



Análisis de la eficiencia energética de diferentes sustratos en el crecimiento de *Ganoderma lucidum* en el marco de la producción de biomateriales fúngicos

Alumna: Ana Bezazian

Director: Raúl Fabio Itria

Codirector: Leonardo Matías Majul

Carrera Licenciatura en Ciencias Biológicas

Matrícula 2558

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

ÍNDICE

Resumen	4
Presentaciones a congresos y publicaciones.....	5
Agradecimientos.....	6
Introducción.....	7
Marco teórico.....	9
1. Biomateriales fúngicos.....	9
2. Sustratos.....	10
3. Parámetros de eficiencia energética.....	11
4. Caracterización físico-química.....	12
4.1. Hidratación y azúcares.....	13
5. Fermentación en estado sólido (SSF).....	13
5.1. Hongos de pudrición blanca.....	14
5.1.1. <i>Ganoderma lucidum</i>	14
6. Antecedentes.....	15
Objetivos e hipótesis.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos.....	16
Hipótesis.....	16
Materiales y métodos.....	17
1. Organismo utilizado en el estudio.....	17
2. Selección y caracterización de sustratos lignocelulósicos.....	17
2.1. Elección y clasificación de los sustratos.....	17
2.2. Caracterización físico-química de los sustratos.....	18
2.2.1. Fracción sólida.....	18
2.2.1.1. Selección del nivel de hidratación.....	18
2.2.1.2. Determinación de la capacidad de campo.....	19
2.2.1.2.1. Micrométodo.....	19
2.2.1.2.2. Macrométodo.....	19
2.2.2. Fracción orgánica soluble en agua.....	19
2.2.2.1. Obtención de la fracción soluble.....	19
2.2.2.1.1. Azúcares reductores.....	20
2.2.2.1.1.1. Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).....	20
2.2.2.1.1.2. Somogyi-Nelson.....	20
2.2.2.1.2. Proteínas.....	20
3. Ensayos biológicos.....	21
3.1. Crecimiento de <i>G. lucidum</i> en la fracción soluble.....	21
3.1.1. Determinación de la biomasa.....	21
3.1.2. Determinación del consumo de azúcares y proteínas.....	22

3.2.	Crecimiento de <i>G. lucidum</i> en los sustratos lignocelulósicos.....	22
3.2.1.	Determinación de la bioconversión de biomasa lignocelulósica a biomasa fúngica.....	23
3.2.1.1.	Estimación del crecimiento superficial del micelio.....	23
3.2.1.2.	Determinación del desarrollo de biomasa mediante el método de la glucosamina.....	23
	Resultados y discusión.....	25
1.	Caracterización físico-química de los sustratos.....	25
1.1.	Determinación de la capacidad de campo.....	26
1.2.	Selección del nivel de hidratación.....	28
2.	Ensayos biológicos.....	32
2.1.	Crecimiento de <i>G. lucidum</i> en sustratos lignocelulósicos.....	32
2.1.1.	Estimación del crecimiento superficial del micelio.....	32
2.2.	Fración soluble en agua.....	37
2.2.1.	Azúcares reductores.....	37
2.2.2.	Proteínas.....	41
3.	Factor de conversión de biomasa.....	42
3.1.	Biomasa en extracto de sustrato.....	42
3.2.	Biomasa en sustrato sólido.....	43
	Conclusiones.....	46
	Referencias.....	47

RESUMEN

La actual crisis climática y ambiental se debe a la actividad antropogénica, y uno de los sectores que más gases de efecto invernadero emite y que más energía demanda es el de la construcción. Los materiales utilizados para la misma representan el 9 % de las emisiones de CO₂ totales relacionadas con la energía. El desarrollo de materiales basados en organismos biológicos, como los biomateriales fúngicos o micomateriales, parece ser una alternativa viable. Para el desarrollo de estos, se utilizan sustratos lignocelulósicos provenientes de desechos de otras industrias, y hongos de pudrición blanca principalmente, como *Ganoderma lucidum*.

En este trabajo se analizó la eficiencia energética de diferentes sustratos para el crecimiento de *Ganoderma lucidum* en el marco de la producción de biomateriales. Se caracterizaron dichos sustratos en cuanto a su humedad relativa, y se estudió cuáles eran las condiciones de hidratación convenientes para el crecimiento de *G. lucidum*, si la capacidad de campo o un 75-80 % de hidratación en cada sustrato. Se decidió utilizar la capacidad de campo.

A continuación, se evaluó la velocidad de crecimiento superficial del micelio, como un indicador de eficiencia energética. Se obtuvo la mayor velocidad en cascarilla de soja seguida por bagazo de caña. Luego, se analizó si los azúcares reductores y las proteínas extraíbles en la fracción soluble en agua tenían una incidencia en el crecimiento del hongo. No se observó una correlación entre la velocidad de crecimiento del hongo y la concentración de azúcares reductores extraídos.

Finalmente, se evaluó la cantidad de biomasa fúngica producida luego del crecimiento del hongo en cada sustrato sólido y en la fracción soluble en agua. No se observaron diferencias significativas entre la biomasa producida en cada sustrato.

Con este trabajo se concluye que *G. lucidum* tiene la capacidad de crecer en una amplia variedad de sustratos ligninolíticos, como los utilizados en el presente estudio, y tiene la capacidad de colonizar sustratos con escasa disponibilidad de carbohidratos y proteínas de libre disponibilidad, como los que pueden encontrarse en los extractos acuosos provenientes del proceso de esterilización del sustrato. También, se puede concluir que la composición de los sustratos afecta al crecimiento de *G. lucidum*. Sin embargo, la velocidad de este crecimiento no está necesariamente condicionada por la concentración de azúcares reductores presentes en los extraíbles de los distintos sustratos. No obstante, este tipo de estudios constituye un avance para poder dilucidar cuáles son los factores que gobiernan la colonización fúngica de los sustratos lignocelulósicos y poder contribuir a la elaboración de biomateriales con diversas características.

PRESENTACIONES A CONGRESOS Y PUBLICACIONES

La presente tesis dio origen a los siguientes trabajos:

a) Publicación en revista con referato

Itria, R., Bezazian, A., & Majul, L. (2021). **Economía circular y biomateriales fúngicos. Perspectivas: Revista Científica de la Universidad de Belgrano**, 4(2), 65-75.

b) Resúmenes publicados en eventos de C y T

Bezazián, A. L., Majul, L. M., Itria, R. F. **Evaluación de sustratos lignocelulósicos para el desarrollo de micomateriales**. 14° Jornadas de Desarrollo Tecnológico e Innovación - TechnoINTI 2022.

Sillicaro, M. A., Marras, C. M., Bezazián, A. L., Núñez M. P., Martínez, M. E., Ríos, M. B., Itria, R. F. **Determinación del contenido de glucosamina en biomasa fúngica**. 14° Jornadas de Desarrollo Tecnológico e Innovación - TechnoINTI 2022.

Bezazián, A. L., Rivas Chueca, M., González, F., de los Hoyos, M.P., Levin, L. N., Babay, P.A., Itria, R. F., Majul, L. M, Lechner, B. E. (2022) **Ganoderma lucidum: un paso más allá de la producción de biomateriales**. *Libro de Resúmenes del VIII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC Capítulo : 1ra ed. Mar del Plata, 2022 / compilación de Franco Ceccheto ... [et al.]. - 1a ed. - Mar del Plata: Universidad Nacional de Mar del Plata, 2022. Libro digital, PDF. ISBN 978-987-811-035-6, p. 242.*

Rivas Chueca, M., Bezazián, A. L., González, F., de los Hoyos, M. P., Martínez, A. P., Levin, L. N., Babay, P. A., Itria, R. F., Lechner, B. E. (2022) **Hongos comestibles y detoxificación de aguas arsenicales**. *Libro de Resúmenes del VIII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC Capítulo : 1ra ed. Mar del Plata, 2022 / compilación de Franco Ceccheto ... [et al.]. - 1a ed. - Mar del Plata: Universidad Nacional de Mar del Plata, 2022. Libro digital, PDF. ISBN 978-987-811-035-6, p. 251.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por apoyarme en mis decisiones de carrera y en todo este proceso.

A mi hermanas Coti y Sofi, por ser mis pilares en todo lo que hago e interesarse en el mundo fungi tanto como yo.

A mis compañeros de la facultad: Karen, Manu, Anabela, Agustín, Agustina y Mica. Muchas gracias por compartir todo este camino, por su amistad, por siempre alegrarme las clases y los días de estudio y ayudarnos mutuamente dentro y fuera de las aulas.

A Nico, por ser un gran compañero en todo este proceso y siempre incentivarme a estudiar lo que me gusta.

A mi abuela, por ser mi inspiración de mujer científica.

A la UB y sus profesores, por formarme en esta profesión y brindarme las herramientas para poder llevar a cabo este trabajo.

A todo el Labo 8, por recibirme con brazos abiertos, enseñarme y ayudarme en todo lo que necesité con paciencia y buena energía.

A Leo y Paola, por brindarme su tiempo cuando no lo tenían y guiarme en todo este proceso.

A Raúl, por ser mucho más que un director. Por mostrarme este mundo de los hongos con un entusiasmo contagioso, aceptar ser mi tutor a pesar de tener otras responsabilidades, y por ofrecerme tantas oportunidades a futuro. Me incluiste en tu espacio de trabajo, te quedaste conmigo hasta cualquier hora para que yo pueda avanzar, y me guiaste tanto profesional como personalmente. Infinitas GRACIAS por todo tu tiempo y dedicación, siempre con paciencia, alegría y empatía.

INTRODUCCIÓN

La actual crisis climática y ambiental se debe a la actividad antropogénica. Factores como la excesiva y veloz extracción de recursos naturales, la deforestación y destrucción de ecosistemas, la quema de combustibles fósiles, y la emisión de gases de efecto invernadero (*GHG*, por sus siglas en inglés) están entre las principales causas del cambio climático (Skea *et al.*, 2022). Para evitar cambios drásticos e irreversibles en los sistemas naturales, es necesario mitigar las emisiones de los *GHG* (*op. cit.*). Uno de los sectores que más *GHG* emite y que más energía demanda es el de la construcción. En el año 2021, el consumo de energía de este sector aumentó por encima de los niveles pre-pandémicos, alcanzando su mayor aumento en los últimos 10 años, con una emisión de *GHG* de alrededor de 10 gigatoneladas de dióxido de carbono equivalente (GtCO_2), un 5 % superior a las emisiones en 2020 lo cual se aleja cada vez más del objetivo de “descarbonizar” el sector para 2050 (United Nations Environment Programme, 2022). Para poder reducir sus emisiones totales, este sector debe aumentar la eficiencia energética en la construcción y la inversión en la misma, reducir la huella de carbono de los materiales utilizados, y acatar las políticas y los tratados internacionales (*op. cit.*). Una posible manera de favorecer la descarbonización es mediante la búsqueda de materiales alternativos que posean una menor huella de carbono y que puedan contribuir a un esquema de economía circular (United Nations Environment Programme, 2022).

Teniendo en cuenta que los materiales utilizados para la construcción representan el 9 % de las emisiones de CO_2 totales relacionadas con la energía, un obstáculo claro para la descarbonización de la construcción es la creciente demanda de materia prima, que se espera que se duplique para el 2060 (United Nations Environment Programme, 2022). Para esto, el desarrollo de materiales basados en organismos biológicos parece ser una alternativa viable. Un ejemplo de este tipo de materiales son los biomateriales fúngicos o micomateriales. Estos son una clase de material emergente conformado principalmente por sustratos lignocelulósicos tales como como restos de poda y serrería, subproductos agrícolas, etc. sobre los que crecen determinados tipos de hongos filamentosos capaces de utilizar dicho sustrato. A medida que el micelio se desarrolla, las partículas que constituyen el sustrato lignocelulósico se aglomeran durante el crecimiento, colonización y degradación por parte del organismo (Itria, Bezazian & Majul, 2021).

El desarrollo de los micomateriales tiene una historia reciente, que se inicia con una patente donde se describe la obtención materiales a partir de fibras naturales y micelio como aglutinante (Yamanaka & Kikuchi, 1991). Desde entonces, surgieron al menos 200 patentes y 92 publicaciones científicas sobre materiales basados en hongos, con una gran variedad de usos (Sydor *et al.*, 2022). Debido a la maleabilidad de los aglomerados obtenidos, estos involucran el diseño de materiales de embalaje, cueros, aislantes, muebles, entre otras. Cuentan con la ventaja de ser biodegradables, compostables, ligeros, resistentes, ignífugos, además son buenos aislantes térmicos y acústicos (Girometta *et al.*, 2019).

Los organismos más aptos para producir micomateriales son aquellos capaces de degradar lignocelulosa: en particular los hongos causantes de pudrición blanca. Estos secretan una batería de enzimas capaces de modificar los componentes de la pared celular vegetal que se encuentran en la lignocelulosa (Goodell, 2020). Debido a esto, es posible su cultivo sobre distintos residuos lignocelulósicos provenientes de las industrias agrícola, maderera, papelera, entre otros sustratos de origen vegetal. Hasta el presente las especies más utilizadas en estos desarrollos han sido *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma oregonense*, *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*, y en menor medida *Lentinula edodes* y *Polyporus brumalis* (Cerimi *et al.*, 2019; Houette *et al.*, 2022; Sydor *et al.*, 2022). A medida que el micelio degrada la lignocelulosa, las hifas van penetrando el sustrato y lo van conglomerando. Del proceso mencionado resulta un material biodegradable, sostenible y con un alto potencial para reemplazar otros materiales sintéticos (Elsacker *et al.*, 2020).

Las propiedades de los aglomerados fúngicos son influidas por el tipo de sustrato utilizado y la especie de hongo empleada, así como también por las condiciones de cultivo (humedad, temperatura, disponibilidad de oxígeno y dióxido de carbono) y por el tratamiento posterior al cultivo (Ziegler *et al.*, 2016; Haneef *et al.*, 2017; Elsacker *et al.*, 2019; Girometta *et al.*, 2019; Houette *et al.*, 2022). Dichas variables resultan en materiales heterogéneos que difieren en sus características mecánicas y físicas, y son difíciles de caracterizar, más aún debido a la ausencia de métodos estandarizados para su análisis (Girometta *et al.*, 2019).

Principalmente, las propiedades mecánicas que se han determinado en aglomerados fúngicos fueron la fuerza de compresión, de tensión, de flexión, la deformación elástica mediante el módulo de Young, cómo también se han determinado las propiedades térmicas y el efecto de la humedad y/o la biodegradabilidad en el material (Girometta *et al.*, 2019). Si bien se han hecho ciertas correlaciones entre las condiciones del cultivo y las propiedades del material resultante (por ejemplo, Houette *et al.*, 2022), aún queda mucho por explorar en este ámbito, principalmente en lo que se refiere a variedad en las composición química de los sustratos.

La aplicación de este tipo de materiales en construcción requiere comprender los efectos de estas variables en las propiedades del material, para poder contribuir a la generación de materiales con un comportamiento predecible y que puedan efectivamente reemplazar a otros materiales con mayor huella de carbono. En base a estos antecedentes, este proyecto busca analizar la eficiencia energética de diferentes sustratos en el crecimiento de *Ganoderma lucidum* en el marco de la producción de biomateriales.

MARCO TEÓRICO

1. Biomateriales fúngicos

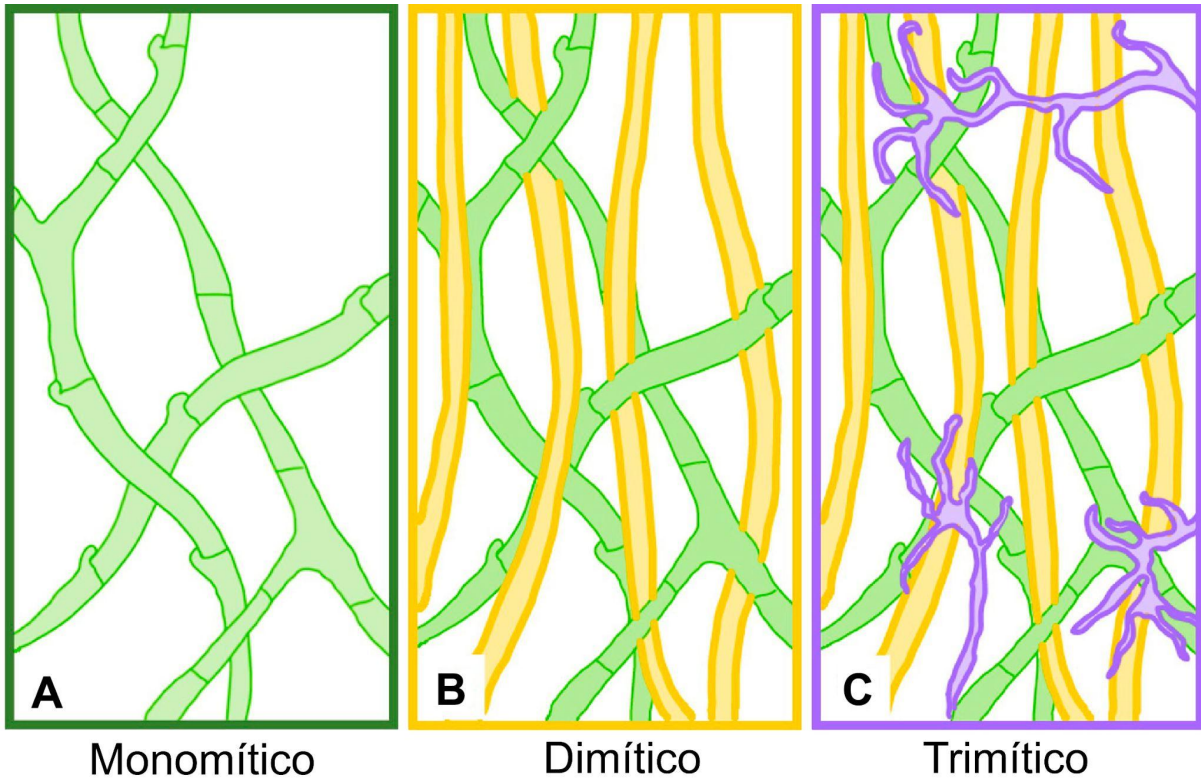
La producción de biomateriales fúngicos surge como una continuación de la producción de hongos comestibles, e implica generalmente la fermentación en estado sólido (SSF, del inglés *Solid State Fermentation*) de material lignocelulósico con especies de hongos degradadores de lignocelulosa (Terzzoli & Kuhar, 2019). Estos micomateriales tienen una serie de propiedades que los hacen ideales para una variedad de usos: son biodegradables, compostables, ligeros, resistentes, ignífugos, buenos aislantes térmicos y acústicos (Girometta *et al.*, 2019). Se los puede clasificar en (*op. cit.*):

- de alta densidad (rígidos, altamente resistentes, durables),
- de baja densidad (menos rígidos, espumas a base de micelio) y
- 100 % a base de micelio, (micelio aéreo no integrado en un sustrato)

Para la producción de estos materiales deben tenerse en cuenta los diversos factores que puedan afectar a las propiedades del material resultante. Entre ellos se puede mencionar la especie (o incluso cepa) de hongo utilizada, considerando no sólo su fisiología respecto al aprovechamiento del sustrato sino su morfología y su sistema hifal (figura 1), entre otras características. También el sustrato utilizado para el desarrollo del organismo (tipo de biomasa, estado de agregación, etc.), la interacción entre el micelio y la matriz, las condiciones durante el cultivo (por ejemplo temperatura, humedad, tenor de oxígeno, entre otras), y el protocolo utilizado para dicha producción (Elsacker *et al.*, 2020).

Figura 1

Sistemas hifales



Nota. **A:** Sistema monomítico con solo hifas generativas (verde). **B:** Sistema dimítico con hifas generativas (verdes) y esqueléticas (amarillas). **C:** Sistema trimítico con hifas generativas (verde), esqueléticas (amarillas) y ligadoras (violeta). Adaptado de Porter & Naleway (2022).

2. Sustratos

Los sustratos son cruciales para mediar el crecimiento y el desarrollo fúngico, ya que son la fuente de carbono y energía y de macro y micronutrientes tales como nitrógeno y fósforo, entre otros minerales. Varios estudios han demostrado que, tanto para la producción de biomateriales como para la producción de hongos comestibles, hay una correlación entre la granulometría y el procesamiento del sustrato, la composición química del mismo y las propiedades de los productos resultantes (Houette *et al.*, 2022; Elsacker *et al.*, 2019; Siwulski *et al.*, 2019; Appels *et al.*, 2019; Jones *et al.*, 2020; Haneef *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente, los sustratos utilizados para la formación de biomateriales fúngicos son de origen vegetal y pueden ser degradados principalmente por los hongos de pudrición blanca. No obstante, al ser subproductos de otras actividades (serrería, agroindustria, poda, etc.) requieren un procesamiento antes de darles este nuevo uso. Entre ellos, se pueden mencionar el tamizado, para la selección de la granulometría de interés y la disminución de la carga microbiana por diversos métodos físicos o químicos (autoclavado, tinalización, agua oxigenada, cloro, etc.). Por otra parte, se debe garantizar la humedad adecuada para el crecimiento óptimo del hongo y, dependiendo el caso, también pueden suplementarse con diversas enmiendas orgánicas e inorgánicas, frecuentemente mediante el uso de alfalfa y carbonato de calcio.

Las prácticas utilizadas para el cultivo de hongos comestibles sobre sustratos lignocelulósicos pueden ser tomadas como antecedente de la producción de biomateriales fúngicos (Itria, Bezazian & Majul, 2021). En ellas, usualmente el sustrato se humedece al 75-80 %, dentro de una bolsa de polipropileno. Luego se inocula con el hongo deseado en el sustrato previamente esterilizado y se deja crecer en oscuridad, con baja humedad ambiente a una temperatura óptima para la especie de hongo utilizada, hasta que se coloniza la totalidad de la bolsa (Stamets, 2000). Sin embargo, la producción de hongos comestibles busca inducir la formación de esporocarpos (setas), mientras que la producción de biomateriales fúngicos se enfoca en la parte vegetativa del ciclo de vida del hongo, y prolonga el crecimiento del micelio únicamente. Entonces, difieren en la etapa final del proceso.

A pesar de que este proceso está ampliamente difundido y que existen guías para la producción de biomateriales “en casa” que cuentan con uno o varios protocolos (por ejemplo, GrownBio, s/f), no existe evidencia científica de que el uso de determinado sustrato sea más eficiente para la producción de biomateriales fúngicos con una especie de hongo seleccionada, ni que especifique qué condiciones de cultivo resultan óptimas para su desarrollo. Por esto es necesario definir “eficiencia” a la hora de comparar un sustrato con otro para el crecimiento fúngico, y así determinar qué caracterizaciones físico-químicas de los sustratos pueden utilizarse como indicadores de la mencionada eficiencia.

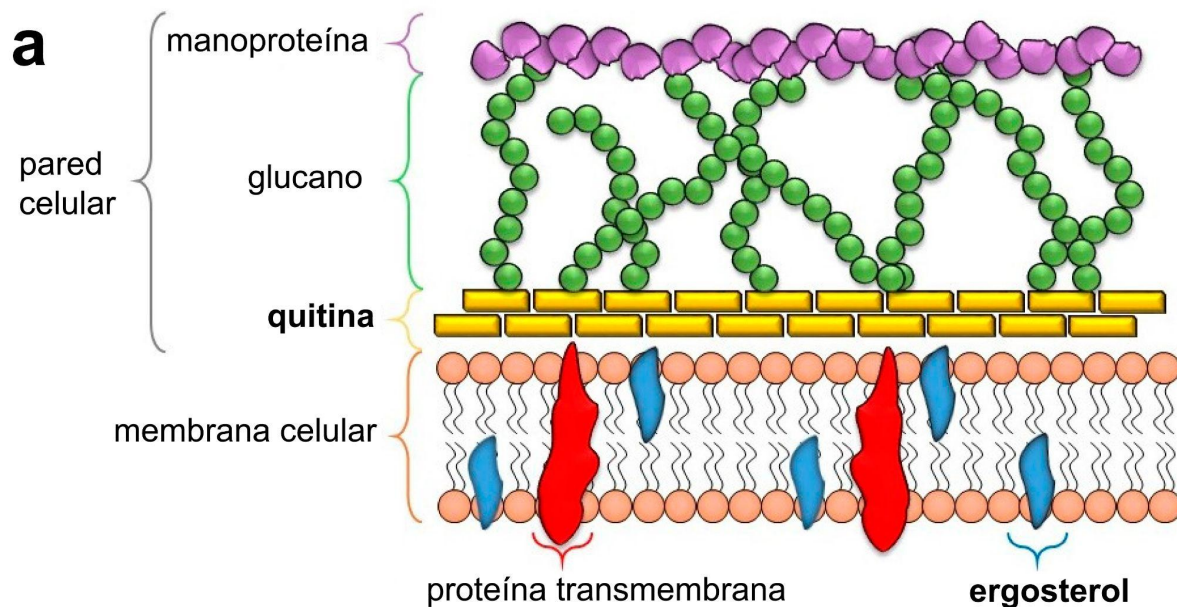
3. Parámetros de eficiencia energética

La eficiencia energética de bioconversión se puede definir como los joules (J) de biomasa fúngica producidos por los joules de sustrato consumido (Heaton *et al.*, 2016), es decir, la energía invertida para la obtención de nutrientes incorporados desde el sustrato hacia la biomasa del organismo. Dicho factor de bioconversión es afectado por numerosas variables, entre ellas la disponibilidad de nutrientes del sustrato (*op. cit.*). Esto define si el hongo debe invertir mucha energía para degradar el sustrato y poder obtener nutrientes del mismo, o si puede absorberlos directamente sin necesidad de metabolizar macromoléculas, lo cual aumentaría la eficiencia energética de la bioconversión.

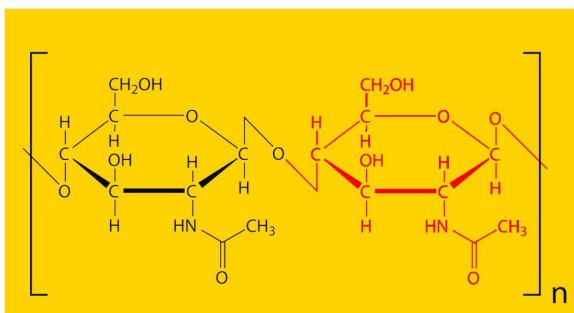
Para poder determinar la eficiencia energética de bioconversión, es necesario poder estimar la biomasa fúngica de manera cuantitativa. En el caso de los cultivos líquidos, esto resulta relativamente sencillo, ya que se puede separar la biomasa del sustrato en el cual se desarrolla mediante, por ejemplo, filtrado. Sin embargo, en el caso de crecimiento fúngico, se requieren métodos químicos complejos. El micelio, al crecer dentro del sustrato, no puede medirse por procedimientos mecánicos y/o de visualización. Para esto se pueden cuantificar moléculas características de los hongos, como la quitina o el ergosterol (figura 2), lo cual permite establecer factores de conversión que relacionen a dicho componente con la biomasa fúngica. Esto otorgaría un parámetro del crecimiento del hongo.

Figura 2

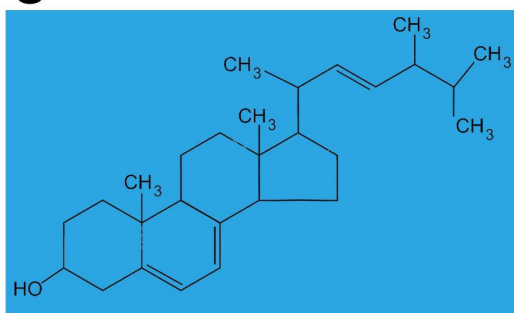
Estructura general de la membrana y pared celular fúngica



b



c



Nota. a: Organización de la membrana y de la pared celular fúngica. **b:** estructura repetitiva de la quitina. En rojo se destaca el monómero de N-acetilglucosamina, **c:** estructura del ergosterol. Adaptado de Slavin & Bach (2022).

Para decidir qué método es más conveniente utilizar, se deben tener en cuenta ciertos factores, como la composición química del sustrato (presencia y posibles interferencias), el nivel de sensibilidad requerido, rapidez del ensayo y otras consideraciones del procedimiento, como reactivos y equipos necesarios.

4. Caracterización físico-química

La caracterización físico-química del sustrato es relevante porque podría indicar si un sustrato es eficiente para el crecimiento de determinada especie de hongo o no. Se pueden hacer numerosos estudios para realizar esta caracterización, dependiendo del objeto del estudio. Para este trabajo, resulta relevante explorar parámetros como la hidratación de los sustratos y la concentración de azúcares.

4.1. Hidratación y azúcares

El agua es el medio de transporte de masa y energía durante el crecimiento fúngico. Participa aumentando la superficie disponible del sustrato y afecta las estructuras de la celulosa y la lignina, solubilizando a la hemicelulosa (Kumari & Singh, 2018). Por ello, resulta relevante explorar el nivel de hidratación conveniente para cultivar un hongo en un determinado sustrato.

El nivel de hidratación utilizado depende del objetivo del cultivo. Por ejemplo, para el cultivo de hongos comestibles, se utiliza normalmente un nivel de hidratación en exceso, entre un 75-80 % de humedad (Stamets, 2000). Si bien estos niveles se toman como una estandarización para el cultivo de hongos en general, puede resultar poco útil si se trabaja con más de un sustrato, y aún más cuando se trabaja con sustratos heterogéneos entre sí. Otro factor a tener en cuenta a la hora de definir el nivel de hidratación que conviene aplicar, es la liberación de azúcares como efecto secundario. La pectina y la hemicelulosa son solubles en agua, con lo cual al recibir hidratación ocurre la liberación de azúcares.

Existen distintos términos para explicar la hidratación de la biomasa, como la capacidad de tenencia de agua (*Water-Holding Capacity, WHC*), la capacidad de retención de agua (*Water-Retention Capacity, WRC*) y capacidad de campo (*field capacity*). La capacidad de tenencia de agua se define como la cantidad de agua retenida en la matriz de biomasa sin la aplicación de ninguna fuerza externa (Sanchez *et al.*, 2019). En cambio, la capacidad de retención de agua se define como la cantidad de agua que queda retenida en la matriz de biomasa después de la aplicación de una fuerza externa (*op. cit.*). Finalmente, la capacidad de campo (CC) corresponde a la humedad o al contenido de agua (normalmente de un suelo) posterior al drenaje de exceso de agua por acción de la gravedad (de Oliveira, 2015; Rai, Singh & Upadhyay, 2017). Asimismo, la capacidad de campo se considera el nivel óptimo de agua y aire en los suelos para el crecimiento de cultivos (Rai, Singh & Upadhyay, 2017). Estos tres términos suelen ser intercambiables (*op. cit.*). Por otra parte, también se puede hidratar un sustrato en exceso, lo cual corresponde a un nivel mayor a la capacidad de campo.

En base a la información anterior, para el presente trabajo se encontró conveniente explorar qué nivel de hidratación conviene utilizar mediante una comparación entre los niveles más utilizados de 75-80 % de humedad, y la capacidad de campo para la fermentación en estado sólido. De esta manera, se puede estandarizar el nivel de humedad en cada uno, y asegurar que no esté en exceso ni con un nivel demasiado bajo de hidratación para el crecimiento fúngico.

5. Fermentación en estado sólido (SSF)

La fermentación en estado sólido es un proceso que imita la vida natural de los hongos filamentosos (Tengerdy & Szakacs, 2003). La SSF produce enzimas derivadas del crecimiento de microorganismos sobre residuos agroindustriales, liberando compuestos bioactivos de la biomasa lignocelulósica (de Oliveira *et al.*, 2022). Es una herramienta que utiliza la biotecnología para producir ciertas biomoléculas deseadas, mediante un procedimiento económico, con alta productividad y rendimiento, que a su vez agrega valor a residuos (*op. cit.*). Por ello, se utiliza para la producción de hongos comestibles y, por

consiguiente, para la de biomateriales fúngicos.

Durante este proceso, los hongos se encuentran en condiciones restrictivas en cuanto a disponibilidad de nutrientes, y deben desarrollar sistemas enzimáticos más eficientes de degradación para poder acceder a ellos (Tengerdy & Szakacs, 2003). En primer lugar, los hongos buscan colonizar el sustrato mediante adhesión, y se ramifican para propagarse desde una partícula a la otra. Luego, logran acceder al sustrato inicialmente gracias a fisuras o huecos en la pared celular de las plantas (*op. cit.*). Su crecimiento durante las SSF en sustratos lignocelulósicos evidencia una tasa lineal, aunque se ve limitado por la accesibilidad al sustrato y por el impedimento estérico (*op. cit.*).

A la hora de llevar a cabo una SSF, se deben tener en cuenta los factores que la afectan, como el microorganismo utilizado, el tipo de sustrato, y las condiciones de fermentación (de Oliveira *et al.*, 2022; Tengerdy & Szakacs, 2003). En esta sección, se explorará el tipo de organismo utilizado para este trabajo.

5.1. Hongos de pudrición blanca

Los hongos de pudrición blanca (*WRF*, por sus siglas en inglés) son un grupo ecofisiológico de organismos que tienen la capacidad de degradar lignina presente en el ambiente mediante la secreción de una serie de enzimas ligninolíticas, como lacasas, manganeso peroxidases (MnPs) y lignina peroxidases (LiPs) (D'Souza *et al.*, 1999). Son los descomponedores más eficientes de madera y de otras fuentes naturales de lignocelulosa, junto con otros hongos (Tengerdy & Szakacs, 2003).

A medida que el micelio degrada la lignina, la celulosa y la hemicelulosa para absorber los nutrientes, las hifas van penetrando el sustrato al tiempo que lo van conglomerando. Esta característica los convierte en candidatos ideales para el desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas, como la producción de biomateriales fúngicos (Elsacker *et al.*, 2019). Como se mencionó anteriormente, las especies más utilizadas para este fin dentro de este grupo son *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma oregonense*, *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*, y en menor medida *Lentinula edodes* y *Polyporus brumalis* (Cerimi, *et al.*, 2019; Houette *et al.*, 2022; Sydor *et al.*, 2022).

5.1.1. Ganoderma lucidum

Ganoderma lucidum (*G. lucidum*) es un hongo basidiomicete de la familia Ganodermataceae. Este hongo se destaca por sus propiedades comestibles y medicinales, y desde hace tiempo es utilizado en la medicina tradicional china. En la actualidad es explotado por sus propiedades hipoglucémicas y para su empleo en terapias antitumorales (Shiao *et al.*, 1994).

G. lucidum se puede cultivar sobre sustratos lignocelulósicos, tales como residuos agrícolas, restos de poda y serrería u otros sustratos de origen vegetal, lo cual permite el reaprovechamiento de residuos. El cultivo de este hongo resulta de interés biotecnológico debido a su producción de enzimas ligninolíticas y lignocelulósicas, que son ampliamente requeridas para distintas aplicaciones

(Rani *et al.*, 2008). La producción de dichas enzimas está relacionada con el aprovechamiento del sustrato (Rani *et al.*, 2008; Isikhuemhen *et al.*, 2009).

6. Antecedentes

Actualmente, existen al menos 200 patentes y 92 publicaciones científicas sobre materiales basados en hongos, con una gran variedad de usos (Sydor *et al.*, 2022). Como antecedente del estudio de la relación entre el uso de distintos sustratos y las propiedades físicas, químicas y mecánicas de materiales biobasados puede mencionarse el trabajo de Haneef *et al.* (2016), donde se cultiva *G. lucidum* y *Pleurotus ostreatus* en dos sustratos con diferente composición química (celulosa y celulosa-dextrosa de papa), se los someten al procesamiento para generar aglomerado, y estudian las concentraciones relativas de macromoléculas (polisacáridos, lípidos, proteínas y quitina) en las estructuras finales. Además, correlacionan dichas concentraciones con alteraciones en las propiedades mecánicas y en la morfología de los materiales resultantes.

Por otro lado, en el trabajo realizado por Elsacker *et al.* (2019), se estudian dichas propiedades y el proceso de producción de compuestos basados en diferentes sustratos lignocelulósicos y el WRF *Trametes versicolor*. Además, Siwulski *et al.* (2019) estudian cómo la composición química del sustrato afecta al rendimiento del crecimiento y a los niveles de elementos químicos presentes en los carpóforos de numerosas especies de hongos, entre ellos *G. lucidum*.

En tercer lugar, Appels *et al.* (2019) analizan el papel de la especie utilizada en la determinación de la rigidez y la resistencia al agua del micomaterial. También, Jones *et al.* (2020) investigan de qué manera la estructura de las hifas de los Basidiomicetes y los sistemas hifales en su conjunto afectan las propiedades mecánicas del biomaterial.

Asimismo, Houette *et al.* (2022) analizaron el proceso de crecimiento y el comportamiento mecánico de materiales compuestos cultivados a partir de especies fúngicas utilizadas en biorremediación. Se estudiaron los efectos de las siguientes variables en el comportamiento mecánico del biomaterial: tamaño de partícula del sustrato (con o sin micropartículas), especies de hongos (*Pleurotus ostreatus* y *Coprinus comatus*) y tratamiento posterior al crecimiento (secado, horneado, compactado y luego secado, y compactado y luego horneado).

En base a estos antecedentes, para el objetivo de este trabajo resulta relevante analizar cómo afecta la calidad del sustrato lignocelulósico al crecimiento fúngico, y cómo podría influir eso en el material resultante.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivos

Objetivo general:

Analizar la eficiencia energética de diferentes sustratos para el crecimiento de *Ganoderma lucidum* en el marco de la producción de biomateriales.

Objetivos específicos:

- Seleccionar diferentes sustratos con variedad de composiciones químicas y caracterizarlos.
- Dilucidar las condiciones de hidratación convenientes para el crecimiento de *G. lucidum*.
- Estudiar tanto la fase sólida como la fracción soluble extraíble de cada sustrato.
- Analizar la conversión de cada sustrato en biomasa fúngica y determinar la eficiencia energética de cada uno.

Hipótesis

- Los sustratos que poseen una mayor concentración de azúcares libres son más eficientes para el crecimiento del hongo *Ganoderma lucidum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Organismo utilizado en el estudio

Se utilizó la cepa E47 (Universidad de Guelph, Canadá) del hongo de pudrición blanca *Ganoderma lucidum*. El mantenimiento de la misma se realizó en extracto de malta agarizado a 4 °C. El extracto de malta agarizado (MEA) consiste en 12,7 g de extracto de malta, 10 g de glucosa y 20 g de agar por litro de agua destilada. Dicha cepa se encuentra depositada en el cepario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (BAFC Cult).

2. Selección y caracterización de sustratos lignocelulósicos

Los sustratos lignocelulósicos fueron obtenidos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FCEN-UBA), y mantenidos en una cámara fría a 4 °C en oscuridad.

2.1. Elección y clasificación de los sustratos

Se seleccionaron 15 sustratos lignocelulósicos para este trabajo, clasificados según su tipo o estado de agregación y origen, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

Granulometría de los sustratos clasificada como cáscara, cascarilla/piel, aserrín y bagazo/paja.

Origen	Tipo			
	Cáscara	Cascarilla/piel	Aserrín	Bagazo/paja
Álamo			✓	
Algarrobo blanco			✓	
Algarrobo colorado			✓	
Avena		✓		
Caña de azúcar				✓
Eucalipto			✓	
Girasol		✓		
Kiri			✓	

Maní	✓	✓	
Paraíso			✓
Pino			✓
Pistacho	✓		
Soja		✓	
Trigo			✓

Todos los sustratos fueron procesados con un molinillo de Butt, a una velocidad de 18000 rpm con 1/5 hp de potencia (Decalab S. R. L., Argentina) y luego tamizados con una malla de hasta 2,8 mm para que mantengan la misma granulometría, de modo que dicha variable no interfiera en el análisis.

2.2. Caracterización físico-química de los sustratos

Se llevó a cabo una caracterización físico-química de los sustratos, teniendo en cuenta el nivel de hidratación más conveniente para la fermentación en estado sólido, y los niveles de azúcares reductores liberados por cada sustrato en el agua libre o intersticial.

Dicha caracterización se realizó en dos niveles: la fracción sólida de los sustratos y la fracción orgánica soluble en agua (es decir, los componentes orgánicos extraíbles en agua provenientes de la biomasa).

2.2.1. Fracción sólida

La fracción sólida se refiere a la biomasa lignocelulósica de los sustratos. La caracterización de la fracción sólida se basó en determinar el nivel de hidratación más conveniente para llevar a cabo los ensayos biológicos, teniendo en cuenta el crecimiento del micelio y la liberación de extraíbles orgánicos solubles en agua.

2.2.1.1. Selección del nivel de hidratación

En primer lugar, se determinó el peso seco de los sustratos, para lo cual se colocó aproximadamente 1 g de cada sustrato, por triplicado, en pesafiltros previamente pesados, secándolos en estufa a 80 °C hasta peso constante en balanza analítica. De la diferencia de la tara de los pesafiltros con el peso final constante, se calculó el porcentaje de humedad de cada sustrato evaluado.

Se llevaron a cabo dos tratamientos: cultivos en SSF con un nivel de humedad de un 75 % y cultivos a capacidad de campo, la cual se determinó experimentalmente. Para esto se realizó un relevamiento

preliminar con 6 sustratos. Luego, se midió la velocidad de crecimiento radial de cada tratamiento, para evaluar la velocidad de crecimiento (ver sección 3.2.1.1).

2.2.1.2. Determinación de la capacidad de campo

Se determinó la capacidad de campo mediante dos metodologías, un micrométodo y un macrométodo, como se describe a continuación.

2.2.1.2.1. Micrométodo

Esta metodología consistió en utilizar una cantidad mínima de sustrato (1 a 2 g en base seca) colocada en crisoles de Gooch previamente tarados. Luego, se colocó agua destilada en exceso (aproximadamente 30 mL), dejando escurrir por gravedad dentro de una cámara húmeda, para evitar que se secase el sustrato. Una vez escurrida el agua, se pesó en balanza analítica y se calculó el agua retenida en cada sustrato de la siguiente manera (Sanchez *et al.*, 2019):

$$CC = \frac{Ph - Ps}{Ps}$$

En donde *CC* es capacidad de campo, *Ph* el peso del sustrato posterior a la hidratación, y *Ps* el peso del sustrato previo a la hidratación.

2.2.1.2.2. Macrométodo

En esta metodología se utilizó una mayor cantidad un orden de magnitud superior: se pesaron aproximadamente 10 g húmedos de cada sustrato en un Erlenmeyer de 500 mL, y se agregó agua destilada en exceso (entre 300 y 400 mL). Luego, se dejó en agitación a 28 °C y 20 rpm entre 6 y 12 h para permitir la humectación completa del sustrato. A continuación, los sustratos se colocaron en un embudo de Büchner con una malla de poliéster de 0,2 mm de poro, previamente tarada. Se dejó escurrir la totalidad del agua por gravedad. Finalmente, se pesó el sustrato húmedo y se calculó la capacidad de campo (Sanchez *et al.*, 2019). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.2.2. Fracción orgánica soluble en agua

Para extraer los componentes solubles en agua (principalmente azúcares) de los sustratos, se realizó una extracción a distintos niveles de hidratación (Liu *et al.*, 2015).

2.2.2.1. Obtención de la fracción soluble

En primer lugar, se colocó una masa determinada de cada sustrato en tres tubos de ensayo, se hidrataron hasta superar la capacidad de campo por un volumen equivalente a 0,5; 1 y 2 veces dicha capacidad de campo respectivamente. De esta manera, se obtuvieron 3 tubos de cada sustrato con sobrenadantes diluidos equivalentes entre sí. Luego, se autoclavaron durante 1 h a 130 °C para someter al sustrato a las mismas condiciones de una SSF. Una vez que alcanzaron la temperatura ambiente se tomaron alícuotas para posterior análisis de azúcares reductores.

En base a los resultados obtenidos de los análisis de esta extracción, se seleccionó el nivel de dilución requerido para realizar cultivos en la fracción soluble (ver sección 3.1).

2.2.2.1.1. Azúcares reductores

A lo largo del trabajo, se utilizaron dos métodos para determinar los azúcares reductores: el del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y el de Somogyi-Nelson. La selección de la técnica a utilizar se basó en la sensibilidad requerida para el ensayo en cuestión. El método de DNS se utilizó para las determinaciones de azúcares de los sobrenadantes de la sección 2.2.2.1, y el método de Somogyi-Nelson se utilizó para la determinación de azúcares de los cultivos en medio líquido de la sección 3.1.2.

2.2.2.1.1.1. Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Para llevar a cabo la técnica de DNS (Miller, 1959), se tomó 1 mL de cada sobrenadante y 1 mL de DNS, se hirvió la solución durante 5 minutos a 100 °C (con tapa para evitar la evaporación), se enfrió en un baño con hielo y finalmente se midió la absorbancia a $\lambda = 540$ nm en el espectrofotómetro.

Previamente se realizó una curva de calibración a partir de diluciones 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 de una solución patrón de 1000 mg/L de glucosa. Para hacer la solución patrón, se pesó 1000 mg de glucosa en un vaso de precipitado, y se disolvió con agua destilada. Luego se llevó a volumen final de 1 L en un matraz aforado. Las diluciones se hicieron tomando un volumen determinado de la solución patrón (0,31; 0,62; 1,25 y 2,5 μ L respectivamente), y llevando a un volumen final de 1 mL con agua destilada. Cada dilución se hizo por triplicado. Se realizó la reacción correspondiente con el DNS y se leyó la absorbancia a $\lambda = 540$ nm en el espectrofotómetro.

2.2.2.1.1.2. Somogyi-Nelson

Para medir azúcares reductores mediante la técnica de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1952), se tomaron 0,5 mL de muestra y 0,5 mL de reactivo de Somogyi, se colocaron en un tubo de ensayo de vidrio y se calentó durante 15 minutos a 100 °C (con tapa para evitar la evaporación). Luego se enfrió en un baño con hielo. Posteriormente, se agregaron 0,5 mL de reactivo de Nelson, se agitó con un vortex, y se agregaron 6 mL de agua destilada, se agitó por inversión, y finalmente se midió la absorbancia de cada tubo a $\lambda = 540$ nm en el espectrofotómetro, contra un blanco de 0,5 mL de agua destilada en lugar del volumen de la muestra.

Previamente se realizó una curva de calibración a partir de diluciones de una solución patrón de 1000 mg/L de glucosa.

2.2.2.1.2. Proteínas

Se midió la concentración de proteínas en los cultivos en medio líquido descrito en la sección 3.1.2 mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976). Se tomaron 100 μ L de cada sobrenadante a los

que se le agregó 1 mL de reactivo de Bradford, y se mezcló con un vortex. Luego, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a $\lambda = 595$ nm.

Previamente se realizó una curva de calibración utilizando una solución patrón de BSA (albúmina de suero bovino) de 1 mg/mL.

3. Ensayos biológicos

Se realizaron ensayos biológicos que consistieron en el cultivo de *G. lucidum* en dos fracciones de cada sustrato: en la fracción soluble extraída, y en la fracción sólida (biomasa lignocelulósica). En cada caso se determinó la biomasa fúngica para evaluar el crecimiento del hongo.

3.1. Crecimiento de *G. lucidum* en la fracción soluble

Estos ensayos sobre la fracción soluble extraída se realizaron para determinar la calidad nutricional para *G. lucidum* de los azúcares y las proteínas liberadas por la biomasa lignocelulósica.

Para obtener los extractos se pesaron 3 g (peso seco) de cada sustrato en un Erlenmeyer, y se agregó una cantidad de agua correspondiente a dos capacidades de campo (Motsara & Roy, 2008). Se realizaron 3 réplicas por sustrato. Dado que el objetivo es evaluar los extraíbles presentes en la fase líquida dentro de una SSF, y el proceso de autoclavado puede incidir en su composición, se siguió el protocolo de esterilización previamente explicado en la sección 2.2.2.1. Una vez a temperatura ambiente, se separó la fase líquida de la sólida mediante centrifugación a 1000 g durante 5 min. Se tomaron alícuotas de 7 mL del sobrenadante para posterior análisis. Luego, se diluyó cada extracto con agua destilada hasta un volumen final de 25 mL, de modo que la concentración final de azúcares reductores sea ≈ 60 mg/L. Esta concentración se determinó en base a las concentraciones de azúcares reductores obtenidas (mediante la técnica de DNS) de los extractos descritos en la sección 2.2.2.1, y a partir de este valor se obtuvo la dilución necesaria para cada sustrato.

De los 25 mL de extracto diluido, se tomaron 5 mL para posterior análisis, y los 20 mL restantes fueron inoculados con porciones de 2 mm² de colonias de *G. lucidum* en crecimiento exponencial en medio agar-agua (20 g/L agar en agua destilada) para evitar la inferencia de nutrientes provenientes del inóculo. Los cultivos incubaron durante 7 días en oscuridad a 28 °C y se separó el sobrenadante de cultivo de la biomasa fúngica mediante filtración por bomba de vacío. Se tomaron alícuotas de 7 mL del sobrenadante, y se recuperó la biomasa. Ambos se mantuvieron a - 20 °C para posteriores análisis.

3.1.1. Determinación de la biomasa

Se determinó la biomasa luego de 7 días de crecimiento, utilizando las muestras de micelio mantenidas a - 20 °C mencionadas anteriormente y se llevó a cabo el método de la glucosamina (ver sección 3.2.1.2).

3.1.2. Determinación del consumo de azúcares y proteínas

Para determinar el consumo de azúcares reductores y de proteínas en los cultivos en la fracción soluble, se tomaron alícuotas del medio líquido antes y después de la inoculación y crecimiento de *G. lucidum*. Luego, se midieron azúcares reductores mediante la técnica de Somogyi-Nelson (ver sección 2.2.2.1.1.2), y se midieron proteínas mediante la técnica de Bradford (ver sección 2.2.2.1.2) en ambos casos. Se compararon los resultados antes de la inoculación y después de los 7 días de crecimiento para estimar el consumo de azúcares.

3.2. Crecimiento de *G. lucidum* en los sustratos lignocelulósicos

Se realizaron cultivos por fermentación en estado sólido de *G. lucidum* sobre 15 sustratos lignocelulósicos (ver tabla 1).

En cuanto a la fase sólida de los extractos de la sección 3.1, se recuperaron los 3 g de cada sustrato, que se encontraban “lavados” debido al exceso de agua y se colocaron en placas de Petri para posterior autoclavado. Una vez esterilizadas, se inocularon con *G. lucidum* en crecimiento exponencial (previamente cultivado en MEA), y se dejaron crecer durante una semana en oscuridad a 28 °C. Una vez pasado este tiempo, se mantuvieron en el freezer a -20 °C para detener el crecimiento hasta la determinación de la biomasa.

Por otro lado, para la selección del nivel de hidratación se pesaron 3 g (peso seco) de cada sustrato en una placa de Petri, y se colocó el nivel de agua requerido dependiendo del tratamiento (75 % de humedad o capacidad de campo). Una vez realizado esto, se esterilizaron las placas en autoclave a 130 °C durante 1 h, y se dejaron enfriar. Cuando estuvieron a temperatura ambiente, se inocularon con una porción de agar de 2 m² una colonia de *G. lucidum* en crecimiento exponencial e incubó a 28 °C durante 10 días en oscuridad.

En la tabla 2 se puede ver un resumen de la composición de las placas para cada tratamiento.

Tabla 2

Composición del medio de cultivo para la SSF según el tratamiento.

Tratamiento	Masa de sustrato (g)	Cantidad de agua (g)
Hidratación al 75 %	3 (peso seco)	9
Hidratación a capacidad de campo	3 (peso seco)	depende del sustrato
Sustratos luego de la extracción de la fracción soluble en agua	~3 (peso húmedo)	en exceso, luego escurrida

3.2.1. Determinación de la bioconversión de biomasa lignocelulósica a biomasa fúngica

Para determinar la bioconversión de biomasa lignocelulósica a biomasa fúngica, se tuvieron en cuenta parámetros cualitativos y cuantitativos. Por un lado, se estimó el crecimiento superficial del micelio mediante la velocidad de crecimiento radial, y por el otro se determinó el desarrollo de biomasa fúngica mediante el método de la glucosamina.

3.2.1.1. Estimación del crecimiento superficial del micelio

La estimación del crecimiento superficial del micelio se realizó a nivel observacional y se estimó la velocidad de crecimiento radial de los cultivos midiendo el radio de crecimiento de las colonias cada 24-48 h utilizando una lupa (20 X) y una regla (± 1 mm). Para estimar la velocidad de crecimiento se graficó el radio de crecimiento en función del tiempo y estimó la pendiente de la curva en la fase de crecimiento exponencial (fase lineal).

3.2.1.2. Determinación del desarrollo de biomasa mediante el método de la glucosamina

Para determinar la biomasa tanto de los cultivos en la fracción soluble como de las fermentaciones en estado sólido, se utilizó un método basado en la determinación de contenido de glucosamina en biomasa fúngica (Silicaro *et al.*, 2022; Terebiznik & Pilosof, 1999). Dicho método consiste en hidrolizar la quitina hasta la obtención de sus monómeros (glucosamina), y medir esta última mediante técnicas de espectrofotometría.

La metodología para determinar biomasa mediante la medición de glucosamina consta de tres partes:

1. **Hidrólisis:** las muestras se sometieron a una digestión ácida, en tubos de borosilicato con tapas y contratapa de teflón, con 5 mL HCl 6 N a 100 °C en termobloque (HACH modelo DRB 200) durante 4 horas. Luego, se tomaron alícuotas de 1,5 mL en tubos tipo Eppendorf y se centrifugaron por 10 minutos a 14.000 rpm. Finalmente, se colocaron 0,5 mL del sobrenadante en tubos de hemólisis para el siguiente paso.
2. **Alcalinización:** se les adicionaron 1,5 mL de NaOH 3N junto a 1,5 mL de Na₂HPO₄ 0,2 N a los tubos del paso anterior, se agitó cada muestra con un vortex, verificando que el pH final sea aproximadamente 8,00.
3. **Reacción:** de la solución obtenida en el paso anterior se la trasvasaron alícuotas de 0,5 mL a tubos de borosilicato, y se le adicionaron 0,5 mL del reactivo A (1 mL de acetilacetona y 50 mL Na₂CO₃ 0,25 M). Se calentaron las muestras durante 20 minutos a 100 °C. Una vez enfriados, se agregaron 3 mL de etanol 96°, y se agitó con un vortex. A continuación, se agregaron 0,5 mL del reactivo B (2,67 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 100 mL de una solución 1:1 de HCl y etanol 96°). Posteriormente, se calentaron las muestras durante 10

minutos a 70 °C y se enfriaron luego a temperatura ambiente. Después, se midió la absorbancia a $\lambda = 530$ nm en el espectrofotómetro (Shimadzu modelo UV mini-1240). Con las absorbancias obtenidas se interpolaron los datos de la curva de calibración correspondiente del patrón de glucosamina ($R^2 = 0,9851$).

Este mismo protocolo se aplicó a las fermentaciones en estado sólido usando 3 mL de ácido clorhídrico 6 N, en lugar de 5 mL en el paso 1.

Para estimar la biomasa correspondiente a los cultivos de *G. lucidum* se realizaron dos curvas de calibración: la primera relaciona la concentración de glucosamina con la absorbancia y tener así parámetros referidos a los monómeros de quitina, y la segunda relaciona los miligramos de biomasa fúngica con la concentración de glucosamina.

Curva de calibración de glucosamina

Se utilizó como patrón D (+) glucosamina, calidad analítica (Sigma, St. Louis, EEUU). Posteriormente, se siguió el protocolo anterior a partir de la reacción del paso 3, y se midió la absorbancia a $\lambda = 530$ nm.

Estimación del contenido de glucosamina del micelio. Correlación biomasa/glucosamina.

Se realizaron cultivos de *G. lucidum* en medio líquido, en condiciones estáticas, en extracto de malta glucosado (12,7 g/L de extracto de malta, 10 g/L de glucosa) durante 15 días. Luego, se recuperó el micelio por filtración con papel de filtro Whatman 42 (Whatman, Reino Unido). El micelio recuperado se deshidrató con etanol 96°. A continuación, se pasó el micelio a un mortero, se congeló con nitrógeno líquido y molió hasta que el micelio quedara como un polvo fino. Se determinó el peso seco del micelio pulverizado y se realizó una curva de calibración con distintas masas de micelio a las que se determinó el contenido de glucosamina mediante el procedimiento completo previamente descrito (hidrólisis, alcalinización y reacción) para obtener la correlación entre masa de micelio y concentración de glucosamina correspondiente en cada caso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización físico-química de los sustratos

En primer lugar, se obtuvieron los valores de humedad relativa de cada sustrato para estimar su nivel de hidratación inicial. Los valores de humedad relativa de cada sustrato están en la tabla 3:

Tabla 3

Humedad relativa de cada sustrato

Sustrato	Humedad relativa (%)
Bagazo de caña	18
Cascarilla soja	13
Eucalipto	13
Kiri	12
Cascarilla avena	12
Paja trigo	11
Cascarilla girasol	11
Pino	10
Paraíso	9,8
Algarrobo colorado	9,6
Algarrobo blanco	9,4
Cáscara maní	8,5
Álamo	8,5
Piel de maní	7,8

Cáscara de pistacho 7,0

Como se puede observar, el sustrato con menor porcentaje de humedad resultó la cáscara de pistacho mientras que el bagazo de la caña de azúcar resultó tener unas 2 veces y media más agua en las condiciones de conservación (cámara fría a 4 °C).

1.1. Determinación de la capacidad de campo

Para determinar la capacidad de campo (Cc) con un micrométodo diseñado *ad hoc*, se seleccionaron 10 sustratos al azar, y se obtuvieron los valores que se muestran en la siguiente tabla 4:

Tabla 4

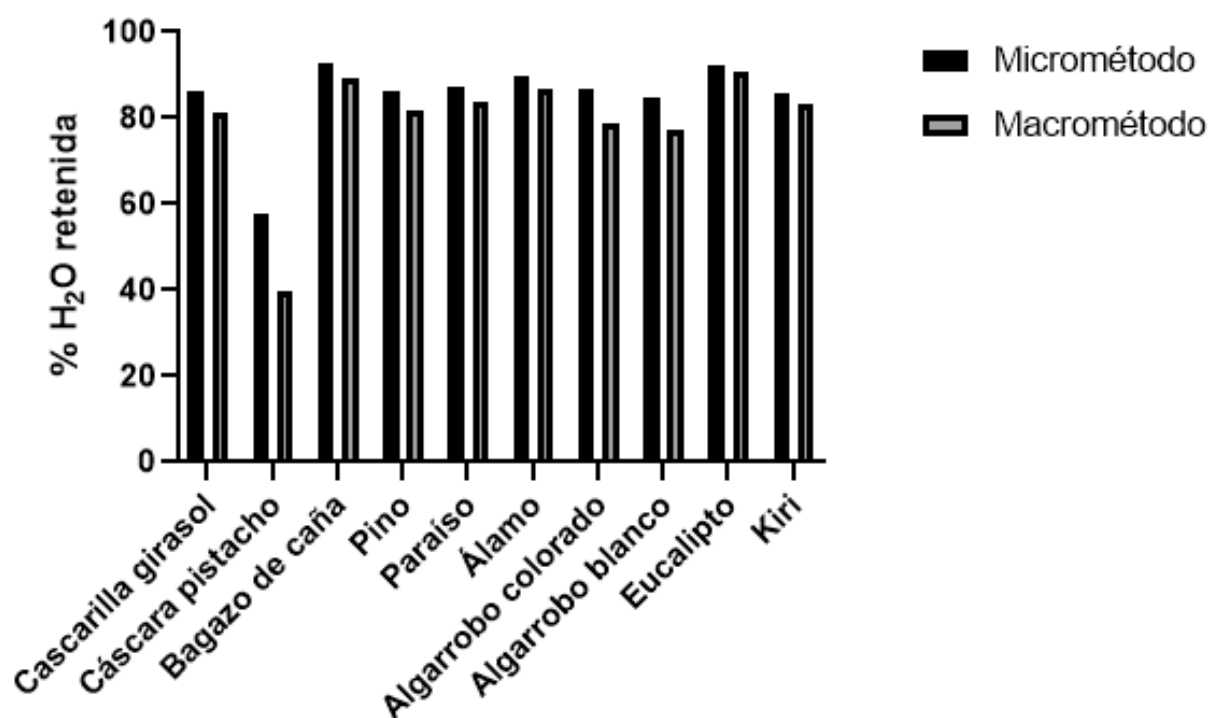
Valores de capacidad de campo obtenidos mediante el micrométodo

Sustratos	% H ₂ O retenida
Cascarilla girasol	86,34
Cáscara pistacho	57,53
Bagazo de caña	92,84
Pino	86,29
Paraíso	87,40
Álamo	89,53
Algarrobo colorado	86,75
Algarrobo blanco	84,81
Eucalipto	92,21
Kiri	85,94

Con estos valores se calcularon los volúmenes de agua necesarios para disponer los sustratos en cajas de Petri, de manera tal de asegurar que el agua no estuviera en exceso. Se observó tanto la humectación del sustrato como un excedente de agua. Por este motivo se diseñó un macrométodo, consistente en aumentar en un orden de magnitud las cantidades de sustrato y agua. De la comparación del micro y macrométodo se observa que el primero sobreestima la CC, como puede observarse en la figura 3.

Figura 3

Comparación de la capacidad de campo obtenidas mediante el micrométodo y el macrométodo

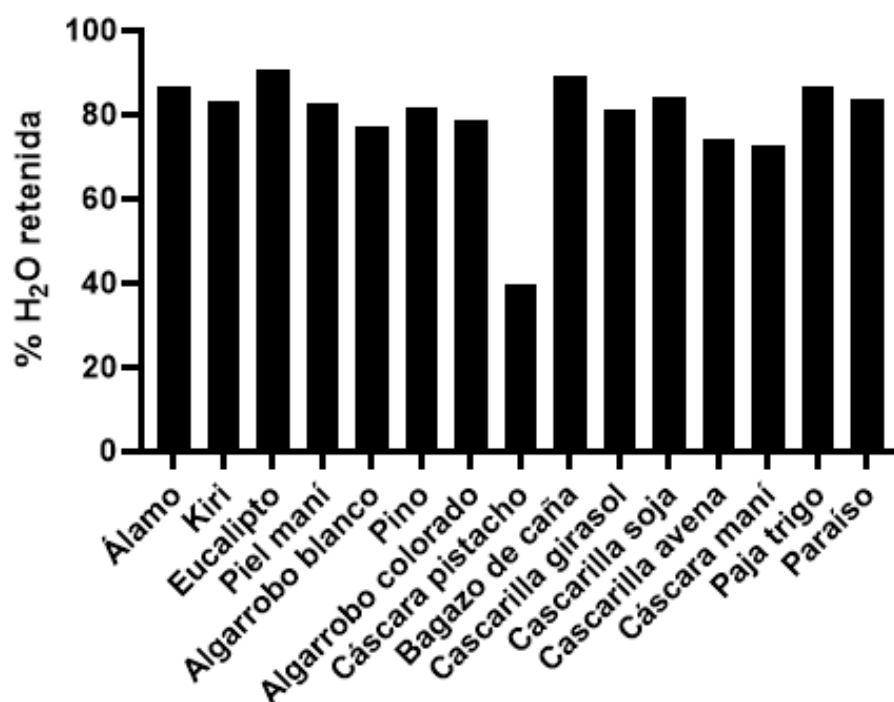


Nota. Comparación de las capacidades de campo de 10 sustratos lignocelulósicos, obtenidas mediante ambos métodos (negro: micrométodo y gris: macrométodo), expresada como porcentaje de agua dentro del sistema.

Se utilizó el macrométodo para la totalidad de los sustratos, como se observa en la figura 4.

Figura 4

Capacidad de campo de la totalidad de los sustratos



Nota. Capacidad de campo de los 15 sustratos estudiados obtenida mediante el macrométodo, expresada como porcentaje de agua dentro del sistema.

Con los valores de CC así obtenidos se observó la completa humectación de todos los sustratos, sin que hubiera exceso de agua.

Las diferencias observadas entre el micro y el macro método pudieron deberse a que, al medir volúmenes y masas pequeños, el error de la medición aumenta ya que, al tomar masas pequeñas, se observa una mayor dispersión de los replicados, lo cual genera un aumento en la incertidumbre final.

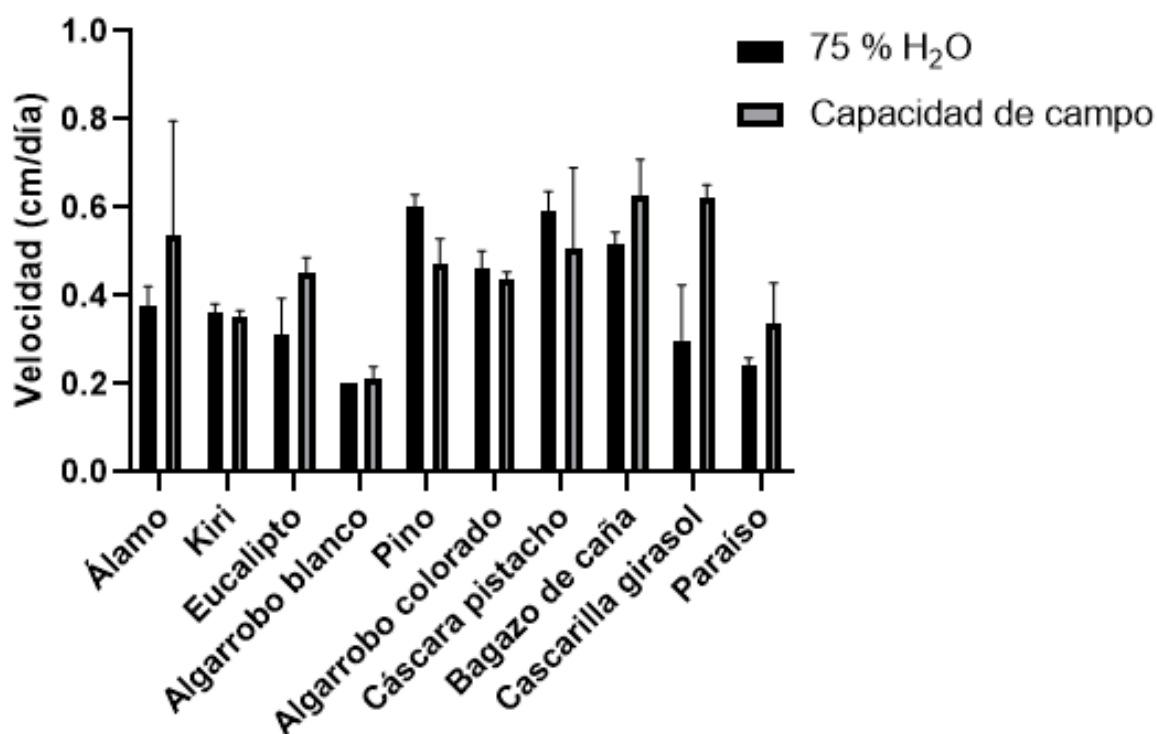
Como se puede observar, la gran mayoría de los sustratos posee una capacidad de campo de entre un 70-80 %, a excepción de la cáscara de pistacho. Esto concuerda con los protocolos utilizados para el cultivo de hongos comestibles y para la producción de biomateriales, en donde usualmente se emplea entre un 75 y un 80 % de humedad (Stamets, 2000; Tacer-Caba *et al.*, 2020).

1.2. Selección del nivel de hidratación

Como se mencionó en el apartado anterior, los sustratos suelen humedecerse entre un 75 y un 80 %. Para evaluar el grado de hidratación más conveniente, se cultivó el hongo en diez sustratos diferentes tanto a 75 % de humedad como a capacidad de campo, midiendo la velocidad de crecimiento radial. Se obtuvieron los siguientes resultados (figura 5):

Figura 5

Comparación de la velocidad de crecimiento radial en dos tratamientos de hidratación



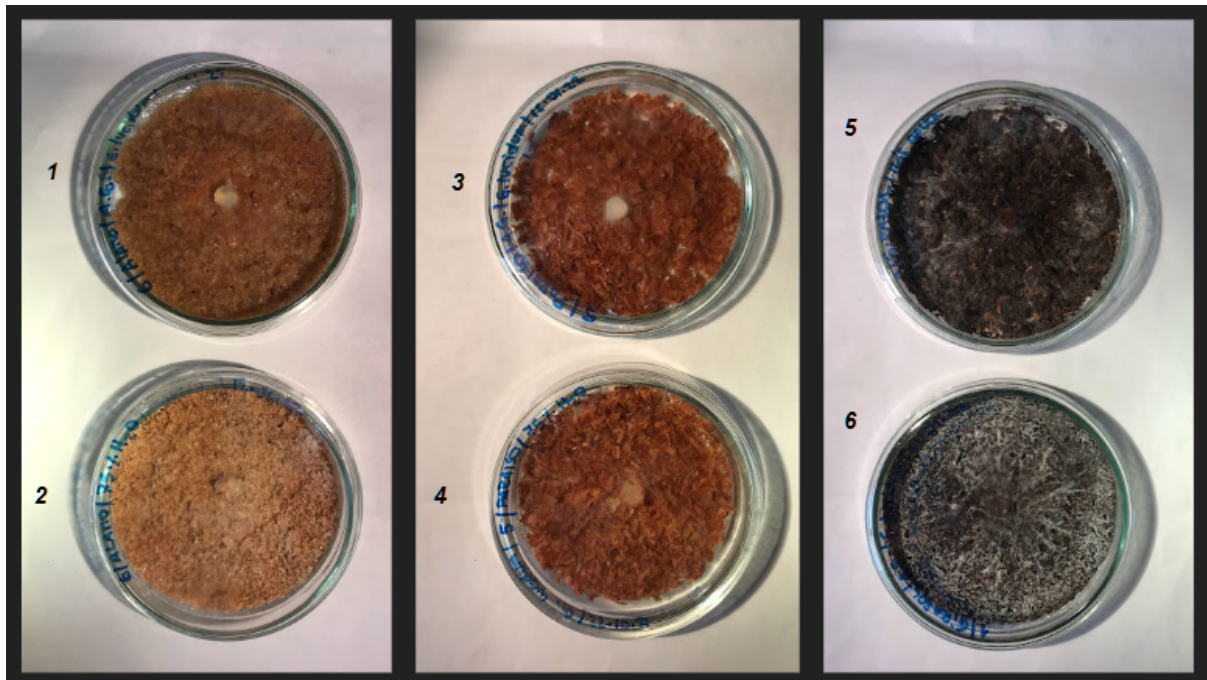
Nota. Velocidad de crecimiento radial (cm/día) de *G. lucidum* creciendo sobre los diez sustratos en dos tratamientos de hidratación: 75 % humedad (barras negras) y capacidad de campo (barras grises). Las diferencias entre grupos se analizaron por ANOVA de dos factores ($P < 0,0001$).

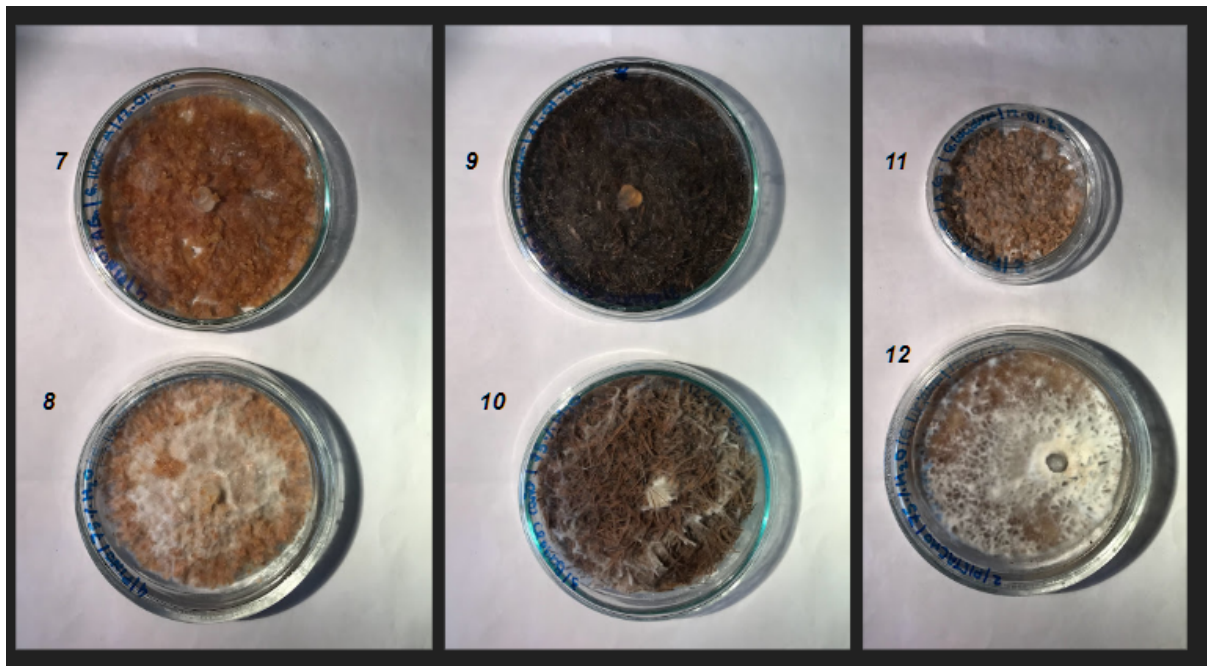
El promedio de velocidades obtenido a capacidad de campo fue mayor que el obtenido a 75 % humedad (0,46 y 0,40 cm/día respectivamente). Ambos promedios poseen una diferencia de $0,06 \pm 0,01$. Si bien esta diferencia no es demasiado grande, se evaluó además el crecimiento del micelio cualitativamente. Se observó que en sustratos como la cáscara de pistacho, una hidratación del 75 % implica la presencia de agua libre que, por definición, no resulta en una SSF. A su vez, el exceso de humedad en las SSF genera la aglomeración de partículas, disminuyendo la porosidad del sustrato y obstaculizando el intercambio gaseoso. Esto, en el caso de que la esterilización no fuera completa, aumenta las probabilidades de contaminación con otros microorganismos (de Oliveira *et al.*, 2022). Por ello, conocer y determinar la CC de cada sustrato garantiza trabajar en condiciones de SSF, con circunstancias favorables para el metabolismo del microorganismo que imitan su hábitat natural. Se considera que el nivel de humedad es alto en cuanto el sustrato se aglomera, pero esto depende de la composición de cada sustrato (*op. cit.*). En el caso de la cáscara de pistacho, un 75 % de humedad es un valor demasiado elevado. Esto se debe a que las dinámicas de hidratación de los sustratos lignocelulósicos son dependientes del tamaño de la partícula, de la macroestructura y de la composición química (Sanchez *et al.*, 2019). De hecho, se ha reportado que la capacidad de hidratación de una biomasa lignocelulósica puede ser inversamente proporcional al tamaño de las partículas, como en el caso de la paja de trigo y del bagazo de caña, considerando que esto podría deberse a la mayor porosidad de estos sustratos (*op. cit.*).

Se observó que en la mayoría de los casos, el micelio a 75 % de humedad crecía de manera más superficial, mientras que a capacidad de campo crecía intersticialmente. También, a capacidad de campo se oscureció el sustrato, lo que podría indicar una actividad enzimática activa (figura 6). Esto podría deberse a que los hongos filamentosos pueden crecer en ausencia de agua libre, únicamente utilizando el agua ligada al sustrato (Tengerdy & Szakacs, 2003). Además, Nisa *et al.* (2014) evaluaron la producción de enzimas ligninolíticas de *G. lucidum* en diferentes residuos agroindustriales, y obtuvieron los mejores rendimientos en la cáscara de maní. Observaron que al 70 % de humedad hubo un pico de Mn-peroxidasa en el día 5, pero al aumentar la humedad por encima del 70 % los niveles decrecían y tenía efectos inhibitorios en la síntesis de enzimas ligninolíticas. Estos resultados avalan que la hidratación sea a capacidad de campo.

Figura 6

Comparación del crecimiento micelial de *G. lucidum* en dos tratamientos de hidratación





Nota. Comparación del crecimiento de *G. lucidum* en diferentes sustratos con 75 % humedad y capacidad de campo. **1 y 2.** Aserrín de álamo a capacidad de campo y a 75 % de humedad, respectivamente. **3 y 4.** Aserrín de paraíso a capacidad de campo y a 75 % de humedad, respectivamente. **5 y 6.** Cascarilla de girasol a 75 % de humedad y a capacidad de campo, respectivamente. **7 y 8.** Aserrín de pino a capacidad de campo y a 75 % de humedad, respectivamente. **9 y 10.** Bagazo de caña a capacidad de campo y a 75 % de humedad, respectivamente. **11 y 12.** Cáscara de pistacho a capacidad de campo y a 75 % de humedad, respectivamente.

A simple vista, se pudo observar que el crecimiento de *G. lucidum* en la cáscara de pistacho resultó ser más denso a 75 % de humedad que a capacidad de campo. Esto podría deberse a que el sustrato es poco compacto, y posee grandes espacios que dificultan el crecimiento de las hifas en su conjunto. En cambio, en el tratamiento de 75 % de humedad estos espacios están ocupados por el agua, que funciona como medio de transporte de nutrientes. Este también parece ser el caso del aserrín de pino, donde hubo un crecimiento denso y superficial a 75 % de humedad, mientras que a capacidad de campo (81,77 % de humedad) la observación del micelio a simple vista resultó muy difícil. Se pudieron distinguir hifas aisladas creciendo de manera heterogénea e intersticialmente. Por otro lado, el crecimiento del organismo en la cascarilla de girasol fue más homogéneo y más denso a capacidad de campo (81,33 % de humedad) que a 75 % de humedad.

En cuanto al bagazo de caña, se obtuvo que un 75 % de humedad es insuficiente para humedecer los 3 g de sustrato, ya que quedaron secciones secas luego de la hidratación. El crecimiento del micelio en este tratamiento fue intersticial hasta casi el borde de la placa, en donde se puede observar una aureola blanca superficial. No obstante, en la capacidad de campo resulta complejo distinguir el micelio al ojo desnudo, pero con la lupa se observó un crecimiento intersticial más homogéneo. Esto es similar al caso del aserrín de álamo y de paraíso, ya que en ambos sustratos la observación a simple vista es casi nula.

Teniendo en cuenta los resultados de velocidad de crecimiento y las observaciones cualitativas, se decidió avanzar con el nivel de hidratación correspondiente a la capacidad de campo de cada sustrato. Esto además permite estandarizar el nivel de hidratación para todos los sustratos, sin que a ninguno le falte agua (como el bagazo de caña a 75 % de humedad) ni esté hidratado en exceso (como la cáscara de pistacho a 75 % de humedad).

2. Ensayos biológicos

En esta etapa se evaluó el cultivo de *G. lucidum* en la fracción soluble en agua de los sustratos, y en la masa lignocelulósica, tanto para evaluar la velocidad de crecimiento como la cantidad de biomasa fúngica.

2.1. Crecimiento de *G. lucidum* en sustratos lignocelulósicos

Los cultivos de *G. lucidum* en SSF se hicieron para estimar el crecimiento superficial del micelio y la cantidad de biomasa fúngica generada al final del crecimiento.

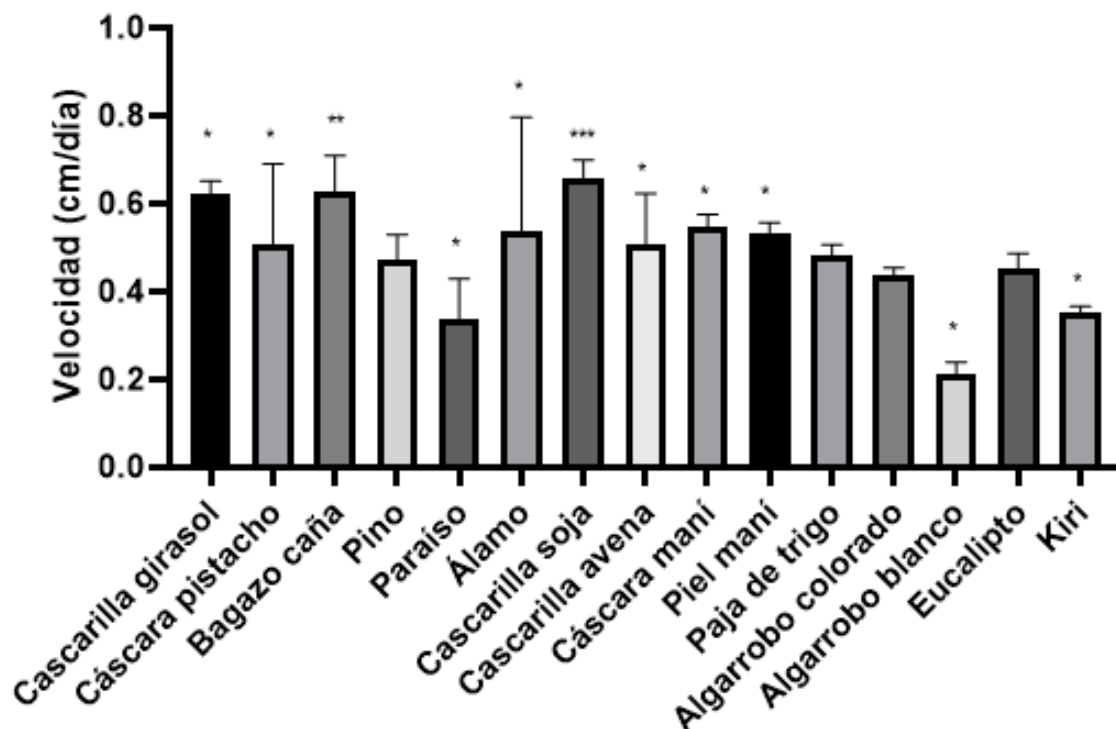
2.1.1. Estimación del crecimiento superficial del micelio

Se cultivó *G. lucidum* en los sustratos previamente evaluados a capacidad de campo. Para este experimento se decidió utilizar 3 g (peso seco) de cada sustrato, ya que esta cantidad de masa cabe en una placa de Petri cubriendo la superficie y dejando espacio suficiente para el intercambio aéreo.

El objetivo de este experimento fue obtener una aproximación inicial para evaluar qué sustrato es más eficiente para el crecimiento de *G. lucidum*. La gran mayoría de los estudios que evalúan el crecimiento de *G. lucidum* en diferentes sustratos, tienen el objetivo de determinar cuál es el sustrato más eficiente para obtener altos rendimientos de basidiomas, llamado “eficiencia biológica” (BE por sus siglas en inglés). Si bien estos estudios evalúan el crecimiento del micelio, el desarrollo de basidiomas es un proceso diferente al del crecimiento del micelio, con lo cual los sustratos pueden afectar de distintas maneras (Amiri-Sadeghan *et al.*, 2022). Un sustrato con una alta BE puede no ser el más eficiente para el crecimiento del micelio (*op. cit.*). Los sustratos que proveen un rápido crecimiento micelial de *G. lucidum* debido a la presencia de carbohidratos simples no necesariamente son eficientes para el desarrollo de los basidiomas (*op. cit.*). Esto podría indicar que, si bien no hubo una diferencia significativa entre sustratos al final del crecimiento, sí las hubo en la velocidad de bioconversión del micelio, que sería otro factor que determina la eficiencia. Por ello, se utilizó como indicador la velocidad de crecimiento radial de las colonias (figura 7).

Figura 7

Velocidad de crecimiento radial



Nota. Velocidad de crecimiento radial de *G. lucidum* sobre cada sustrato a capacidad de campo. Todos los ensayos se hicieron por triplicado y se analizaron por test de ANOVA de un factor (valor $P < 0,05$). *: Diferencias significativas. **: Diferencia significativa de $P = 0,0009$. ***: Diferencia significativa de $P = 0,0003$.

En un principio se podría afirmar que *G. lucidum* fue capaz de crecer en todos los sustratos estudiados. Pueden ser utilizados como medio de cultivo para el crecimiento de *G. lucidum*.

G. lucidum mostró la mayor velocidad de crecimiento radial al ser cultivado en cascarilla de soja, seguido por bagazo de caña. Las mayores diferencias significativas se dan entre bagazo de caña y aserrín de algarrobo blanco ($P = 0,0009$) y entre cascarilla de soja y aserrín de algarrobo blanco ($P = 0,0003$), que es el sustrato en el que menor velocidad se observó. También, se observaron diferencias significativas entre la cascarilla de soja y el aserrín de Paraíso y de Kiri.

El aserrín de algarrobo blanco fue el sustrato en el que *G. lucidum* creció más lento, y tuvo diferencias significativas con la cascarilla de girasol y de avena, la piel de maní, la cáscara de pistacho y de maní y el aserrín de álamo.

El que mayor velocidad de crecimiento tuvo, y mayores diferencias significativas contra otros sustratos es la cascarilla de soja. Esto podría deberse a su composición. Un estudio realizado por Atoji-Henrique *et al.* (2017) estudió cascarilla de soja, residuos de soja y residuos de maíz como sustratos de *G. lucidum*, y obtuvieron que el crecimiento del micelio tiene una correlación positiva con los carbohidratos totales y la proporción carbohidratos:proteínas de los sustratos. La cascarilla de soja está compuesta por celulosa (29-51 %), hemicelulosa (10-25 %), lignina (1-4 %), pectina (4-8 %) y proteínas ($10,86 \pm 0,68$ %) (Liu & Li, 2017), con un total de 84,37 % de carbohidratos y una relación

carbohidratos/proteínas de 7,77 (Atoji-Henrique *et al.*, 2017). Este es un porcentaje elevado de carbohidratos totales comparado con el bagazo de caña, que tiene 55,4 % de carbohidratos totales (Leang & Saw, 2011). Este último tiene una composición de celulosa (50 %), hemicelulosa (25 %) y lignina (25 %) (Manavalan *et al.*, 2012). Para el hongo, resulta más sencillo metabólicamente acceder a los azúcares de la celulosa y hemicelulosa en un sustrato con menor cantidad de lignina, como sería la cascarilla de soja en este caso.

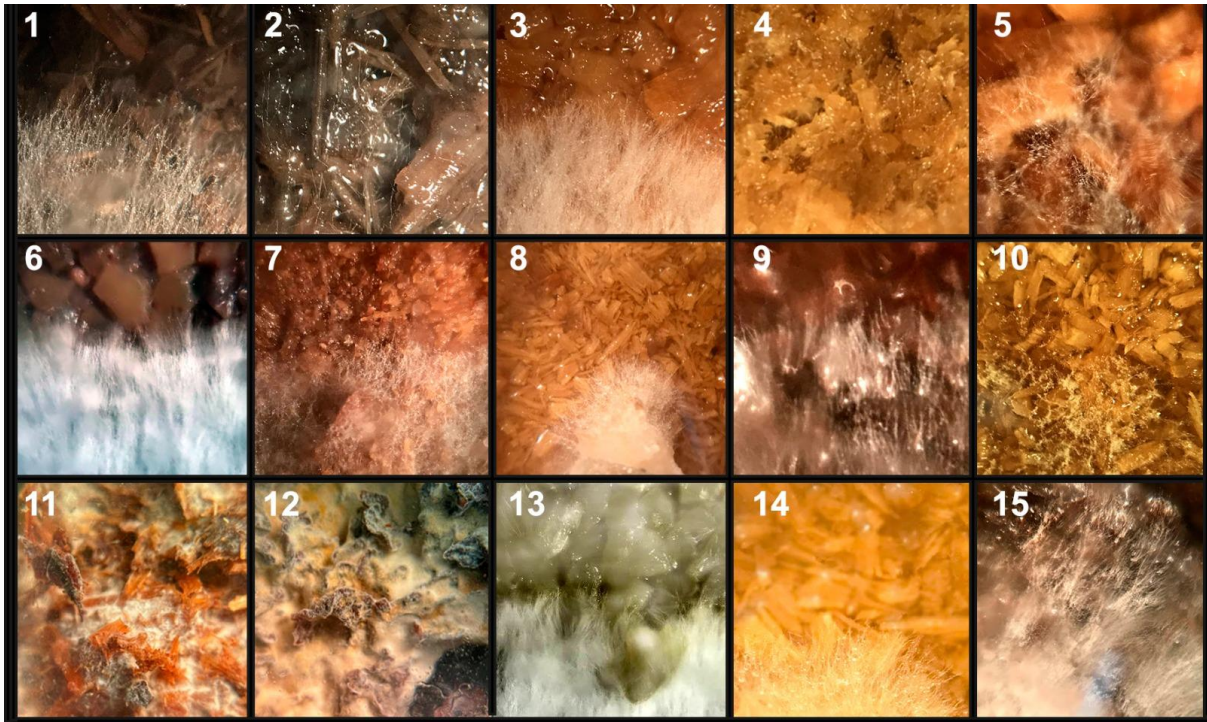
Por otro lado, Atila (2018) evaluó sustratos para la producción de basidiomas de *G. lucidum*, y obtuvo distintas correlaciones entre la composición química del sustrato y el tiempo de colonización del micelio: una correlación positiva para el contenido de nitrógeno, y una correlación negativa para los contenidos de celulosa y hemicelulosa del sustrato. Además, observó una velocidad de crecimiento del micelio mayor en aserrín de álamo y paja de trigo, y en segundo lugar paja de soja, a diferencia de los resultados obtenidos. Cabe destacar que la paja de trigo posee una composición de nitrógeno ($0,38 \pm 0,07$ %), celulosa ($50,5 \pm 0,27$ %), hemicelulosa ($24,7 \pm 0,46$ %) y lignina ($10,1 \pm 0,11$ %), mientras que el aserrín de álamo está compuesto por nitrógeno ($0,20 \pm 0,04$ %), celulosa ($52,6 \pm 0,36$ %), hemicelulosa ($11,8 \pm 0,15$ %) y lignina ($21,8 \pm 0,19$ %) (Atila, 2018). Sin embargo, en este estudio se prioriza la producción de basidiomas, y algunas veces dicha producción puede limitar el crecimiento vegetativo, y por lo tanto no es deseable alcanzar las condiciones de inducción de basidiomas (Amiri-Sadeghan *et al.*, 2022).

Como se puede observar, los valores de velocidad de crecimiento en cáscara de pistacho y aserrín de álamo presentan una mayor dispersión. Esto pudo deberse a que la cáscara de pistacho es el sustrato más denso, por lo tanto los 3 g de sustrato no llegan a cubrir la superficie de la placa de Petri, y no se distribuyen de manera uniforme, en consecuencia el micelio tampoco crece de manera uniforme, y se obtienen mediciones de crecimiento radial muy dispares entre sí. En el caso del aserrín de álamo, no se observó crecimiento a simple vista, para lo cual hubo que seguir el desarrollo micelial mediante el uso de lupa binocular. En este sustrato, el crecimiento radial mostró un entramado hifal poco denso en comparación con la mayoría de los sustratos, en los cuales se observó un micelio más compacto, con las hifas creciendo en conjunto.

En cuanto a la densidad del micelio, se observaron las siguientes diferencias entre sustratos:

Figura 8

Observación del crecimiento micelial sobre diferentes sustratos



Nota. 1. Cascarrilla de girasol. 2. Bagazo de caña. 3. Aserrín de pino. 4. Aserrín de eucalipto. 5. Aserrín de paraíso. 6. Cáscara de pistacho. 7. Aserrín de kiri. 8. Aserrín de algarrobo blanco. 9. Aserrín de algarrobo colorado. 10. Aserrín de álamo. 11. Paja de trigo. 12. Piel de maní. 13. Cascarrilla de soja. 14. Cascarrilla de avena. 15. Cáscara de maní. Aumento 10 X.

Como se puede observar, el micelio aparentó ser más denso al crecer usando los sustratos cáscara de pistacho, cascarrilla de soja, aserrín de pino, paja de trigo y piel de maní. En el trabajo realizado por Cortina-Escribano *et al.* (2020) cultivaron *G. lucidum* en sustratos combinados con medios agarizados, y obtuvieron la menor densidad de micelio en el aserrín de pino. Concluyeron que el aserrín de pino no es el sustrato preferible para el cultivo de esta especie, ya que el hongo prefiere maderas duras. Si bien trabajaron con sustratos en combinación con medios agarizados, por lo cual no se podrían comparar los valores de velocidad de crecimiento obtenidos, sí pueden afirmar que el tipo de madera influye en el crecimiento del organismo. El tipo de madera afecta la expresión de los genes que codifican para enzimas ligninolíticas de los hongos de pudrición blanca y marrón, lo cual incide en la degradación del sustrato y por consiguiente en el crecimiento del hongo (Wymelenberg *et al.*, 2011).

En segundo lugar, el micelio tuvo una densidad moderada creciendo sobre cascarrilla de girasol, cascarrilla de avena, cáscara de maní, aserrín de kiri y de algarrobo colorado y bagazo de caña. En cuanto a los sustratos restantes (aserrín de álamo, de algarrobo blanco, de paraíso y de eucalipto) tuvieron un crecimiento micelial leve, difícil de distinguir al ojo desnudo.

La densidad del micelio y el nivel de colonización de sustratos por el mismo podrían estar relacionadas con la especie de hongo y con el sistema hifal. Appels *et al.* (2019) evidenciaron que la especie utilizada juega un papel importante en la determinación de la rigidez y la resistencia al agua

del micomaterial, ya que impacta en el nivel de colonización del sustrato. Los tipos de hifas de los Basidiomicetes y los sistemas hifales en su conjunto afectan las propiedades mecánicas del micomaterial (Jones *et al.*, 2020). Sin embargo, aún no hay estudios que expliquen de qué manera, ni hay literatura que establezca si existe una relación entre los tipos de las hifas de los cultivos y su tenacidad, y las características del material resultante.

También, la densidad del micelio está afectada por la compactación y por el tipo de fibra del sustrato. De hecho, Houette *et al.* (2022) concluyeron que los sustratos con presencia de micropartículas y más compactados producían materiales con mayor resistencia a la deformación elástica (mayor módulo de Young y módulo elástico). Sin embargo, se evidenció la heterogeneidad de los materiales obtenidos a la hora de realizar los ensayos de resistencia a la tracción, lo que alienta a seguir explorando las condiciones para lograr materiales más homogéneos.

Por otro lado, en el trabajo realizado por Elsacker *et al.* (2019) demuestran que las características mecánicas del biomaterial dependen del tipo de fibra utilizada para el sustrato. Sobre todo, descubren que el rendimiento mecánico del material depende más del tipo de procesamiento de las fibras del sustrato (tamaño y condición), que de su composición química. Este resultado sugiere que, no sólo es posible generar materiales biodegradables que reemplacen compuestos a base de petróleo, sino también que mediante diferentes procesamientos de los sustratos se pueden controlar las propiedades necesarias, como la elasticidad y la resistencia a la compresión.

No obstante, Siwulski *et al.* (2019) demostraron que la composición química del sustrato afecta al rendimiento del crecimiento y a los niveles de elementos químicos presentes en los carpóforos de *G. lucidum*. Encontraron que el crecimiento de éste era mejor en aserrín de aliso (*Alnus glutinosa*) y haya (*Fagus sylvatica*). Esto podría indicar que diferentes sustratos con variada composición química afectan a la conversión de materia orgánica en biomasa fúngica y, a su vez, podría impactar en las propiedades del biomaterial.

Con estos resultados se puede plantear que, si bien el hongo puede desarrollarse radialmente más rápido en alguno de los sustratos, eso no necesariamente implica una mayor eficiencia de biotransformación, ya que la densidad de hifas varía de un sustrato a otro. Por otra parte, en algunos casos el crecimiento se produjo de forma más superficial, por lo tanto detectable a simple vista, mientras que en otros no se observaba crecimiento superficial, resultando difícil de medir. Una posible explicación es que en estos casos las hifas crecen por debajo de la superficie. Esto reforzó la necesidad de cuantificar la biomasa fúngica.

A partir de estos resultados, se decidió evaluar la biomasa utilizando un método cuantitativo de detección de quitina. También, llevó a plantear la pregunta de por qué habría tanta diferencia en las velocidades de crecimiento del hongo entre los sustratos. Una posible explicación a esto es que en el agua libre que se encuentra en los intersticios del sustrato haya azúcares de fácil asimilación que le permitan al organismo crecer rápidamente antes de verse obligado a sintetizar una batería enzimática para comenzar a degradar la lignina, celulosa y hemicelulosa.

Por ello, se plantearon una serie de experimentos para evaluar azúcares reductores y proteínas de cada sustrato.

2.2. Fracción soluble en agua

2.2.1. Azúcares reductores

Los siguientes experimentos se llevaron a cabo con el objetivo de determinar la concentración de azúcares reductores que se extraen en la fase líquida de cada sustrato a capacidad de campo. Se hipotetizó que aquellos sustratos con mayor concentración de azúcares reductores extraíbles pueden proporcionar al hongo alimento de fácil asimilación, y por lo tanto ser responsables de parte de la conversión de biomasa lignocelulósica a biomasa fúngica. En el caso del crecimiento de *G. lucidum* sobre los sustratos, el agua con extractos corresponde a la resultante luego del proceso de autoclavado.

Para ello, se evaluó la concentración de azúcares reductores en distintas diluciones basadas en la capacidad de campo en cada sustrato, y se observó cuáles superan el límite de detección del método a capacidad de campo (tabla 5):

Tabla 5

Saturación de azúcares reductores de cada sustrato a capacidad de campo.

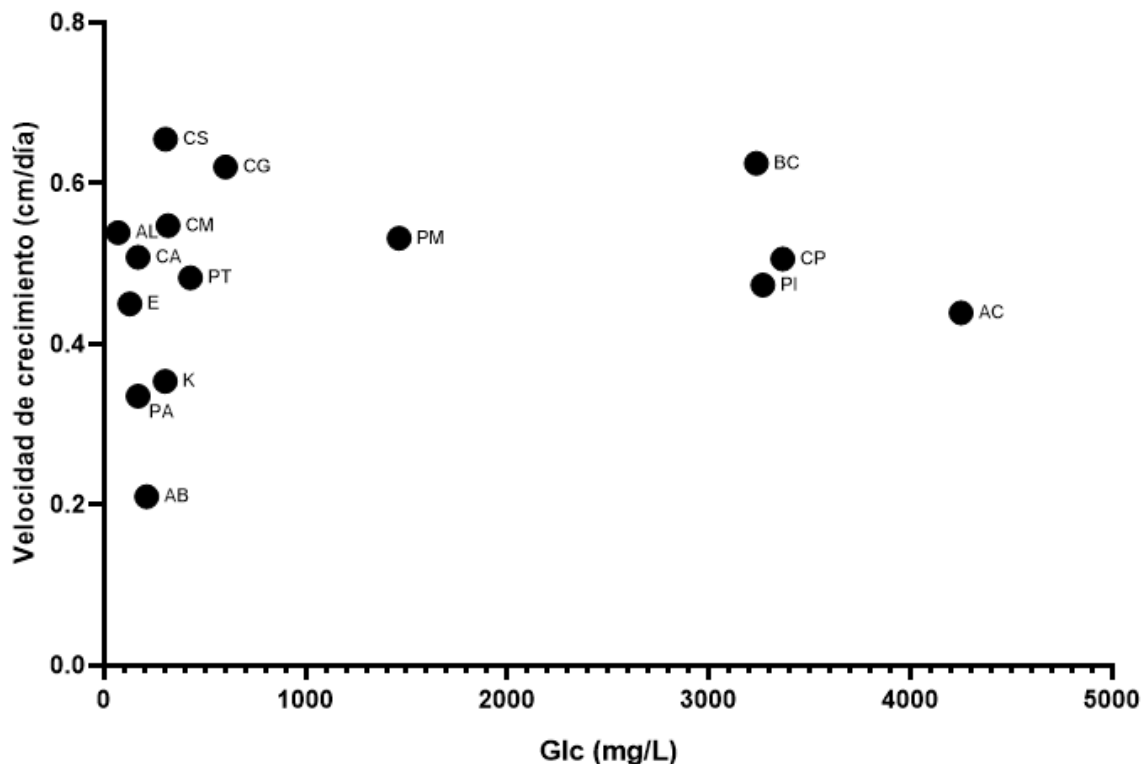
Sustrato	Saturación de azúcares
Álamo	-
Algarrobo blanco	+
Algarrobo colorado	+
Bagazo de caña	+
Cáscara maní	+
Cáscara pistacho	+
Cascarilla avena	-
Cascarilla girasol	+
Cascarilla soja	+
Eucalipto	-
Paja trigo	+
Paraíso	-
Piel maní	+

La liberación de glucosa en el sustrato puede ocurrir no sólo por acción enzimática del hongo, sino además por enzimas presentes en la pared celular de la biomasa lignocelulósica, independientemente del tamaño de la partícula (Lara-Vázquez *et al.*, 2014). Estas enzimas se inactivan luego de la esterilización por autoclave. La disponibilidad de azúcares fácilmente metabolizables en el agua intersticial afecta la actividad enzimática de los hongos durante la fermentación en estado sólido, y esto podría afectar su crecimiento (de Souza *et al.*, 2001). Por lo tanto, podría ser un indicador de la calidad del sustrato, ya que una alta concentración de azúcares reductores extraídos en el agua intersticial a capacidad de campo podría funcionar como un potente iniciador para el crecimiento fúngico.

Sólo 4 sustratos (un 26,7 %) no superaron los 250 mg/L de azúcares reductores a capacidad de campo, siendo estos el aserrín de álamo, eucalipto, paraíso y la cascarilla de avena. En base a estos resultados, se analizó si existía una relación entre la concentración de azúcares reductores y la velocidad de crecimiento de *G. lucidum* en cada sustrato. Para que la medición sea correcta, se obtuvieron los valores de azúcares reductores más diluidos, a partir de la extracción en una cantidad de agua equivalente a 3 veces la capacidad de campo (figura 9):

Figura 9

Velocidad de crecimiento radial y concentración de azúcares reductores

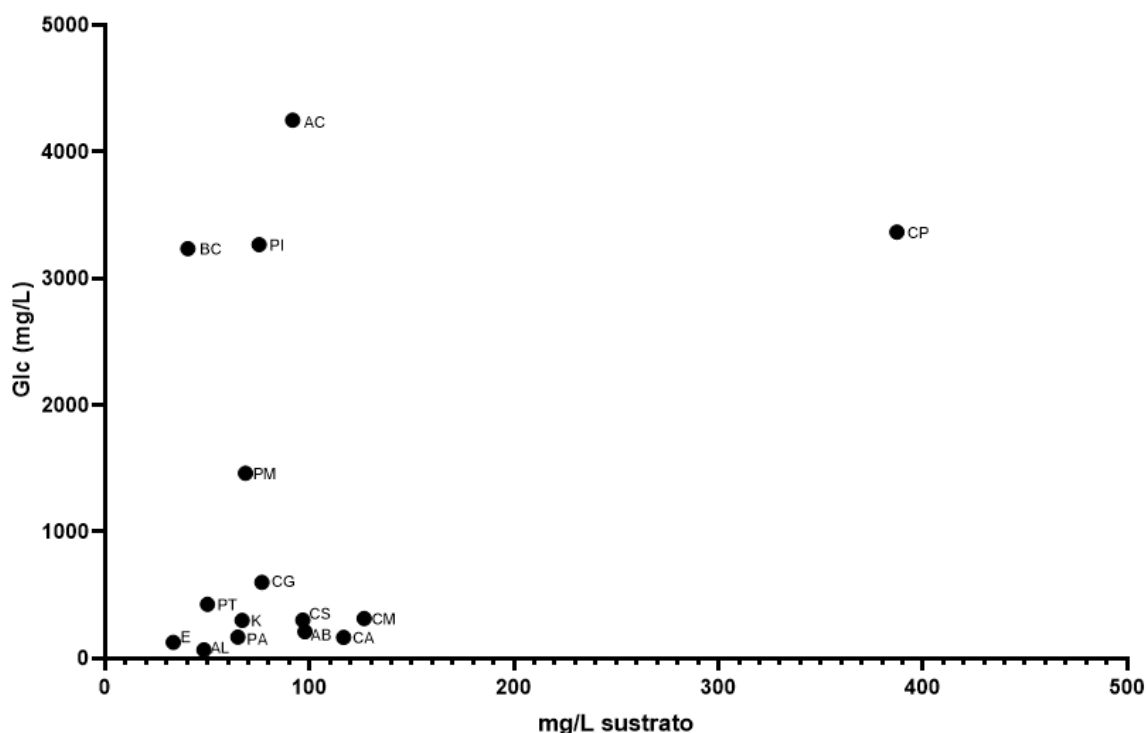


Nota. Velocidad de crecimiento radial (cm/día) de *G. lucidum* en SSF a CC para cada sustrato versus concentración de azúcares reductores (mg/L). **AB:** Algarrobo blanco. **AC:** Algarrobo colorado. **AL:** Álamo. **BC:** Bagazo de caña. **CA:** Cascarilla de avena. **CG:** Cascarilla de girasol. **CM:** Cáscara de maní. **CP:** Cáscara de pistacho. **CS:** Cascarilla de soja. **E:** Eucalipto. **K:** Kiri. **PA:** Paraíso. **PI:** Pino. **PM:** Piel de maní. **PT:** Paja de trigo.

También, se evaluó si hay una relación entre la cantidad de sustrato utilizado y la concentración de azúcares reductores extraíbles, obteniendo los siguientes resultados (figura 10):

Figura 10

Concentración de azúcares reductores y cantidad de sustrato



Nota. Concentración de azúcares reductores (mg/L) versus cantidad de sustrato (mg/L) en una dilución de 3 capacidades de campo totales. **AB:** Algarrobo blanco. **AC:** Algarrobo colorado. **AL:** Álamo. **BC:** Bagazo de caña. **CA:** Cascarilla de avena. **CG:** Cascarilla de girasol. **CM:** Cáscara de maní. **CP:** Cáscara de pistacho. **CS:** Cascarilla de soja. **E:** Eucalipto. **K:** Kiri. **PA:** Paraíso. **PI:** Pino. **PM:** Piel de maní. **PT:** Paja de trigo.

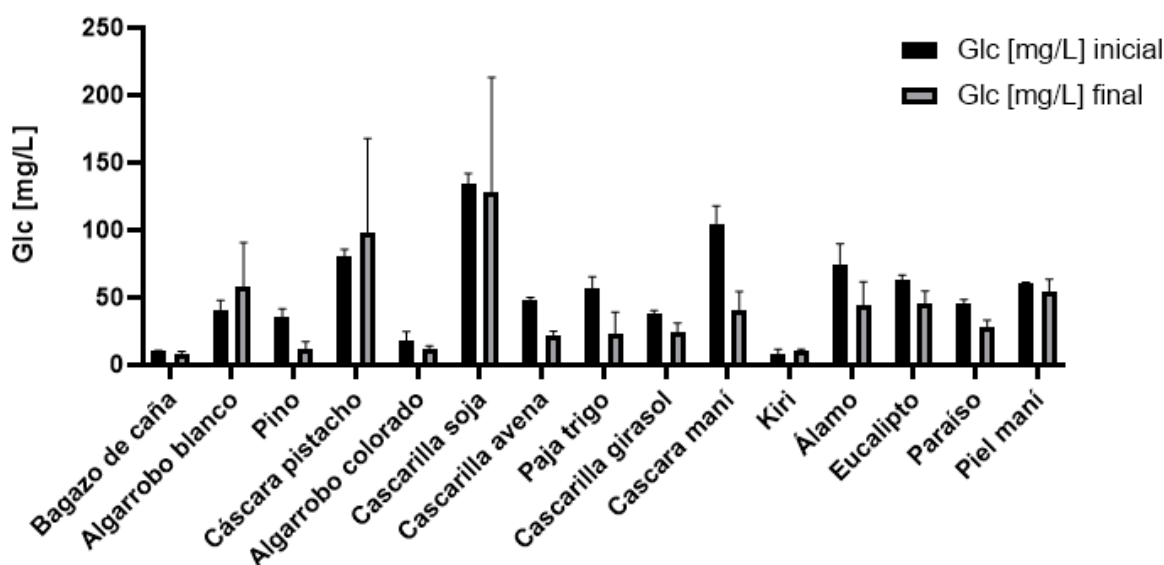
Como se puede observar en los resultados, la concentración de azúcares reductores de los extractos de los sustratos y la velocidad de crecimiento radial en SSF de *G. lucidum* no presentan una relación directa. Tampoco se observa una relación entre la cantidad de sustrato y la concentración de azúcares, es decir que mayor cantidad de sustrato en agua no necesariamente implica mayor cantidad de azúcares extraídos, ya que es posible que se alcance su saturación. Esta falta de relación puede deberse a que la concentración de azúcares disponibles actúa como iniciador en el crecimiento, permitiendo la adaptación de las cepas a la degradación de polisacáridos complejos como la celulosa o hemicelulosa. En esta línea, el extracto que mostró la menor concentración de

azúcares fue el de aserrín de álamo, pero se encuentra entre los que desarrollaron una mayor velocidad de crecimiento en SSF. Esto podría indicar que la concentración necesaria para iniciar el crecimiento de *G. lucidum* es baja. No obstante, resulta necesario explorar si la falta de relación entre ambos parámetros se debe a la naturaleza misma de los sustratos. Además, la técnica aplicada para determinar la concentración de azúcares no explica la calidad de los mismos, siendo posible que diverjan en las calidades nutricionales.

Por lo tanto, para evaluar la calidad nutricional de los azúcares reductores, se planteó un experimento que consiste en el cultivo de *G. lucidum* sobre un extracto de cada sustrato altamente diluido, y la posterior cuantificación de biomasa del micelio recolectado. Para evitar la saturación de azúcares de los extractos, se hizo una dilución al tercio de la capacidad de campo de cada uno tomando como referencia el sustrato que menor concentración de azúcares reductores tenía: el aserrín de álamo (68,69 mg/L). Se hicieron las diluciones de manera tal que todos los extractos tuvieran aproximadamente una concentración de 60 mg/L de azúcares reductores. Se midieron los azúcares reductores antes y después del crecimiento del micelio mediante la técnica de Somogyi-Nelson (figura 11):

Figura 11

Azúcares reductores consumidos



Nota. Azúcares reductores consumidos durante el crecimiento de *G. lucidum* en un extracto acuoso de cada sustrato, correspondiente a un tercio de la capacidad de campo de cada uno. Se tomaron muestras previas a la inoculación con micelio (concentración de glucosa inicial) y luego de 7 días de crecimiento del micelio.

En base a estos resultados se puede decir que la especie de hongo tiene la capacidad de crecer y generar biomasa a partir de condiciones extremas de escasez de alimento. Contrariamente a lo hipotetizado, la concentración de azúcares no explica completamente la velocidad de crecimiento

observada en la SSF. No obstante, el hongo fue suficientemente eficiente como para crecer con muy poca fuente de carbono y energía.

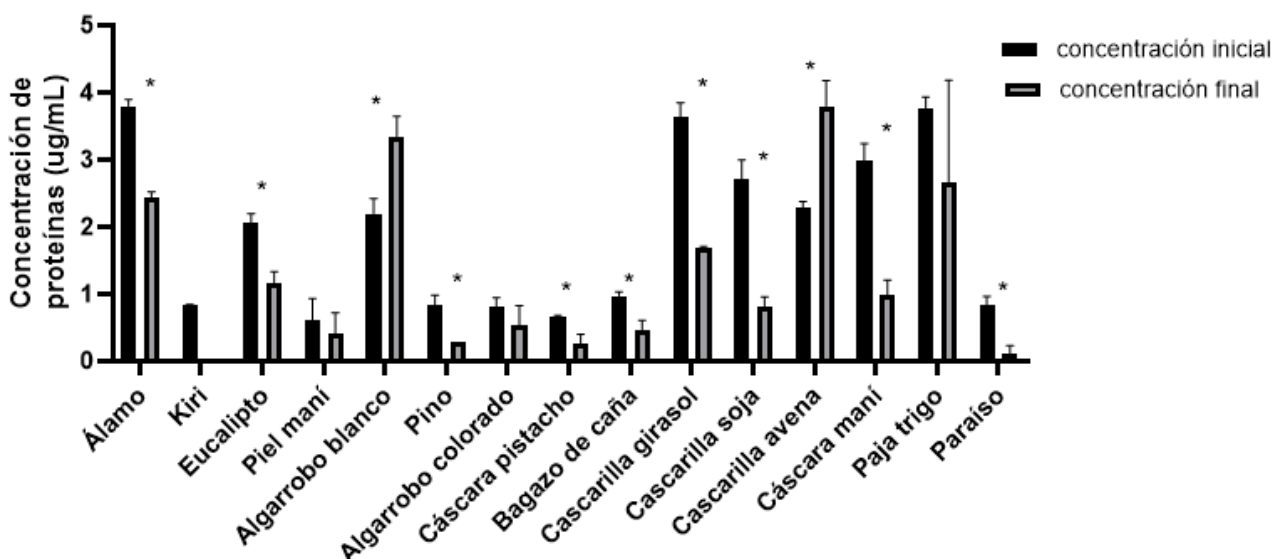
Teniendo en cuenta los valores de azúcares iniciales, se puede afirmar que hubo un error en las diluciones iniciales para llegar a la concentración de ~60 mg/L de azúcares. Aquellos sustratos con un valor de concentración de azúcares reductores iniciales similar al buscado son: aserrín de álamo, eucalipto, paraíso, paja de trigo, cascarilla de avena y de maní. En el resto de los sustratos hubo errores en los cálculos sumado a los errores metodológicos, que podrían deberse a que los valores de ~60 mg/L de azúcares son muy cercanos al límite de detección de la técnica (31,35 mg/L), con lo cual cualquier error metodológico pequeño puede tener una incidencia muy grande en la medición final.

2.2.2. Proteínas

El siguiente experimento apunta a determinar el consumo de proteínas por parte de *G. lucidum* en el cultivo líquido (extracto de cada sustrato), como modo de estimación de la cantidad de nitrógeno presente en los extractos, dado que las proteínas constituyen la mayor parte del nitrógeno metabolizable durante la fase primaria de crecimiento (Sanchez *et al.*, 2019).

Figura 12

Proteínas consumidas



Nota. Proteínas consumidas durante el crecimiento de *G. lucidum* en un extracto acuoso de cada sustrato, correspondiente a un tercio de la capacidad de campo de cada uno, expresado como ug de proteínas por mL de extracto. Se tomaron muestras previas a la inoculación con micelio (concentración inicial) y luego de 7 días de crecimiento del micelio (concentración final). *Diferencias significativas entre ambas concentraciones de cada sustrato, analizado mediante t de Student.

Al observar estos resultados, se puede inferir que en primer lugar, *G. lucidum* es capaz de crecer y generar biomasa a partir de concentraciones ínfimas de macronutrientes, en este caso nitrógeno. En los casos de aserrín de álamo, eucalipto, pino, cáscara de pistacho y de maní, bagazo de caña y cascarilla de girasol y soja, se puede afirmar que el hongo consumió proteínas. En cambio, los casos de aserrín de algarrobo blanco y cascarilla de avena, en los que la concentración final resultó mayor que la inicial, podría deberse a errores en la medición de la concentración inicial, probablemente debido a que los valores son cercanos al límite de detección de la técnica (3 ug/mL).

Por otro lado, se puede observar una diferencia significativa de $0,7242 \pm 0,09396$ en el aserrín de paraíso, la cual es la mayor entre los sustratos. Cabe tener en cuenta que este extracto tenía una concentración inicial de proteínas muy baja, y además una concentración de azúcares reductores por debajo de los 60 mg/L, lo cual sugiere que el hongo se encontraba en un estado de escasez de alimento y consumió gran parte de lo que estaba a su alcance.

3. Factor de conversión de biomasa

3.1. Biomasa en extracto de sustrato

Para calcular la biomasa crecida en los extractos de cada sustrato, se filtró el cultivo en medio líquido, se recuperó el micelio, y se llevó a cabo el protocolo de determinación de biomasa mediante la medición de glucosamina.

Aunque en todos los casos los resultados obtenidos se encontraron por debajo del límite de detección de la técnica (48 mg de micelio), se pudo determinar cualitativamente el crecimiento en todos los cultivos (tabla 6).

Tabla 6

Crecimiento de micelio en extractos de sustrato

Sustratos	Biomasa en extracto (mg micelio)	Observaciones
Álamo	<48	amarillento *
Kiri	<48	transparente *
Eucalipto	<48	amarillento *
Piel maní	<48	amarronado ***
Algarrobo blanco	<48	amarillento *
Pino	<48	amarillento *
Algarrobo colorado	<48	rojizo amarronado *
Cáscara pistacho	<48	transparente **

Bagazo de caña	<48	transparente *
Cascarilla girasol	<48	amarronado **
Cascarilla soja	<48	amarillento ***
Cascarilla avena	<48	anaranjado *
Cáscara maní	<48	amarronado **
Paja trigo	<48	anaranjado *
Paraíso	<48	rojizo amarronado *

Nota. Crecimiento del micelio en extractos de sustratos. En observaciones se aclara el color del extracto y el crecimiento del micelio: *crecimiento leve; **crecimiento moderado; ***crecimiento denso.

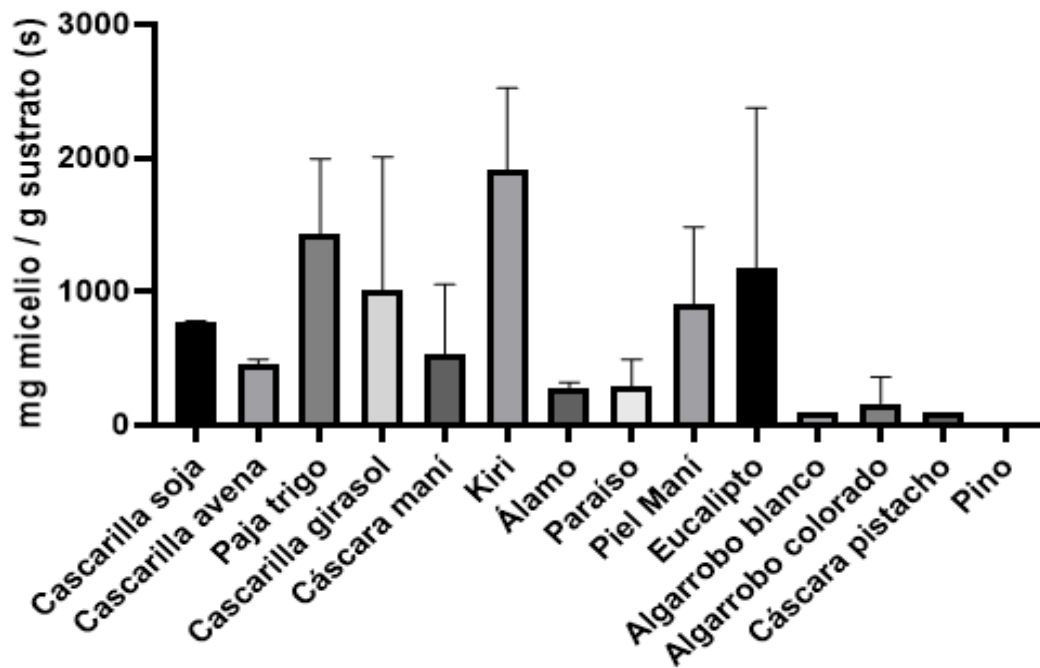
3.2. Biomasa en sustrato sólido

El objetivo de este experimento es determinar la cantidad de biomasa fúngica crecida en cada sustrato luego de la fermentación en estado sólido durante 7 días. Se hipotetizó que *G. lucidum* creció más en aquellos sustratos que tuvieran una mayor concentración de azúcares reductores de fácil asimilación en el agua intersticial.

Para calcular el factor de bioconversión de biomasa lignocelulósica en biomasa fúngica de cada sustrato, se llevó a cabo el protocolo de determinación de biomasa mediante la medición de glucosamina, estimando los miligramos de micelio crecidos por cada gramo de sustrato seco (figura 13):

Figura 13

Bioconversión de sustratos en biomasa fúngica



Nota. Bioconversión de sustratos en biomasa fúngica expresado en miligramos de micelio por gramo de sustrato seco. Análisis ANOVA de un factor (valor $P < 0,05$), no hay diferencias significativas.

No se pudo determinar la biomasa fúngica de los cultivos realizados en bagazo de caña ya que las tres réplicas se contaminaron. Por otro lado, la biomasa desarrollada en aserrín de pino se encuentra por debajo del límite de detección de la técnica (menor a 48 mg micelio/g sustrato). Además, el aserrín de algarrobo blanco y la cáscara de pistacho no tienen barras de error ya que se perdieron una o más réplicas por contaminación con otros hongos.

No se observaron diferencias significativas entre la biomasa producida en cada sustrato.

El ensayo de determinación de quitina utilizado es uno de los métodos indirectos más comunes para la determinación de biomasa fúngica, y se puede aplicar para sustratos variados (Matcham *et al.*, 1985). Hay numerosos protocolos que permiten estimar el contenido de quitina de una muestra, y todos involucran una digestión química de la quitina seguido por la cuantificación de glucosamina mediante un ensayo colorimétrico (*op. cit.*). La etapa más importante para realizar el ensayo de quitina es la digestión ácida o básica a altas temperaturas. No obstante, todos los protocolos de determinación de quitina presentan las mismas desventajas. Por un lado, el contenido de quitina puede variar con la edad del micelio y por otro lado, las hexosaminas presentes en el sustrato pueden interferir con el ensayo, lo que incrementa la incertidumbre de la medición (*op. cit.*). Muchos de los resultados obtenidos no se pudieron determinar con precisión debido a que la biomasa desarrollada fue menor al límite de detección de la técnica, por lo cual se podría utilizar a futuro la determinación de biomasa mediante la medición del ergosterol.

Para determinar la cantidad de ergosterol, se utiliza extracción en fase sólida y cromatografía líquida de alta eficacia (SPE y HPLC respectivamente, por sus siglas en inglés) (Gessner & Newell, 1997) y resulta más confiable que la quitina y otras moléculas como indicador de biomasa fúngica (Davis & Lamar, 1992). Sin embargo, este método presenta algunas desventajas. En primer lugar, requiere de reactivos extremadamente costosos. Además, hay numerosos factores que pueden afectar la concentración del ergosterol en determinadas muestras, como la edad del micelio, la especie de hongo, composición del medio y disponibilidad de oxígeno, entre otras, que en conjunto dificultan la estimación de la biomasa y la determinación del factor de conversión exacto (Klamer & Bååth, 2004). Por ello resulta conveniente realizar estas estimaciones en sustratos previamente caracterizados y esterilizados, y con una especie fúngica conocida.

En un estudio realizado por Seitz *et al.* (1979), compararon los métodos de determinación de biomasa fúngica por quitina y por ergosterol durante 21 días del crecimiento de *Aspergillus* y *Alternaria*. Si bien observaron una correlación entre ambas metodologías, se detectó que el ensayo de ergosterol es más sensible durante los estadíos iniciales de colonización (los primeros 7 días aproximadamente), ya que durante esta etapa el método de la quitina dio mediciones cercanas al límite más bajo de detección.

Además, es necesario analizar en futuras investigaciones las propiedades del aglomerado formado con cada sustrato para poder estudiar relaciones entre las composiciones químicas de los sustratos, la eficiencia de bioconversión y el biomaterial resultante. En el trabajo de Haneef *et al.* (2016), deducen que los sustratos más difíciles de digerir para el micelio producen aglomerados más rígidos. Observan, además, que la celulosa-dextrosa de papa es más fácil de digerir para el micelio debido a la presencia de azúcares simples. Afirman también que las diferencias entre los materiales resultantes se deben a la diferencia de las concentraciones relativas de macromoléculas, ocasionada por la variación en la composición química de los sustratos. Esto indica que diferentes sustratos afectan a la conversión de materia orgánica en biomasa fúngica y, a su vez, esto impacta en las propiedades del biomaterial. Teniendo en cuenta esto, se podría hipotetizar que sustratos con mayor concentración de carbono soluble (es decir, más cantidad de azúcares simples que permitan al micelio digerir fácilmente) generarían materiales más flexibles y podrían afectar otras propiedades aún no exploradas.

CONCLUSIONES

En este trabajo se pudo analizar la eficiencia energética de diferentes sustratos para el crecimiento de *Ganoderma lucidum*, con el objetivo de contar con una herramienta de análisis para evaluar la aptitud de un sustrato para la producción de biomateriales fúngicos. A partir de los resultados obtenidos, se infiere que *G. lucidum* tiene la capacidad de crecer en una amplia variedad de sustratos ligninolíticos, como los utilizados en el presente estudio, donde se incluyeron cáscaras y piel de semillas, bagazo y aserrín de distintas maderas. Por otra parte, se pudo determinar que la cepa fúngica estudiada tiene la capacidad de colonizar sustratos con escasa disponibilidad de carbohidratos y proteínas de libre disponibilidad, como los que pueden encontrarse en los extractos acuosos provenientes del proceso de esterilización del sustrato.

También, se puede concluir que la composición de los sustratos afecta al crecimiento de *G. lucidum*. Sin embargo, la velocidad de este crecimiento no está necesariamente condicionada por la concentración de azúcares reductores presentes en los extraíbles del sustrato, y no se puede afirmar que se haya producido más biomasa fúngica en un sustrato que en otro. No obstante, el sustrato en el cual *G. lucidum* creció más rápido fue la cascarilla de soja, seguido por el bagazo de caña de azúcar. Los resultados obtenidos alientan a continuar profundizando los estudios para poder comprender cuáles son las variables que condicionan la colonización de diferentes sustratos lignocelulósicos.

REFERENCIAS

- Amiri-Sadeghan, A., Aftabi, Y., Arvanaghi, H.R., Shokri, E., Khalili, M., Seyedrezazadeh, E & Kuhar, F. (2022). A Review of Substrates for Solid-State Fermentation of Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), for Basidiome Production and Effect on Bioactive Compounds. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 24(4):15–29.
- Atila, F. (2018). Comparative study on the mycelial growth and yield of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) Karst. on different lignocellulosic wastes. *Acta Ecologica Sinica*, <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.11.007>.
- Atoji-Henrique, K., Sampaio Henrique, D., Glória, L. S. 2 , Mazaro, S. M., Casagrande, M. (2017). Influence of Substrate Composition on β -Glucans Production and Growth of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Agricultural Science*; Vol. 9, No. 5.
- Bååth, E. (2001). Estimation of fungal growth rates in soil using ¹⁴C-acetate incorporation into ergosterol, *Soil Biology and Biochemistry*, Volume 33, Issue 14, Pages 2011-2018, [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00137-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00137-7).
- Bai, J., Wang, D., Wang, J. (2013). Method to prepare D-glucosamine hydrochloride. (Patente de Estados Unidos, Nro. US8383808B2). NANTONG FOREIGN TRADE MEDICINES AND HEALTH PRODUCTS Co Ltd. <https://patents.google.com/patent/US8383808B2/en?q=8383808>
- Baird, R., Rice, E. W., Eaton, A. D., Bridgewater, L., & Water Environment Federation (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*: American Public Health Association.
- Bärlocher., F., Gessner, M., & Graca, M. (2020). *Methods to Study Litter Decomposition* (2nd ed., pp. 247-254). [S.I.]: Springer International Publishing.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- Cerimi, K., Akkaya, K. C., Pohl, C., Schmidt, B., & Neubauer, P. (2019). Fungi as source for new bio-based materials: a patent review. *Fungal biology and biotechnology*, 6(1), 17.
- Cortina-Escribano M., Veteli P., Linnakoski R., Miina J., Vanhanen H. (2020). Effect of wood residues on the growth of *Ganoderma lucidum*. *Karstenia*, Volume 58, Issue 1, 16–28. <https://doi.org/10.29203/ka.2020.486>.
- Davis, M.W., Lamar, R.T., (1992). Evaluation of methods to extract ergosterol for quantification of soil fungal biomass. *Soil Biology & Biochemistry* 24, 189–198.
- Dembicki, H. (2017). *Practical petroleum geochemistry for exploration and production* (pp. 61-133). Amsterdam: Elsevier Science.
- de Oliveira Júnior, S. D., Dos Santos Gouvêa, P. R., de Aguiar, L. V. B., Pessoa, V. A., Dos Santos Cruz Costa, C. L., Chevreuil, L. R., Dedo Brito Nascimento, L. B., Dos Santos, E. S., & Sales-Campos, C. (2022). Production of Lignocellulolytic Enzymes and Phenolic Compounds by *Lentinus strigosus* from the Amazon Using Solid-State Fermentation (SSF) of Guarana (*Paullinia cupana*) Residue. *Applied biochemistry and biotechnology*, 194(7), 2882–2900. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03851-6>.

de Oliveira, R. A., Ramos, M. M., de Aquino, L. A. (2015). Irrigation Management. Santos, F., Borém, A., Caldas, C. *Sugarcane*. Academic Press. Pages 161-183. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802239-9.00008-6>.

de Souza, D. F., Marques de Souza, C. G., Rosane Marina Peralta, R. M. (2001) Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamarii* in solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 36, 835–838.

D'Souza, T. M., Merritt, C. S. & Reddy, A. (1999) Lignin-Modifying Enzymes of the White Rot Basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol. 65, No. 12, , p. 5307–5313

Ecovative Design, s.f. Extraído el 20/08/2021 de <https://ecovatedesign.com/>

Elsacker E, Vandeloos S, Brancart J, Peeters E, De Laet L (2019) *Mechanical, physical and chemical characterisation of mycelium-based composites with different types of lignocellulosic substrates*. *PLoS ONE* 14(7): e0213954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213954>

Elsacker, E., Vandeloos, S., Van Wylick, A., Ruytinx, J., De Laet, L., Peeters, E. (2020). A comprehensive framework for the production of mycelium-based lignocellulosic composites. *Science of the Total Environment* 725(138431) <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138431>

Fan, W., Bohlmann, J. A., Trinkle, J. R., Steinke, J. D., Hwang, K.-O., & Henning, J. P. (2006). Glucosamine and method of making glucosamine from microbial biomass. (Patente de Estados Unidos, Nro. US7049433B2) Cargill Inc. <https://patents.google.com/patent/US7049433B2/en>

Fosdick, L. E., Bohlmann, J. A., Trinkle, J. R., Ray, B. L. (2010). Glucosamine and method of making glucosamine from microbial biomass. (Patente de Estados Unidos, Nro. US7816514B2). Cargill Inc. <https://patents.google.com/patent/US7816514B2/en?q=7816514>

Gessner, M.O., Newell, S.Y., (1997). Bulk quantitative methods for the examination of eucaryotic organoosmotrophs in plant litter. In: Hurst, M.O., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., Walter, M.V. (Eds.), *Manual of Environmental Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington, pp. 295–308.

Girometta C, Picco A, Baiguera R, Dondi D, Babbini S, Cartabia M, et al. (2019) Physico-Mechanical and Thermodynamic Properties of Mycelium-Based Biocomposites: A Review. *Sustainability*; 11: 281. <https://doi.org/10/gfwn9n>

Goodell, B. (2020). Fungi Involved in the Biodeterioration and Bioconversion of Lignocellulose Substrates. In: Benz, J.P., Schipper, K. (eds) *Genetics and Biotechnology. The Mycota*, vol 2. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-49924-2_15

GrownBio, s.f. Grow It Yourself Mycelium. Extraído el 02/03/2023 de <https://www.grown.bio/wp-content/uploads/2022/11/GIY-Substrate-GROWN-Bio.pdf>.

Haneef M., Ceseracciu L, Canale C, Bayer IS, Heredia-Guerrero JA, Athanassiou A. (2017). Advanced Materials From Fungal Mycelium: Fabrication and Tuning of Physical Properties. *Scientific Reports*; 7:41292. <https://doi.org/10.1038/srep41292> PMID: 28117421

Heaton, L.L.M., Jones, N.S. & Fricker, M.D. (2016). Energetic Constraints on Fungal Growth. *The American Naturalist*, vol. 187, no. 2.

Houette T, Maurer C, Niewiarowski R, Gruber P. (2022). "Growth and Mechanical Characterization of Mycelium-Based Composites towards Future Bioremediation and Food Production in the Material Manufacturing Cycle" *Biomimetics* 7, no. 3: 103. <https://doi.org/10.3390/biomimetics7030103>.

Iskhuemhen, O.S., Mikiashvili, N.A. and Kelkar, V. (2009) Application of Solid Waste from Anaerobic Digestion of Poultry Litter in *Agrocybe aegerita* Cultivation: Mushroom Production, Lignocellulolytic Enzymes Activity and Substrate Utilization. *Biodegradation*, 20, 351-361. <http://dx.doi.org/10.1007/s10532-008-9226-y>.

Itria, R., Bezazian, A., & Majul, L. (2021). Economía circular y biomateriales fúngicos. *Perspectivas: Revista Científica de la Universidad de Belgrano*, 4(2), 65-75.

Klamer, M. & Bååth, E. (2004). Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18:2 ω 6,9. *Soil Biology & Biochemistry* 36; 57–65.

Kumari, D., Singh, R. (2018). Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: a critical review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 877–891.

Lamps CA, Oeltmann TN, Collins MJ Jr, Robinson RD, Logan RA, Head WS, O'Day DM. (1995). Development of a chitin assay for the quantification of fungus. *Curr Eye Res.* Aug;14(8):637-41. doi: 10.3109/02713689508998490. PMID: 8529398.

Lara-Vázquez, A.R., Quiroz-Figueroa, F.R., Sánchez, A., Valdez-Vazquez, I. (2014). Particle size and hydration medium effects on hydration properties and sugar release of wheat straw fibers. *Biomass Bioenergy* 68, 67–74.

Leang, Y. & Saw, H. Y. (2011). Proximate and functional properties of sugarcane bagasse. *Agro Food Industry Hi Tech.* 22. 5-8.

Liu, H.-M. & Li, H.-Y. (2017). Application and Conversion of Soybean Hulls. *Soybean - The Basis of Yield, Biomass and Productivity.* doi: 10.5772/66744.

Liu, X., R. Bayard, R., Benbelkacem, H., Buffiere, P., Gourdon, R. (2015). Evaluation of the correlations between biodegradability of lignocellulosic feedstocks in anaerobic digestion process and their biochemical characteristics. *Biomass and Bioenergy* 81, 534-543.

Manavalan, T., Manavalan, A., Thangavelu, K. P., & Heese, K. (2012). Secretome analysis of *Ganoderma lucidum* cultivated in sugarcane bagasse. *Journal of proteomics*, 77, 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.09.004>

Matcham S. E., Jordan B. R. and Wood D. A. (1985) Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. *Appl Microbiol Biotechnol* 21:108-112.

Miller, G.L. (1959) "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". *Analytical Chemistry*; 31, 3, pp. 426-428.

Motsara, M. R., & Roy, R. N. (2008). Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis (19): Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. *FAO Viale delle Terme di Caracalla*, 153.

Mycoworks, s.f. Extraído el 20/08/2021 de <https://www.mycoworks.com/>.

Nelson, N.J. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biochem.* 153: 375-380.

Nisa, F.T., Asgher, M., Anwar, Z., Afroz, A., Zeeshan, N., Rashid, U., Irshad, M., Mehmood, S. & Sughra, K. (2014). Influence of culture conditions on ligninolytic enzymes production from *Ganoderma lucidum* using agro-industrial residues. *Fresenius Environmental Bulletin*. Vol. 12, N 12.

Olsson, P.A., Wallander, H., (1998). Interactions between ectomycorrhizal fungi and the bacterial community in soils amended with various primary minerals. *FEMS Microbiology Ecology* 27, 195–205.

Porter, D. L., & Naleway, S. E. (2022). Hyphal systems and their effect on the mechanical properties of fungal sporocarps. *Acta Biomaterialia*, 145, 272-282.

Rai, R. K., Singh, V. P., Upadhyay, A. (2017). Soil Analysis. Rai, R. K., Singh, V. P, Upadhyay, A, *Planning and Evaluation of Irrigation Projects. Methods and Implementation*. Academic Press, (Pages 505-523). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811748-4.00017-0>.

Rani, P., Kalyani, N., & Prathiba, K. (2008). Evaluation of lignocellulosic wastes for production of edible mushrooms. *Applied biochemistry and biotechnology*, 151(2-3), 151–159. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8162-y>.

Sanchez, A., Hernández-Sánchez, P., Puente, R. (2019). Hydration of lignocellulosic biomass. Modelling and experimental validation. *Industrial Crops & Products* 131, 70-77.

Seitz LM, Sauer DB, Burroughs R, Mohr ME, Hubbard JD (1979) Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopathology* 69: 1202-1203.

Shiao, M.S, Lee, K. R., Lin, L. J. & Cheng-Teh Wang (1994) Natural Products and Biological Activities of the Chinese Medicinal Fungus *Ganoderma lucidum*. *Food Phytochemicals for Cancer Prevention II*; Ho, C., et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society.

Silicaro, M.A., Marras, C.M., Bezazian, A., Núñez, M.P., Martínez, M.E., Ríos, M.B., Itria, R.F. (2022). Determinación del contenido de glucosamina en biomasa fúngica. 14° Jornadas de Desarrollo Tecnológico e Innovación - TecnoINTI 2022.

Siwulski, M., Rzymiski, P., Budka, A., Kalač, P., Budzyńska, S., Dawidowicz, L, Hajduk, E., Kozak, L., Budzulak, J., Sobieralski, K. & Niedzielski, P. (2019). The effect of different substrates on the growth of six cultivated mushroom species and composition of macro and trace elements in their fruiting bodies. *European Food Research and Technology* 245:419–431. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3174-5>

Skea, J., Shukla, P. R., Reisinger, A., Slade, R., Pathak, M., Al Khourdajie, A., ... & Winkler, H. (2022). Summary for policymakers. In *Climate Change 2022: Mitigation of Climate Change: Contribution of Working Group III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press.

Slavin, Y. N., & Bach, H. (2022). Mechanisms of Antifungal Properties of Metal Nanoparticles. *Nanomaterials*, 12(24), 4470.

Somogyi, M.J. (1952). Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195:19-23.

Sparling, G., Vojvodicâ-Vukovicâ, M. & Schipper, L. A. (1998). Hot-water-soluble C As A Simple Measure Of Labile Soil Organic Matter: The Relationship With Microbial Biomass C. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 30, No. 10/11, pp. 1469-1472.

Stamets, P. (2000). *Growing gourmet and medicinal mushroom*. 3rd edition. Olympia, WA: Ten Speed Press.

Sydor M., Bonenberg A., Doczekalska B. and Cofta G. (2022). Mycelium-Based Composites in Art, Architecture, and Interior Design: A Review. *Polymers* 14, 145. <https://doi.org/10.3390/polym14010145>.

Tacer-Caba, Z., Varis, J.J, Lankinen, P., Mikkonen, K. S. (2020). Comparison of novel fungal mycelia strains and sustainable growth substrates to produce humidity-resistant biocomposites. *Materials and Design* 192; 108728.

Tengerdy, R.P. & Szakacs, G. (2003). Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13, 169–179.

Terebiznik, M.R. & Pilosof, A.M.R. (1999). Biomass estimation in solid state fermentation by modeling dry matter weight loss. *Biotechnology Techniques* 13: 215–219.

Terzzoli, L. & Kuhar, F. (2019) "Cultivo de hongos comestibles de la madera". *Revista boletín biológica* No 41(13), pp. 25-28.

United Nations Environment Programme (2022). *2022 Global Status Report for Buildings and Construction: Towards a Zero-emission, Efficient and Resilient Buildings and Construction Sector*. Nairobi.

Wymelenberg, A. V., Gaskell, J., Mozuch, M., BonDurant, S. S., Sabat, G., Ralph, J., Skyba, O., Mansfield, S. D., Blanchette, R. A., Grigoriev, I. V., Kersten, P. J. & Cullen, D. (2011). Significant alteration of gene expression in wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium* by plant species. *Applied and Environmental Microbiology* 77:4499-4507.

Yamanaka, S., & Kikuchi, R. (1991). Complex of fibers and fungi and a process for preparation thereof (United States Patent No. US5074959A). <https://patents.google.com/patent/US5074959A/en>

Ziegler A. R., Bajwa, S. G., Holt, G. A., McIntyre, G. & Bajwa, D.S. (2016) Evaluation of Physico-Mechanical Properties of Mycelium Reinforced Green Biocomposites Made from Cellulosic Fibers. *Applied Engineering in Agriculture*. 32: 931–938. <https://doi.org/10/f9k93x>

Zill, G., Engelhardt, G. & Wallnöfer, P.R. (1988) Determination of ergosterol as a measure of fungal growth using Si 60 HPLC. *Z Lebensm Unters Forch* 187, 246–249. <https://doi.org/10.1007/BF01043348>