internacional. 1972. 12 p.
- Von Borstel, R.W. Biological effects of caffeine; Metabolism. Food Technology. 37(9): 40-43. 1983.
- Wang, C.W. R-Glucosidase and cellulase activities during sporocarp formation in *Volvariella volvacea*. Mushroom Newsletter for the Tropics. 1(4): 10-16. 1981.
- Wilson, C. y W., Loomis. Botánica. Trad. I. Cool. Centro Regional de Ayuda Técnica (AID). México. 1968. 682 p.

- Yamada, O., Y. Magae, Y. Kashiwagi, Y. Kakimoto y T. Sasaki. Preparation and regeneration of mycelial protoplast of Collybia velutipes and Pleurotus ostreatus. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17: 298-300. 1983.
- Zadrazil, F. The conversion of straw into feed by basidiomycetes. Eur. J. Appl. Microbiol. 4: 273-281. 1977..
- \_\_\_\_\_. Cultivation of Pleurotus. In: Chang, S.T. y W.A. Hayes. The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic Press. 1978. Pp: 521-555.
- \_\_\_\_\_. Conversion of different plant waste into feed by basidiomycetes. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9: 243-248. 1980.
- \_\_\_\_\_. Influence of ammonium nitrate and organic supplements on the yield of Pleurotus sajor-caju (Fr.) Sing. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9: 31-35. 1980.
- Zadrazil, F. y H. Brunnert. The influence of ammonium nitrate supplementation on degradation and in vitro digestibility of straw colonized by higher fungi. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9: 37-44. 1980.
- \_\_\_\_\_. Investigation of physical parameters important for the solid state fermentation of straw by white rot fungi. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 11: 183-188. 1981.
- Zadrazil, F. y K. Grabbe. Edible mushrooms. H.J. Rehm and G. Reed Editors. Vol. 3. Verlag Chemic Wemhem. 1983.
- Zadrazil, F. y R. Kurtzman. The biology of Pleurotus cultivation in the tropics. In: Chang, S.T. y T. Quimio. Tropical mushrooms. Biological nature and cultivation methods. The Chinese University Press. Hong Kong. 1982. Pp: 277-296.



## ANEXO N. 1

GLOSARIO

- Aclorofilo** (del gr. a, no y cloros, verde; más phyllon, hoja). Que carece de clorofila.
- Agar.** Sustancia gelatinosa obtenida de algas rojas. Se emplea como solidificante en la preparación de medios nutritivos para el cultivo de microorganismos y para otros fines.
- Alcaloides.** Compuestos orgánicos de propiedades alcalinas, producidos por plantas. Estas sustancias, que son el principio activo de muchas drogas y venenos de origen vegetal, tienen sabor amargo y muchos son venenosos. Todos los alcaloides contienen carbono, hidrógeno y nitrógeno; la mayoría tienen oxígeno. Ejemplos de alcaloides: nicotina, morfina, quinina, cafeína, estricnina.
- Aparatao de Golgi.** Conjunto de estructuras que pueden ser fijadas por los estabilizadores de los lipoides e impregnadas por el tetróxido de osmio, las sales argénticas y el tanino férrico, constituidas en gotitas, con una parte cromófila, que ordinariamente aumenta hacia afuera, y una parte cromófoba hacia adentro; o bien formadas por un retículo que se supone derivado de dichas gotitas previamente fusionadas. A la parte cromófoba se le llama también paraGolgi. Créese que este aparatato está formado por interfase entre lípidos y prótidos, y en algunos casos también por ácidos nucleicos. Las funciones del aparato de Golgi son aún desconocidas, pero seguramente se relacionan con la producción de secreciones en el citoplasma y con la elaboración de la propia sustancia citoplasmática. El aparato de Golgi supone la separación de las fases lipídica y protídica para ulteriores elaboraciones plasmáticas.
- Asexual** (del lat. ab, distante y sexus, sexo). Reproducción que no requiere de la unión de 2 núcleos.
- Basidio** (del gr. basidion, pequeña base). Estructura que lleva sobre su superficie un determinado número de basidiosporas (típicamente 4) las cuales generalmente se forman como resultado de cariogamia y meiosis.
- Basidiocarpio** (del gr. basidion, pequeña base, basidio y karpion, frutos). Cuerpo fructífero que lleva basidios.
- Basidiospora** (del gr. basidion, pequeña base y sporos, semilla, espora). Espora resultante de cariogamia y meiosis, llevada sobre el exterior de un basidio.

Caja de Petri (Nombre tomado del científico alemán R.J. Petri). Recipiente de vidrio constituido por una fuente circular chata con lados verticales, y una tapa similar pero algo más grande que la cubre. Recipiente propio del equipo habitual necesario para tener cultivos puros de microorganismos.

Carpóforo. Ver fructificación.

Celulosa. Carbohidrato, principal componente de la membrana celular en la mayoría de los vegetales.

Cepas. Tipo de organismo constituido por diversas estirpes (Sinónimo de especie).

Citocinesis. En mitosis y en la meiosis, división del citoplasma celular y otros cambios exclusivos de la división nuclear, para formar las células hijas. La citocinesis se puede dar por estrangulamiento del citoplasma o por la formación de una placa divisoria en la zona ecuatorial de la célula.

Clamidóspora (del gr. *chlamys*, manto y *sporos*, semilla, espora). Célula hifal, encerrada por una gruesa pared celular, que finalmente se separa de la hifa madre y se comporta como espora de resistencia.

Cromosomas. Cuerpos nucleoproteicos, se observan en la célula durante la división celular. Transportan los genes dispuestos en orden lineal. Cada especie tiene un número característico de cromosomas./ Unidad estructural del núcleo que conserva su individualidad de una generación a otra.

Cuerpo fructífero. Ver fructificación.

Cultivo puro. Agregado de microorganismos de la misma especie, aislados de modo que sea imposible su mezcla con otras especies.

Dicariótico (del neo lat. *di*, dos y del gr. *karyon*, núcleo). Con referencia a una célula con dos núcleos.

Diferenciación. Modificación de distintas partes del cuerpo para funciones específicas durante el desarrollo del organismo.

Difusión. Movimiento neto de una sustancia a consecuencia del movimiento independiente de cada una de sus moléculas, iones o partículas coloidales, desde una región de presión de difusión más alta a otra de presión más baja.

Digestibilidad "in vitro". Es la porción de materia orgánica perdida en la digestión.

División celular. División del citoplasma en dos partes iguales, generalmente mediante la formación de una placa celular.

**Ensilaje.** Proceso de conservación de forrajes. Consiste en la preservación del material, en su estado succulento, por medio de fermentaciones parciales. La fermentación es producida por bacterias en ausencia de aire. El proceso se inicia al poner en un silo el forraje, al cerrar este, las células todavía vivas siguen respirando y consumen el oxígeno del aire, desprendiendo  $\text{CO}_2$ , agua y calor. Al cabo de cierto tiempo desaparece el oxígeno (fase aeróbica) y se inicia la fase anaeróbica. Las bacterias anaeróbicas degradan las proteínas y los carbohidratos solubles que contienen las células vegetales, produciendo ácido láctico y alcohol. Al acumularse los ácidos éstos ejercen una acción tóxica sobre las bacterias (especialmente del género *Clostridium*) causantes de la fermentación butírica. Además se reduce el pH del material ensilado a niveles que impiden el desarrollo de nuevas bacterias, por lo que el proceso de fermentación se detiene. De esta forma se previenen la descomposición adicional del material, el cuál puede preservarse así por períodos largos de tiempo.

**Enzima.** Protina que acelera una reacción química específica en un sistema viviente.

**Espora** (del gr. *sporos*, espora). Pequeña unidad de propagación que funciona como semilla, pero se diferencia de ella porque una espora no tiene embrión preformado.

**Estípite** (del lat. *stipes*, -itis, estaca, tronco). Dícese del pie que sostiene el píleo en los hongos agaricales típicos, formado por un hifénquima compacto, ya macizo o hueco, que se levanta del terreno o soporte.

**Estructura somática.** Cualquier estructura con células no sexuales o sea vegetativa (talo).

**Fructificación** (del lat. *fructus*, fruto). Cualquier estructura fúngica que contiene o lleva esporas. Referido al aparato reproductor de los hongos. Sinónimo: carpóforo y cuerpo fructífero.

**Fungicida:** Sustancia tóxica que destruye los hongos o impide su propagación.

**Golgi.** Ver Aparato de Golgi.

**Género** (del lat. *genus*, raza). Categoría taxonómica que incluye una cantidad de especies. El nombre del género (nombre genérico) es el primer nombre en el binomio.

**Hábitat.** Ambiente natural de un organismo; lugar donde se le suele encontrar.

**Heterótrofo.** Organismo incapaz de nutrirse pues no puede sintetizar carbohidratos a partir de elementos inorgánicos. Por ello requiere materiales elaborados para nutrirse.

- Hifa** (del gr. *hyphae*, tejido). La unidad estructural de los hongos; un filamento tubular que en conjunto con otros filamentos forman la fase vegetativa o micelio.
- Hipógeo** (del gr. *hypo*, bajo y *ge*, tierra). Que crece bajo el suelo.
- Hongo** (del lat. *fungus*, seta). Organismo heterótrofo, saprófito o parásito. Es un organismo aclorófilo cuya estructura somática es generalmente filamentosa y ramificada. Los hongos tienen paredes celulares y núcleos. Se reproducen sexual y asexualmente.
- Humus**. La parte descompuesta, más o menos estable, de la materia orgánica del suelo.
- Inhibidor**. Cualquier sustancia u objeto que retarda una reacción química; modificador que interfiere con una reacción.
- Lignícola**. Que vive o se desarrolla en la madera.
- Lignina**. Principal componente no celulósico de la madera. Se endurece y protege a la celulosa.
- Medio** (del lat. *medium*, intermediario). Sustrato de composición química equilibrada que se emplea en el laboratorio para cultivar microorganismos. Los medios pueden utilizarse en estado líquido o solidificarse con agar, gelatina u otros agentes.
- Medio ambiente**. Conjunto de condiciones exteriores e influencias que afectan la vida y desarrollo del organismo.
- Micelio** (del gr. *mykes*, seta, hongo). Masa de hifas que constituyen el cuerpo (talo) del hongo.
- Micología** (del gr. *mykes*, seta, hongo y *logos*, ciencia). La ciencia que estudia los hongos. Sin. Micetología.
- Mutación**. Cambio súbito en el genotipo de un organismo. El término se emplea ampliamente para incluir mutaciones que involucran un gene sencillo y cambios cromosómicos.
- Mutágeno**. Agente del medio ambiente, ya sea físico o químico, capaz de inducir mutaciones.
- Mutante**. Célula u organismo con carácter genotípico diferente del de sus padres y no derivado de ellos por un proceso normal de segregación o por entrecruzamiento, sino modificado por una mutación.
- Parásito** (del gr. *parasitos*, comiendo al lado de otro). Organismo que vive a expensas de otro, generalmente invadiéndolo y causándole enfermedad.
- pH**. Sistema para designar o indicar el grado de acidez o alcalinidad de

un sistema. Técnicamente es el logaritmo común del número recíproco de la concentración de iones hidrógeno (gramos por litro).

Placa celular. Cuerpo intermedio que persiste entre las 2 células hijas en la citocinesis de los vegetales, que por poseer membranas rígidas no experimentan la estrangulación del huso y del citoplasma, y donde se formará la membrana celular separatoria de cada célula hija.

Pileo (del lat. pileus, sombrero). Porción superior o sombrero de ciertos tipos de ascocarpos y basidiocarpos.

Reproducción sexual. Reproducción que requiere la fusión de 2 núcleos compatibles.

Saprobio. (del gr. sapos, podrido o putrefacto y bios, vida). Organismo que utiliza como alimento la sustancia orgánica muerta.

Somático (del gr. soma, cuerpo). Se refiere a la estructura o función de la fase vegetativa, para distinguirla de la reproductora.

Taninos (del fr. taninn, y este de "tan", corteza de diversos árboles). Cualquiera de los principios inmediatos vegetales, ternarios (C, H y O), de sabor astringente, que precipitan con las sales férricas y dan productos de color azul, negro o verde. Son polímeros fenólicos, químicamente pueden agruparse en 2 clases: los taninos hidrolizables que se hidrolizan con ácido gálico y azúcares y los taninos condensados que se derivan de flavonoides monómeros.

Trufa. Ascomycete de ascocarpo con crecimiento hipógeno (desarrollo subterráneo). Hongo comestible.

Viabilidad. Capacidad para vivir y desarrollarse normalmente.

Volva (del lat. volva, cubierta). Una capa en la base del estípote de ciertas setas, por ejemplo Volvariella.

## ANEXO N. 2

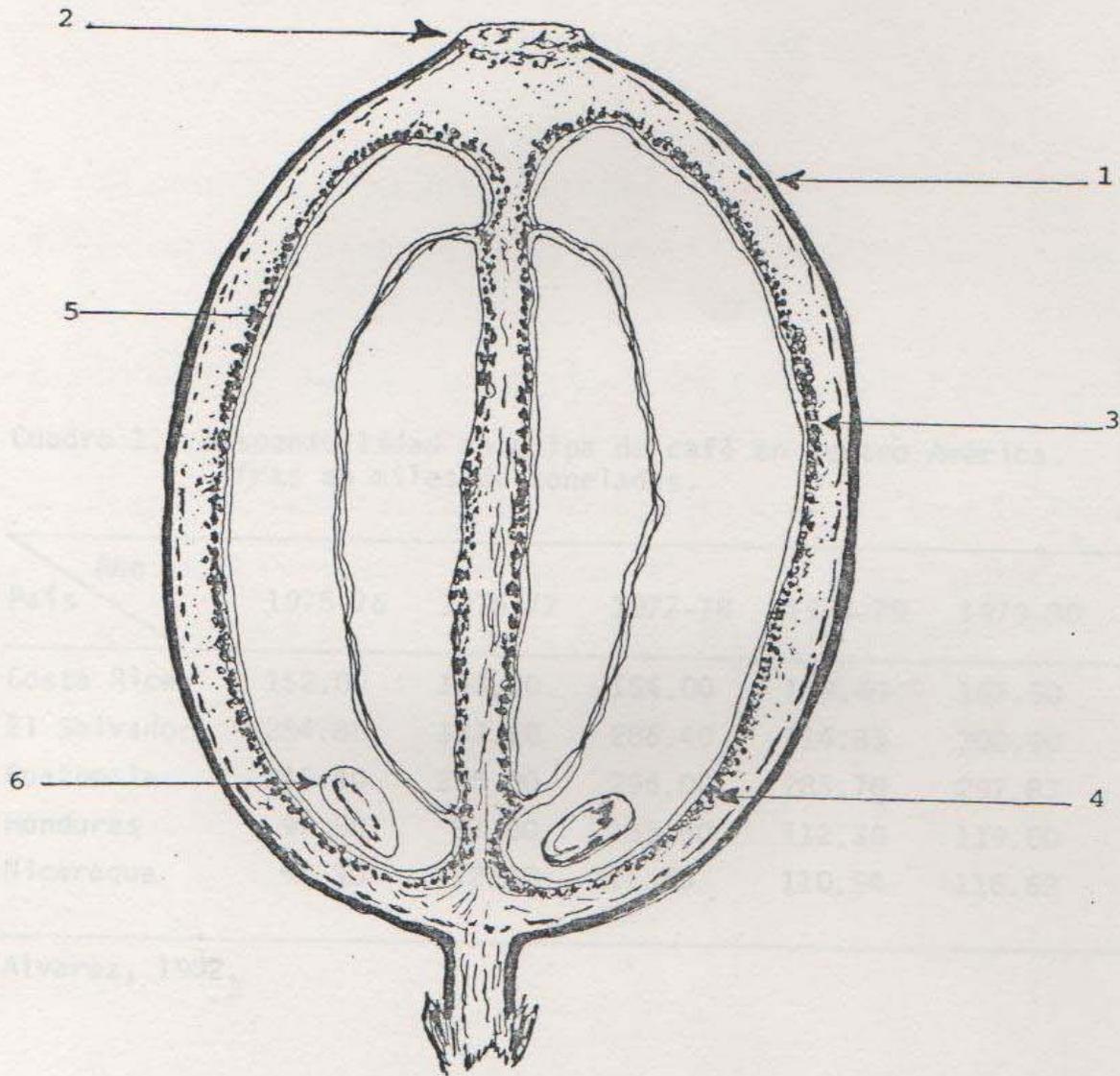


Fig. N°1 Corte longitudinal de una cereza de café.  
(C. arábica)

- |  |  |
|--|--|
| 1. Epicarpio (película roja exterior)                    | 4. Endocarpio (pergamino)                        |
| 2. Disco u "ombligo"                                     | 5. Espermoderma o película plateada              |
| 3. Mesocarpio ó capa de tejido blando, hialino, incoloro | 6. Embrión (endosperma o almendra (2 en c/drupa) |

## ANEXO N. 3

## PREPARACION DEL VINO ROSA

- 1- Se pesan 100 gr de uvas maduras.
- 2- Se cortan en pedacitos y se hiervan en un litro de agua destilada hasta que estén blandas.
- 3- Se cuele el líquido, con ayuda de una caza de café y se condensa el agua.

Cuadro 1. Disponibilidad de pulpa de café en Centro América.  
Cifras en miles de toneladas.

País \ Año	1975-76	1976-77	1977-78	1978-79	1979-80	1980-81
Costa Rica	152.00	148.80	154.00	159.40	167.50	175.80
El Salvador	284.80	333.20	286.40	314.33	300.90	316.00
Guatemala	245.40	295.00	296.00	283.70	297.83	312.80
Honduras	97.50	87.00	135.60	112.30	119.00	136.10
Nicaragua	97.30	112.00	11.50	110.94	116.62	128.11

Alvarez, 1982.

## ANEXO N. 4

PREPARACION DEL MEDIO PDA

- 1- Se pesan 300 gm de papas peladas
- 2- Se cortan en rebanadas y se hierven en un litro de agua destilada, hasta que estén blandas.
- 3- Se cuela el cocido, con ayuda de una gaza doble y se conserva el agua.
- 4- Al líquido se le añaden 20 gm de agar y 20 gm de dextrosa.
- 5- Se pone a hervir hasta que el agar se disuelva y se le añade agua destilada para completar nuevamente el litro de líquido.
- 6- Se autoclava por 20 minutos a 121 libras de presión.

