

# Aprovechamiento de residuos agroindustriales del arroz para el cultivo del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*

Postemsky P.<sup>1</sup>, Bidegain M., Devalis R., Figlas D., González Matute R., Delmastro S.,  
Curvetto N., Cubitto M.A.

Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles y Medicinales,  
Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS)  
CONICET- Universidad Nacional del Sur  
Bahía Blanca, Argentina.

## Resumen

Se estudió la biodegradación de paja y cascarilla de arroz para la producción de un hongo medicinal con importante valor de mercado: *G. lucidum*. Seguidamente, y con el fin de incrementar la rentabilidad del proceso, se evaluó la factibilidad del uso del sustrato residual como fuente de enzimas la casas.

El análisis de crecimiento se realizó empleando el sistema de fermentación en estado sólido. Los mejores resultados se obtuvieron en formulaciones que contenían 57-69% paja de arroz, 25-30% cascarilla de arroz, 5-10% salvado de arroz y 0-1% de aceite de oliva. A continuación, se seleccionó la mejor formulación para estudiar los rendimientos de hongos en condiciones de escala piloto, esto es: condiciones que replican la realidad técnica y operativa de una unidad productiva modelo en una pequeña o mediana empresa. Los mayores rendimientos se obtuvieron con el empleo de 8% de tasa de inoculación (*vs.* 5%) y con el uso de 1% de aceite de oliva como suplemento (*vs.* 0%). De esta manera, se pudieron cosechar 4,1 kg de hongos secos por cada 100 kg de sustrato seco.

La evaluación del contenido de minerales en los hongos señaló que ante un enriquecimiento del sustrato con sales de Cu (II), el micelio de *G. lucidum* es capaz de bioacumular hasta tres veces más este oligoelemento (de 3,3 a 10,7 mg Cu (II)/100 g de hongos secos), un efecto

---

<sup>1</sup> pablop@criba.edu.ar

deseable ya que incrementa aún más su valor como alimento funcional. Por otra parte, no se encontraron niveles tóxicos de metales pesados.

Respecto a la actividad de enzimas lacasas, se halló que el agregado de 100 ppm de Cu(II) causaba un incremento de 150 a 267 unidades enzimáticas por kg de sustrato residual en base seca (U/kg PS). A continuación se estudió si la conservación en freezer podría afectar la actividad de lacasas. Este conocimiento sería útil al momento de considerar su almacenamiento previo al transporte hacia la industria. Se encontró que la actividad de las enzimas lacasas se mantenía inalterada por más de cuatro meses a  $-18^{\circ}\text{C}$  y que su actividad no variaba incluso luego de realizarse múltiples ciclos de congelación/descongelación (16 ciclos de  $-18^{\circ}\text{C}/25^{\circ}\text{C}$ ).

Este trabajo permitió concluir que la fermentación en estado sólido con *G. lucidum* de los residuos agroindustriales del arroz es una alternativa redituable para el aprovechamiento de estas grandes cantidades de biomasa.

**Palabras claves:** cascarilla de arroz, fermentación en estado sólido, hongos de la pudrición blanca, paja de arroz, Reishi

## 1. Introducción

La biodegradación de residuos lignocelulósicos por hongos de la pudrición blanca es un proceso que está tomando importancia en el sector productivo, ya que se logran dos objetivos al mismo tiempo: la producción de comida (hongos comestibles y/o medicinales), a la vez que se reduce el impacto ambiental que genera la eliminación inadecuada de tales residuos.

*Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) P. Karst. (Reishi) es un hongo medicinal que posee componentes bioactivos que tienen numerosas propiedades para la salud. Se lo emplea principalmente en forma de infusiones para tratar condiciones patológicas como: hepatitis, nefritis, hipertensión, hiperlipemia, artritis, neurastenia, insomnio, bronquitis, asma, úlceras gástricas, aterosclerosis, diabetes, anorexia y cáncer (Batra et al., 2013). Además, por ser un hongo de la pudrición blanca, emplea para su crecimiento tres enzimas ligninolíticas: lacasa (EC 1.10.3.2), lignina peroxidasa (EC 1.11.1.14) y manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13), las cuales poseen numerosas aplicaciones industriales (Manavalan et al., 2012).

La paja y la cascarilla de arroz son los agro-residuos más abundantes en el mundo. En efecto, poseen la mayor relación producto (arroz blanco) versus residuos (paja y cascarilla): por cada kilo de producto se produce un kilo de residuos. Algunos usos posibles para los residuos incluyen la administración a animales como forraje y la producción de energía térmica; sin embargo en general se los elimina incendiándolos *in situ*, una práctica claramente poco amigable con el medio ambiente (Lim et al., 2012). El cultivo de sólo algunos hongos ha sido reportado en estos materiales, como es el caso de *Volvariella volvacea*, sin embargo, para el cultivo de otras especies de importancia económica no existe información disponible sobre su utilización como sustrato, como es el caso de *G. lucidum*.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la factibilidad del cultivo comercial de *G. lucidum* empleando residuos de la agroindustria del arroz y luego determinar en el sustrato residual la actividad de enzimas lacasas, esto último, como una vía de incremento del valor agregado del proceso.

## 2. Metodología

### 2.1. Optimización del sustrato

La cepa del hongo *Ganoderma lucidum* E47 (CERZOS-CONICET-UNS) fue cultivada en medio MYSA (20 g extracto de malta, 2 g extracto de levadura, 10 g sacarosa, y 20 g agar por litro, pH 6) a 25 °C, en oscuridad. Se empleó el bioensayo *Test Lineal de Crecimiento* para evaluar el crecimiento del micelio en 24 formulaciones de sustrato. Los detalles del método se publicaron en Postemsky et al. (2014), brevemente, una porción de sustrato se colocó en tubos de vidrio ad hoc y luego de esterilizarlo fue inoculado con micelio de *G. lucidum*. Luego de 8 días a 25 °C y 80% se midió la extensión del micelio y la densidad aparente. Finalmente, se seleccionó una formulación entre las mejores de acuerdo con el mayor incremento en el contenido de proteínas presente en el sustrato.

## **2.2. Cultivo de *Ganoderma lucidum* en escala piloto**

Se preparó inóculo con granos de arroz (cultivo a 25 °C, en oscuridad, por 10-15 días) y se evaluó en un primer ensayo el efecto de dos tasas de inoculación (5% vs 8%). Asimismo, se evaluó el efecto de 1% de aceite de oliva (sustratos seleccionados de 2.2.). Un segundo ensayo evaluó empleando unidades experimentales del doble de tamaño y agregando al sustrato L41 sales de Cu (II) (0, 25, 50 y 100 ppm).

En ambos ensayos, la pasteurización del sustrato (20 kg) fue realizada usando una máquina hormigonera acoplada a un mechero de gas horno. El proceso consistió en calentar el sustrato hidratado hasta 80 °C y luego mantener una temperatura entre 80 °C y 90 °C (1 hora). Seguidamente se dejó enfriar el sustrato hasta los 35°C y en ese momento se añadió el inóculo. El sustrato inoculado se mezcló mediante la rotación del tambor, y luego se empaquetó (0,7 o 1,5 kg) en bolsas de polietileno denominando a esta unidad experimental con el nombre habitual de “tronco sintético”.

Los troncos sintéticos fueron colocados en estantes, apilados en 2-3 niveles a 25-30 °C, durante 14-17 días hasta que el sustrato fuera colonizado completamente y se sucedieran los primeros signos de metabolitos secundarios (exudado amarillo, naranja y marrón). En este momento, los troncos sintéticos fueron trasladados a la sala de fructificación (80-100% RH, 25-30 °C, 8 h fotoperiodo de irradiación 100-500 lux de luz fluorescente blanca). Los cuerpos fructíferos fueron cosechados y luego deshidratados a 60 °C durante 72 h.

### **2.3. Actividad de lacasas en el sustrato residual**

La actividad de lacasas se analizó determinando la cantidad de siringaldazina oxidada por minuto ( $\epsilon_{525} = 65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , absorbancia a 525 nm) de acuerdo con González Matute et al. (2013). Luego, se determinó la persistencia de la actividad enzimática en extractos crudos congelados ( $-18^\circ \text{C}$ ) y se evaluó el efecto del congelamiento/ descongelamiento ( $-18/25^\circ \text{C}$ ).

### **2.4. Análisis de los datos**

Los datos de crecimiento en el test lineal, rendimientos de hongos fueron analizados con ANOVA simple. El ANOVA doble se empleó para evaluar los efectos del cobre en dos repeticiones del ensayo y también en el análisis de la actividad de enzimas lacasa. Las diferencias detectadas por ANOVA se analizaron mediante la prueba de Tukey. Estos análisis se realizaron utilizando el software Infostat (Di Rienzo et al., 2010).

## **3. Análisis e interpretación de los resultados**

### **3.1. Optimización del sustrato**

Luego de ocho días de incubación, seis de dieciocho formulaciones de sustrato contuvieron diferentes subproductos del arroz exhibieron un mayor crecimiento del micelio y una excelente densidad aparente (Tabla 1). Se tomaron los mayores incrementos en el contenido de proteína soluble, además, se escogió entre estas seis, la formulación L4 con el fin de evaluar luego los rendimientos de producción de hongos. También, se seleccionó para el ensayo de producción a la formulación L41 ya que así sería posible estudiar el efecto del aceite de oliva en la producción de basidiomas.

### **3.2. Cultivo de *Ganoderma lucidum* en escala piloto**

Luego de determinar las condiciones óptimas de crecimiento, se estudió nuevamente la FES. En esta oportunidad, se utilizaron condiciones de cultivo semejantes a las que se encontrarían en un emprendimiento productivo. Trascurridos 34-36 días desde el momento de

inoculación, se recolectaron los basidios y se calcularon los valores de producción (Tabla 2). Se observó una diferencia considerable en el contenido de agua de hongo entre la primera y segunda oleada de fructificación, lo cual indica la conveniencia de utilizar los valores de Producción Total de Hongos (PTH) en lugar de la eficiencia biológica al momento de comparar los rendimientos de producción. Los valores más altos de PTH se hallaron en las formulaciones inoculadas en una tasa de 8%. Se observó, asimismo, que la adición de 1% de aceite de oliva al sustrato aumentó la PTH en un 10-20% (a relaciones de inóculo de 8% y 5%, respectivamente, Tabla 2).

Tabla 1. Test lineal de *Ganoderma lucidum*. Se muestran los componentes del sustrato (expresados en % del peso seco) y las medias de la distancia lineal de crecimiento (L  $\pm$ SD en cm, n=10). La densidad aparente del micelio (DA) se consideró: excelente +++, buena ++ o pobre +. Asimismo se muestran los valores medios del incremento en el contenido de proteínas soluble ( $\Delta$ P: media  $\pm$  SD en  $\mu$ g/g PS, n=3) en ciertos sustratos seleccionados. Los valores de la misma columna cuyas letras difieren fueron significativamente distintos (P> 0.05) de acuerdo con el test de Tukey.

Tratamientos *	Paja (%)	Cascarilla (%)	Salvado (%)	Aceite de oliva(%)	L (cm)	DA	$\Delta$ P ( $\mu$ g/g)
L1	59	30	10	-			
L1 <sub>1</sub>	58	30	10	1	8,8 $\pm$ 0,9 <sup>ab</sup>	+++	36 $\pm$ 19 <sup>c</sup>
L1 <sub>2</sub>	57	30	10	2	8,4 $\pm$ 0,6 <sup>abcd</sup>	++	91 $\pm$ 48 <sup>bc</sup>
L2	59	35	5	-	8,3 $\pm$ 0,9 <sup>abcde</sup>	++	51 $\pm$ 38 <sup>c</sup>
L2 <sub>1</sub>	58	35	5	1	8,6 $\pm$ 0,4 <sup>ab</sup>	+++	108 $\pm$ 47 <sup>b</sup>
L2 <sub>2</sub>	57	35	5	2	8,3 $\pm$ 0,2 <sup>bcdef</sup>	+	121 $\pm$ 9 <sup>ab</sup>
L3	69	20	10	-	8,5 $\pm$ 0,5 <sup>abcd</sup>	+++	165 $\pm$ 35 <sup>a</sup>
L3 <sub>1</sub>	68	20	10	1	7,9 $\pm$ 0,6 <sup>efghi</sup>	+	
L3 <sub>2</sub>	67	20	10	2	7,8 $\pm$ 0,5 <sup>efghi</sup>	+	
L4	69	25	5	-	8,5 $\pm$ 0,6 <sup>ab</sup>	+++	169 $\pm$ 23 <sup>a</sup>
L4 <sub>1</sub>	68	25	5	1	8,5 $\pm$ 0,3 <sup>abc</sup>	+++	119 $\pm$ 31 <sup>ab</sup>
L4 <sub>2</sub>	67	25	5	2	7,7 $\pm$ 0,7 <sup>ghi</sup>	++	
L5	79	10	10	-	7,8 $\pm$ 0,4 <sup>ighi</sup>	++	
L5 <sub>1</sub>	78	10	10	1	8,0 $\pm$ 0,7 <sup>defgh</sup>	++	

L5 <sub>2</sub>	77	10	10	2	7,6 ± 0,3 <sup>ghi</sup>	+
L6	79	15	5	-	8,0 ± 0,4 <sup>cdefg</sup>	++
L6 <sub>1</sub>	78	15	5	1	7,8 ± 0,4 <sup>efghi</sup>	++
L6 <sub>2</sub>	77	15	5	2	7,6 ± 0,6 <sup>ghi</sup>	+
L7	89	-	10	-	7,6 ± 0,4 <sup>ghi</sup>	+
L7 <sub>1</sub>	88	-	10	1	7,3 ± 0,5 <sup>i</sup>	+
L7 <sub>2</sub>	87	-	10	2	7,9 ± 0,5 <sup>efghi</sup>	++
L8	89	5	5	-	7,4 ± 0,7 <sup>eg</sup>	+
L8 <sub>1</sub>	88	5	5	1	7,9 ± 0,6 <sup>efghi</sup>	++
L8 <sub>2</sub>	87	5	5	2	7,5 ± 0,4 <sup>hi</sup>	+

\* La solución de hidratación contenía carbonato de calcio (0,2% w/w), sulfato de calcio (0,8% w/w) y agua (c.s.p. 60% contenido de humedad en el sustrato).

A continuación, se realizaron otra secuencia de ensayos empleando la formulación L41 y evaluando el uso de troncos sintéticos de mayor tamaño y diferentes niveles de Cu (II) en el rendimiento de la producción de basidiomas (Tabla 2). Se encontró que al duplicar el tamaño del tronco sintético (a 1,5 kg de sustrato y 3,5 l de capacidad), se obtuvieron rendimientos semejantes, de 30-40 g de hongos secos por kg de sustrato seco. Si se considera que al emplear cualquiera de los tamaños de tronco sintético no hubo problemas de contaminación, resulta entonces aconsejable, el uso de los troncos de mayor tamaño, ya que éstos optimizan el uso del espacio y reducen el tiempo de manipuleo.

El enriquecimiento del sustrato con sales de Cu (II) indujo una bioacumulación de este oligoelemento en el basidioma de *G. lucidum* (de 3,3 a 10,7 mg Cu (II)/100 g de hongos secos), un efecto deseable ya que incrementa aún más su valor como alimento funcional. Por otra parte, no se encontraron niveles tóxicos de metales pesados.

Tabla 2. Efecto de la tasa de inóculo y el aceite de oliva (A) y del aditivo de sales de Cu (II) (B) en la producción de *G. lucidum*. Valores medios ± SD de los rendimientos de producción se muestran en términos de eficiencia biológica (EB) y la producción de hongos totales (PHT). La actividad de lacasa en el sustrato residual se expresó en Unidades enzimáticas por kilogramo de sustrato en base seca (U/Kg PS). Los valores

dentro de una columna que lleva la misma letra no son significativamente diferentes ( $P > 0.05$ ) según la prueba de Tukey.

Tratamientos	n	EB	PHT	U/ Kg PS
<b>A. Primer ensayo</b>				
<i>Control inoculado al 5%</i>	35	11.5 ±2.8 <sup>b</sup>	2.9 ±0.8 <sup>c</sup>	
<i>Control inoculado al 8%</i>	32	13.8 ±2.8 <sup>a</sup>	3.7 ±0.4 <sup>ab</sup>	
<i>Oliva (1%) inoculado al 5%</i>	33	13.5 ±3.3 <sup>ab</sup>	3.6 ±0.6 <sup>b</sup>	
<i>Oliva (1%) inoculado al 8%</i>	34	15.3 ±3.8 <sup>a</sup>	4.1 ±0.9 <sup>a</sup>	
<b>B. Segundo ensayo</b>				
<i>0 ppm Cu(II)</i>	29	16.4±5.0 <sup>a</sup>	3.4±1.1 <sup>a</sup>	150±61 <sup>b</sup>
<i>25 ppm Cu(II)</i>	30	15.6±4.7 <sup>a</sup>	3.6±1.2 <sup>a</sup>	134±49 <sup>b</sup>
<i>50 ppm Cu(II)</i>	28	15.9±3.1 <sup>a</sup>	3.5±0.8 <sup>a</sup>	150±58 <sup>b</sup>
<i>100 ppm Cu(II)</i>	30	14.8±3.5 <sup>a</sup>	3.2±0.8 <sup>a</sup>	267±174 <sup>a</sup>

### 3.3 Actividad de lacasas en el sustrato residual

A partir de diferentes evaluaciones preliminares, se consideró que la solubilización del sustrato en agua helada fue suficiente para obtener un extracto con actividad de enzimas lacasas la solubilización del sustrato en agua helada. Ese extracto posee una actividad de 150 unidades enzimáticas por Kg de sustrato seco. Más aún, dicha actividad se incrementó en un 80% al agregar como aditivo 100 ppm de Cu (II) al sustrato. Las enzimas mantuvieron su actividad al conservar los extractos congelados por más de cuatro meses en freezer, incluso toleraron 16 ciclos de congelamiento/ descongelamiento.

Estos resultados permitieron concluir que el sustrato residual del cultivo de hongos proporciona una fuente alternativa para la obtención de estas enzimas de interés económico. Esta actividad, además de aumentar la rentabilidad del cultivo de los hongos, podría ayudar en el reciclaje y la eliminación de estos importantes residuos de la agroindustria arrocera.

## 4. Transferencia y/o impacto

Los resultados emergentes de este estudio se expusieron en el Stand de Vinculación Tecnológica del Conicet en las XII Jornadas del Arroz organizada por la Asociación Correntina de Plantadores de Arroz (Corrientes, julio-agosto, 2014). Se explicó a los



cultivadores y agentes del sector las características de esta oportunidad de diversificación productiva, a fin de generar consultas e interés.

En julio de 2014 se recorrió en la zona de Mercedes (Corrientes) una estancia arrocera, con semillero y molino arrocero propios. Durante la visita se trató con los gerentes de producción y se observaron los principales manejos del cultivo del arroz mostrando *in situ* las diferencias de los modelos de *arroz continuo*, y de *chacra espejo de arroz* (con descanso del cultivo y producción de hacienda bovina).

Actualmente el proyecto se encuentra en una etapa que amplía la tecnología a otras dos especies de hongos comestibles: *Pleurotus ostreatus* (gírgolas) y *Lentinula edodes* (shiitake). Se prevé que para el momento de finalización del proyecto, la difusión de un manual del cultivo de hongos y el dictado de un curso de cultivo de hongos, esto último en unión con agentes de transferencia agropecuaria de la zona del litoral Argentino.

## Bibliografía

Batra, P., Sharma, A.K., Khajuria, R. (2013). “Probing Lingzhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes): a bitter mushroom with amazing health benefits”. *Int. J. Med. Mushrooms* 15, pp.127-143.

Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., González, L., Tablada, M., Robledo, C.W. (2010). “InfoStat Group, FCA, National University of Córdoba, Argentina”, (en línea). Consultado en noviembre de 2013, en <http://www.infostat.com.ar>.

González Matute, R., Figlas, D.N., Devalis, R., Delmastro, S., Curvetto, N.R. (2002). “Sunflower seed hulls as a main nutrient source for cultivating *Ganoderma lucidum*”. *Micol. Apl. Int.* 14, pp.1-6.

González Matute, R., Serra, A., Figlas, D.N., Curvetto, N.R. (2011). “Copper and zinc bioaccumulation and bioavailability of *Ganoderma lucidum*”. *J. Med. Food.* 14, pp. 1273-1279.

González Matute, R., Figlas, D.N., Curvetto, N.R. (2013). “Laccases production by *A. blazei* mushroom grown either in composted or non-composted substrates. Effects of copper and zinc”. *BioTechnology: An Indian Journal* 7, pp. 102-112.

Lim, J.S., Abdul Manan, Z., Wan Alwi, S.R., Hashim, H. (2012). “A review on utilization of biomass from rice industry as a source of renewable energy”. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 16, pp.3084-3094.

Manavalan, T., Manavalan, A., Thangavelu, K.P., Heese, K. (2012). “Secretome analysis of *Ganoderma lucidum* cultivated in sugarcane bagasse”. *J. Proteomics* 77, pp. 298-309.

Postemsky, P.D., González Matute, R., Figlas, D.N., Curvetto N.R. (2006). “Optimizing *Grifola sordulenta* and *Grifola gargal* growth in agar and liquid nutrient media”. *Micol. Apl. Int.* 18, pp. 7-12.

Postemsky P.D.; Delmastro S.E.; Curvetto N.R. (2014). "Effect of edible oils and Cu (II) on the biodegradation of rice by-products by *Ganoderma lucidum* mushroom". *International Biodeterioration & Biodegradation* 93, pp. 25-32.