

# EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LOS FACTORES FÍSICOS Y NUTRICIONALES EN LA PROPAGACIÓN DEL MICELIO DE *Pleurotus sajor-caju* CCB-019 EN BIOMASA RESIDUAL DE EMBALAJE DE ALIMENTOS

G. N. FERRI<sup>1</sup>, K. L. HERMANN<sup>1</sup>, E. WISBECK<sup>2</sup>, C. K. de SOUZA<sup>1</sup>, L. B. B. TAVARES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Regional de Blumenau – Departamento de Ingeniería Química y de Alimentos

<sup>2</sup> Universidad de la Región de Joinville – Departamento de Ingeniería de Producción

E-mail para contacto: neves\_gabi@yahoo.com.br

**RESUMEN** - La perspectiva de utilización de hongos basidiomicetos ha sido investigada en la biodegradación de polímeros orgánicos y sintéticos, como aquellos de los embalajes de alimentos. Por lo tanto, este trabajo tuvo por objetivo evaluar el crecimiento vegetativo del hongo *Pleurotus sajor-caju* CCB-019 en un residuo industrial compuesto de papel cartón revestido con PET (politereftalato de etileno) obtenido de la producción de un embalaje de alimento. El experimento consistió en la inoculación del micelio en biomasa triturada, con y sin calentamiento en horno casero. En seguida fue suplementada con salvado de soja, bagazo de mandioca y sales minerales con la solución Socarean en sistema de fermentación en estado sólido (FES) e incubado a 25°C por 12 días. Fue utilizado un diseño experimental con arreglo factorial fraccionado con cuatro factores variando en dos niveles. El desarrollo del micelio fue analizado visualmente utilizando el padrón adaptado de la ASTM G21-90 en escala variando entre ausencia e intensa colonización del sustrato. Los resultados mostraron, por medio de análisis de variancia (ANAVA), que el calentamiento fue el factor que más contribuyó significativamente, pero retardó el inicio de la formación de las hifas en el sustrato. Los demás factores estudiados, los cuales están relacionados con la suplementación nutricional, mostraron menor diferencia entre los niveles evaluados, presentando elevada producción de hifas mismo en concentraciones menores de nutrientes.

## 1. INTRODUCCIÓN

La realidad del mercado actual de embalajes en la industria de los alimentos, agrega múltiples funcionalidades que van desde el acondicionamiento hasta la conservación del producto final. Este mercado viene presentando una tasa de crecimiento anual al redor de 5% en Brasil, y una media de 3,5% en el mercado global, índices fortalecidos por la creciente urbanización de la población (Instituto de Embalagens, 2011). La alteración del estilo de vida de los grupos sociales ha implicado en las modificaciones en los hábitos alimentares, los cuales ha fortalecido el surgimiento de los alimentos pre-prontos (Leal, 2010). Esto justifica

el gran aumento de la cantidad de residuos de embalajes en la totalidad de los residuos sólidos urbanos producidos.

Entre los residuos sólidos generados están los embalajes plásticos, de vidrio, metálicas y celulósicas. El PET, que tiene su principal aplicación en la industria de embalaje (71%) (Romão *et al.*, 2009) por ser un material termoplástico, puede ser reprocesado diversas veces o seguir para otro proceso de transformación. Por lo tanto, una de las maneras para evitar el exceso de deposición de los residuos de este material es el reciclaje. Sin embargo, del punto de vista económico, el reciclaje de polímeros no es considerada una actividad con elevado retorno financiero, principalmente, debido al costo de la recolección selectiva, que puede ser hasta ocho veces mayor que la convencional (Spinacé y Paoli, 2005).

Ya los embalajes de papel y cartón presentan una tasa de reciclaje de cerca de 66,5% (IPEA, 2012). Pero, esta categoría es largamente utilizada de manera combinada con otras materias primas, como los embalajes de cartón aséptico que mesclan papel, cartón, plástico y aluminio. La mezcla no es reciclada por métodos tradicionales.

Son muchas las dificultades de reciclaje enfrentadas actualmente, por eso los estudios con microorganismos capaces de degradar polímeros han aumentado cada vez más. Para Zhang (2004), la biodegradación representa uno de los procesos de transformación de los residuos de polímeros PET. Silva (2009) registra que en las últimas décadas, el interés en la utilización de los procesos mediados por enzimas, tuvo elevación significativa.

Los hongos, también son los organismos responsables por la biodegradación de los materiales poliméricos, especialmente en el caso de los polímeros de origen natural, tales como el almidón y la celulosa (Rosa y Pantano Filho, 2003). Ellos producen enzimas como lipasas, proteasas, amilasas, celulasas, etc., que hidrolizan los sustratos para obtener nutrientes. Los hongos basidiomicetos, también conocidos como setas, se destacan por desempeñar papel fundamental en el ciclo de nutrientes de la naturaleza, principalmente en el ciclo del carbono, una vez que son excelentes degradadores de la lignina y celulosa.

Por lo tanto, este trabajo tuvo por objetivo evaluar la propagación del micelio del hongo *Pleurotus sajor-caju* CCB 019 en un residuo industrial de la producción de embalaje alimenticio con papel cartón revestido con PET, para estudios futuros con interés biotecnológico.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Preparación del Inóculo**

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Bioquímica de la Universidad de Blumenau (FURB), del municipio de Blumenau (Santa Catarina). Se utilizó un aislado de *P. sajor-caju* codificado como CCB-019 proveniente de la colección de hongos del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de la Región de Joinville (Univille), Joinville (Santa Catarina), el cual fue preservado en refrigeración a 4°C. El aislado fue activado en medio agar papa dextrosa (APD) en cajas de Petri, durante siete días e incubado a una temperatura de 25 ±1°C. Posteriormente fueron extraídas las colonias miceliales en discos de APD de 0,7 cm de diámetro con el hongo CCB-019 para inocular en cajas de Petri y obtener el inóculo.

## 2.2. Sustratos Empleados

Para evaluar la colonización de *P. sajor-caju* CCB-019 en sustratos sólidos, se utilizaron residuos de papel cartón revestido con PET (Gráfica Baumgarten) de un embalaje de alimento (20 g) triturado en molino de cuchillos hasta obtener partículas entre 0,5 - 0,7 cm de diámetro (Figura 1). Los residuos se colocaron en frascos cilíndricos de vidrio (0,5 L) con soluciones minerales de Socarean (Couri y Farias, 1995) modificado (3,0 g.L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>, 0,5 g.L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g.L<sup>-1</sup> KCl, 0,01 g.L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O y 1,0 g.L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Una porción de los residuos triturados fue calentada a 200 °C por 30 minutos antes de poner en los frascos. También se empleó como material nutricional salvado de soja y bagazo de mandioca (0,2 y 1,0 g). Se vertieron 30 mL de Socarean (100%) en solución normal (100%) y otra con una solución con mitad de la concentración de sales (solución 50%). Los sustratos de los tratamientos (humedad entre 58% y 60% y pH 6,0) se llevaron a esterilización en autoclave durante 15 minutos a 121°C.



Figura 1 - Residuo de un embalaje de alimento hecho de papel cartón con PET (A) y después del calentamiento.

## 2.3. Colonización sobre Sustrato

A partir de los cultivos puros se tomó 1/6 de la colonia del aislado CCB-019, para inocular a cada uno de los distintos sustratos que se incubaron a temperatura de 25 ±1°C en oscuridad durante 12 días. Al cabo de dicho tiempo se realizó el conteo de la colonización del hongo, visualmente, según el método ASTM G21-90 utilizando la escala abajo (Figura 2).

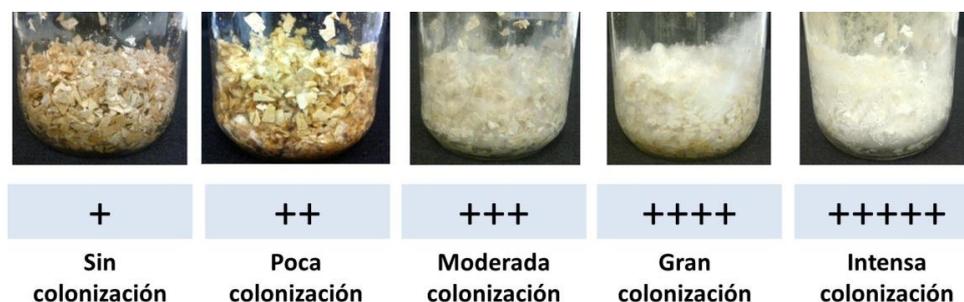


Figura 2 - Padrones de colonización de *P. sajor-caju* CCB-019 cultivado en residuo de papel cartón con PET.

## 2.4. Diseño Estadístico

Se aplicó un diseño experimental en arreglo factorial fraccionado con cuatro factores y dos niveles (Tabla 1). Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de Tukey, utilizando el software *Statistic* versión 7.0 y con  $\alpha = 0,05$ .

Tabla 1 - Diseño, rango experimental y niveles de las variables independientes usados en el diseño factorial  $2^2$  para maximizar el propagación de micelio de *P. sajor-caju* CCB-019 en residuo de un embalaje alimenticio

Tratamientos	Salvado de soja (g)	Bagazo de mandioca (g)	Socarean (%)	Calentamiento (200 °C)
1	1,0 / (+1)	1,0 / (+1)	100 / (+1)	Sin / (+1)
2	1,0 / (+1)	1,0 / (+1)	50 / (-1)	No / (-1)
3	1,0 / (+1)	0,2 / (-1)	100 / (+1)	No / (-1)
4	1,0 / (+1)	0,2 / (-1)	50 / (-1)	Sin / (+1)
5	0,2 / (-1)	1,0 / (+1)	100 / (+1)	No / (-1)
6	0,2 / (-1)	1,0 / (+1)	50 / (-1)	Sin / (+1)
7	0,2 / (-1)	0,2 / (-1)	100 / (+1)	Sin / (+1)
8	0,2 / (-1)	0,2 / (-1)	50 / (-1)	No / (-1)

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La primera evidencia de colonización se observó 5 días después de la inoculación, y la colonización total el día 12 en todas las unidades experimentales de los ocho tratamientos. El residuo de embalaje tiene 90% de cartón y 10% PET. La composición del cartón es 90% celulosa, 5-10% hemicelulosa y 0,5% lignina. Especies como el hongo *Pleurotus* degradan y utilizan la lignina, la hemicelulosa y la celulosa. Para alimentarse secretan enzimas sobre el sustrato donde se encuentran, lo degradan en sustancias simples como fuente de carbono y absorben los nutrientes necesarios para su desarrollo (Rios *et al.*, 2010).

Los macro hongos requieren mayor presencia de carbono que de nitrógeno para generar un ambiente favorable de crecimiento y desarrollo. Pero, para el crecimiento vegetativo (micelial) adecuado en sustrato lignoceluloso, hongos como *Pleurotus* requieren fuentes de nitrógeno para formar componentes celulares como proteínas y ácidos nucleicos (López-Rodríguez *et al.*, 2008). El salvado de soja es rico en nitrógeno orgánico, y diferentes especies de *Pleurotus* producen las proteasas (Inácio *et al.*, 2014) que son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos (Ledezma *et al.*, 2013), como los existentes en la soja. Además, la soja contiene micronutrientes que los hongos necesitan para su metabolismo.

El crecimiento fue evaluado según el patrón de colonización propuesto en escala ascendente de 1 a 5, con una desviación estándar de menos de 0,5 en todos los triplicados, lo que nos muestra la coherencia en los datos obtenidos.

En la Figura 3A se presentan los efectos estandarizados para evaluar la significancia estadística de los factores y la interacción de ellos sobre el crecimiento del micelio. Hubo influencia positiva del salvado, mientras el factor físico (calentamiento) influyó negativamente sobre el crecimiento (Figura 3A). El calentamiento del residuo del embalaje tuvo incidencia significativa, resultando en una colonización moderada de los sustratos, en relación a los demás tratamientos no calentados (Figura 3B).

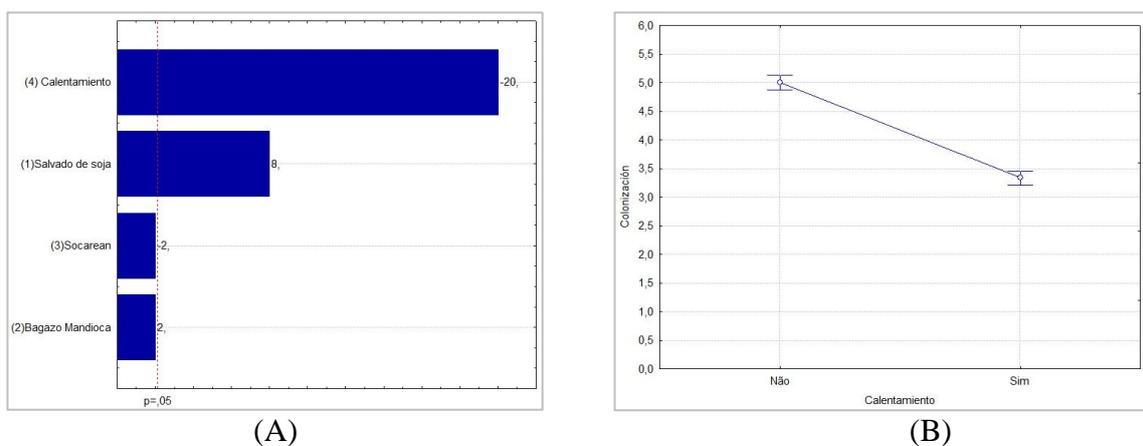


Figura 3 – Diagrama de Pareto (A) y gráfico de promedios de la colonización de *P. sajor-caju* CCB-019.

No se presentaron diferencias significativas de las variables bagazo de mandioca y concentración de minerales de la solución Socarean en la colonización de los sustratos de los ocho tratamientos (Figura 3A), lo que indica condiciones apropiadas para la propagación del hongo independiente de la concentración utilizada.

Otros factores que pueden influir sobre la colonización y velocidad de crecimiento del micelio son el tamaño de partícula del sustrato, el pH, la humedad del sustrato y la capacidad de retención de agua. El pH del medio afecta el metabolismo del hongo porque incide sobre el carácter iónico del medio e influye sobre las proteínas de la membrana y sobre la actividad de las enzimas ligadas a la pared celular. Por lo tanto, el crecimiento se verá afectado si el pH del sustrato no es adecuado, aunque las condiciones de nutrientes sean favorables (Sánchez y Royse, 2001).

Los valores de pH el día 12 del cultivo presentaron datos similares con el primer día de inoculación. En Vieira *et al.*, (2008), se mostró una autorregulación del pH por macro hongos cultivados en diferentes medios por 25 días.

El contenido de humedad también no tuvo cambios. Por lo tanto, el valor próximo de 60% se mostró adecuado, sin afectar la disponibilidad de nutrientes y de oxígeno, ya que hubo colonización en todos los tratamientos.

## 4. CONCLUSIONES

Con base en la tasa de crecimiento de micelio de la cepa CCB-019 en los diferentes tratamientos evaluados, el sustrato sin calentamiento del residuo de embalaje, fue el medio que más favoreció el desarrollo del hongo.

La cepa CCB-019 demostró su adaptabilidad a medios constituidos por subproductos agroindustriales del procesamiento de soja y mandioca con bajo contenido de nitrógeno y con bajo niveles de minerales.

Los indicadores de colonización muestran que *P. sajor-caju* CCB-019 creció con los mismos patrones de ramificación de las hifas en todos los tratamientos, indicando que el medio con residuos de embalaje puede ser empleado como fuente de carbono orgánico con índices favorables de producción de micelio.

## AGRADECIMIENTOS

La investigación fue financiada por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCTI) del Brasil a través de la agencia Financiadora de Estudios y Proyectos (FINEP) y del Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq), proyecto MCTI/CNPq/Biotec del Edital 28/2013.

Los autores expresan su gratitud al CNPq por las becas de Productividad en Desarrollo Tecnológico y Extensión Innovadora para Tavares, L.B.B y de Desarrollo Tecnológico e Innovación para Hermann, K.L.

## 5. BIBLIOGRAFÍAS

ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. Standart Practice for Determinig Resistence of Plastics to fungi, G21-90, 1990.

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. *Rev. Microbiol*, v. 26, p. 314-317, 1995.

INÁCIO, F.D.; FERREIRA, R.O.; DE ARAUJO, C.A.V. Proteases of Wood Rot Fungi with Emphasis on the Genus *Pleurotus*. *BioMed Research International*, Artículo ID 290161, impreso.

INSTITUTO DE EMBALAGENS. *Embalagens: Design, Materiais, Processos, Máquinas e Sustentabilidade*. São Paulo: Editora Instituto de Embalagens, 2011, 400p.

IPEA - Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Diagnóstico dos Resíduos Sólidos Urbanos (2012). Disponible en: <<http://www.ipea.gov.br>>. Acceso 22 de septiembre 2013.

- LAGO, A.L.; ELIS, V.R.; GIACHETI, H.L. Aplicação integrada de métodos geofísicos em uma área de disposição de resíduos sólidos urbanos em Bauru-SP. *Rev. Bras. Geof.*, v. 24, n. 3, 2006.
- LEAL, D. Crescimento da Alimentação Fora do Domicílio. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v. 17, p.123-132, 2010.
- LEDEZMA, Y.; LEDEZMA, M.; LEÓN, M.; PINEDA, W.; ARTEAGA, R.; NAVARRO, M. C.; CONTRERAS, V.; DE LIMA, A. R. Relación entre cambios en la expresión de proteasas y metacicloogénesis espontánea asociadas a las condiciones de mantenimiento de *Trypanosoma cruzi* en el laboratorio. *Salus*, v. 17, p. 56-67, 2013.
- LÓPEZ-RODRÍGUEZ, C.; HERNÁNDEZ-CORREDOR, R.; SUÁREZ-FRANCO, C.; BORRERO, M. Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. *Univ. Scie*, v. 13, n. 2, p.128-137, 2008.
- RIOS, M.P.; HOYOS, J.L.; MOSQUERA, S.A. Evaluación de los parámetros productivos de la semilla de *Pleurotus ostreatus* propagada en diferentes medios de cultivo. *Rev.Bio.Agro.*, v. 8, n.2, p. 86-94, 2010.
- ROMÃO, W.; SPINACE, M.A.S.; PAOLI, M.A. de. Poli (tereftalato de etileno), PET: uma revisão sobre os processos de síntese, mecanismos de degradação e sua reciclagem. *Polímeros*, v. 19, n. 2, 2009.
- ROSA, D. S.; PANTANO FILHO, R. *Biodegradação: um ensaio com polímeros*. Itatiba, SP: Moara Editora, 2003. 112 p.
- SÁNCHEZ, E.; ROYSE, D. *La biología y el cultivo de Pleurotus ssp*. San Cristóbal de las Casas, Chiapas: Noriega Editores, 2001. 69p.
- SILVA, K. R. I. da. Biodegradação de polietileno tereftalato (PET) por fungos ligninolíticos. 2009. 193 f. Tesis (Maestría en Ciencias de la Alimentación) - Universidad de Campinas, 2009.
- SPINACÉ, M.A.S.; PAOLI, M.A de. A tecnologia da reciclagem de polímeros. *Quim. Nova*, v. 28, n. 1, p. 65-72, 2005.
- VIEIRA, G.R.T.; LIEBL, M.; TAVARES, L.B.B.; PAULERT, R.; SMÂNIA JÚNIOR, A. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and antimicrobial metabolites by *Polyporus tricholoma* Mont. *Braz. J. Microbiol.* v. 39, p. 561-568, 2008.
- ZHANG, Y.; YANFUL; E.K.; BASSI, A.S. A Review of Plastic Waste Biodegradation. *Crit. Rev. Biotechnol.*, p. 243 - 250, 2005.