

Incorporación de cafeína en el hongo *Pleurotus sajor-caju* cultivado sobre pulpa de café

Ivonne Jeannette Nieto Ramirez, Carolina Chegwin Angarita y Hector Jairo Osorio Zuluaga

Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Resumen Al estudiar la composición química de los metabolitos secundarios de *Pleurotus sajor-caju* cultivado en pulpa de café, se encontró que el hongo tiene la capacidad de incorporar en su fructificación la cafeína, componente del sustrato (cerca del 1,3% en base seca), sin modificar la estructura del alcaloide, lo que constituye un resultado que no es el esperado en las especies pertenecientes al reino de los hongos.

Palabras clave *Pleurotus sajor-caju*, Pulpa de café, Cafeína, Metabolitos secundarios

Incorporation of caffeine into the macromicete fungus *Pleurotus sajor-caju* growing on coffee pulp

Summary When the chemical composition of secondary metabolites from the *Pleurotus sajor-caju* growing on coffee pulp were study, it was found that the fungus has the faculty of incorporating caffeine inside its fructiferous body. Component of the substrate (around 1.3% on dry basis) did not show a structural change over the alkaloid; this constitutes an unexpected outcome for a species belonging to realm of the fungi.

Key words *Pleurotus sajor-caju*, Coffee pulp, Caffeine, Secondary metabolites

El género *Pleurotus* contempla una amplia variedad de hongos comestibles que comprende cerca de 39 especies. El ciclo de cultivo de este género es de 75 días, tiempo en el cual se recolectan cuatro cosechas, obteniéndose la primera al mes de haberse hecho la siembra [5]. Aunado a esto, se ha descrito una eficiencia biológica que puede, incluso, exceder el 100% (en base seca) [6]. Entre sus cualidades nutricionales se encuentra el alto contenido en proteínas (entre 23% y 30%) y vitaminas (destacando las vitaminas constituyentes del complejo B), permitiendo a quienes deben disminuir el consumo de carnes rojas, sustituir o complementar sus comidas con este hongo. Además de ello, la versatilidad de su cultivo ha despertado el interés de los cultivadores de hongos de varias especies de este género [7,9], ocupando el segundo lugar en la produc-

ción mundial, con cerca del 25% de la producción total representada por este género (principalmente la especie *Pleurotus ostreatus*), siendo China su mayor productor [9]. Son también una importante fuente de calcio y fósforo [1,2] y se cultivan en un amplio rango de desperdicios de plantas (paja, aserrín, cáscaras de algodón), lo que constituye un indicio de demandas nutricionales simples para su desarrollo [8].

Colombia, siendo un país caficultor por excelencia, en el que se producen como desechos miles de toneladas anuales de pulpa y tallo de cafeto, cuenta con un potencial enorme para el cultivo de los hongos en dichos sustratos, contribuyendo así a la solución de este problema ambiental, ya que estos desechos se han convertido en uno de los principales contaminantes de los suelos y las fuentes hídricas. De acuerdo con estudios recientes, en Colombia se tienen aproximadamente 800.000 hectáreas cultivadas de café, que generan en promedio dos toneladas de pulpa frescapor hectárea y año [5]. El Centro Nacional de Investigaciones del Café (CENICAFÉ), con el fin de presentar alternativas de manejo y aprovechamiento de este subproducto que resulten atractivas para los caficultores colombianos, ha investigado durante seis años el cultivo de hongos del género *Pleurotus*, concretamente con cepas de *Pleurotus florida*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus pulmonarius* y *P. ostreatus*, en pulpa de café obtenida de un proceso de beneficio ecológico, así como las posibles modificaciones de los constituyentes del hongo debidas al sustrato, área esta última en la cual se han venido desarrollando investigaciones dentro del grupo de Química de Hongos Macromicetos de la Universidad Nacional de Colombia.

Dirección para correspondencia:

Dra. Ivonne Jeannette Nieto
Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia
Ciudad Universitaria, Carrera 30 No. 45-03
Edificio 451 Laboratorio 210
Bogotá, Colombia
Tel.: +57 1 3165000 extensión 14413
Fax: +57 1 3165220
E-mail: ijnietor@unal.edu.co

Aceptado para publicación el 27 de enero de 2006

©2007 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 €

Materiales y métodos

La cepa de *P. sajor-caju* (P161) con la que se logró obtener una eficiencia biológica del 76,3%, fue suministrada por el Centro Nacional de Investigaciones del Café CENICAFÉ (municipio de Chinchiná - Caldas - Colombia), donde es cultivado siguiendo la metodología descrita a continuación [5]. La cepa madre, se multiplicó en botellas planas conteniendo como medio de cultivo agar extracto de malta, incubándose en la oscuridad bajo condiciones ambientales. Cuando el micelio invadió por completo las botellas planas, se multiplicó en granos de trigo para conformar la semilla. En bolsas de polipropileno con trigo hidratado (1,5 kg con 45% de humedad), previamente esterilizadas mediante el procedimiento de Tyndall (doble esterilización con intervalo de 24 h, durante 20 min a 121 °C), se sembraron las semillas de la cepa madre. Se evaluó diariamente el crecimiento micelial y cuando la invasión del hongo estuvo entre el 95-100%, se almacenaron las bolsas a 4 °C.

La pulpa de café provenía de un despulpado sin agua con menos de un día. Se agregó carbonato de calcio, se homogeneizó y luego se empacó en bolsas de fibra, que se sumergieron en recipientes con agua. Así estuvieron durante 10 días con el fin de retirar el alto contenido de azúcares del sustrato, ya que interfieren en el desarrollo micelial del hongo al favorecer el establecimiento de otros microorganismos (bacterias y levaduras). Al término de este periodo, se sacaron de las canecas, dejando escurrir el exceso de agua del sustrato, hasta obtener unos seis litros de drenado, lo que asegura una humedad final en la pulpa del 80%. El sustrato escurrido se dispuso a granel sobre un mesón, previamente desinfectado; se inoculó con la semilla, se mezcló de forma homogénea y se empacó en bolsas negras con orificios dispuestos en los laterales y la zona inferior (2 kg de semilla/100 kg de sustrato).

La incubación, se realizó en un cuarto provisto de estanterías de madera, donde se colocaron las bolsas. Las estanterías se espolvorearon con carbonato de calcio para controlar hongos e insectos presentes en el ambiente. Se propiciaron las condiciones necesarias para el crecimiento micelial, instalando una escotilla de ventilación que permitía un cambio natural de aire, si el volumen ocupado por las bolsas era inferior al 10% del volumen del cuarto. Si el volumen es superior, se recomienda realizar cambios de aire a razón de 100 m³ por tonelada de sustrato/h, inspeccionando periódicamente el crecimiento del micelio.

La fructificación y cosecha se realizaron en otro cuarto, provisto también de estanterías, y con las condiciones adecuadas de luminosidad y humedad. Los cuartos fructíferos de la primera cosecha se recogían periódicamente, y de manera manual (con una torsión sobre el estípote), teniendo en cuenta su madurez (cuando el borde

del píleo presentaba una ligera inclinación hacia el interior), se secaron en estufa de convección a 40 °C y se molieron.

Partiendo de 164 g de este material molido se realizó el proceso de aislamiento del alcaloide del modo habitual para este tipo de compuestos [4], obteniendo 12 g de extracto. Sus componentes se separaron por cromatografía en columna en silicagel, empleando como eluyente una mezcla de tolueno y acetato de etilo, desde solo tolueno hasta una proporción de 4:6. La fracción en la que se encontró la cafeína fue llevada a desecación y el alcaloide purificado por sublimación y caracterizado por la determinación de su punto de fusión (234 °C) y por cromatografía de gases utilizando un equipo Hewlett Packard 6890 (columna capilar HP5 de 30 m de largo, 0,33 mm de diámetro interno y 25 µm de espesor y helio como gas de arrastre: 4,5 a 1 ml/min desde 90 °C hasta 300 °C a 5 °C/min), acoplado a un espectrómetro de masas 5973 con una fuente de ionización de 70eV. El espectro de RMN¹H fue tomado en un equipo Bruker Bio Spin (frecuencias 400 MHz, CDCl₃ como disolvente y tetrametilsilano como estándar interno), y el del infrarrojo en un espectrofotómetro Perkin Elmer FT-IR 1750 (en fase sólida al 1% en micropastillas de KBr).

Resultados

El análisis del cromatograma de gases de la fracción en donde se encuentra la cafeína (Figura 1), evidencia la presencia de un solo componente a un tiempo de retención de 10,70 min. En la espectrometría de masas (Figura 2) aparecen los picos provenientes de las escisiones del alcaloide como son 179 (M⁺-Metilo), 165 (M⁺-Metilo-N), 150 (165-Metilo), 137 (M⁺-C=O), 122 (137-Metilo), 109 (137-C=O) y 94 (109-Metilo).

En el espectro del infrarrojo (Figura 3) se observan las bandas en 3111 cm⁻¹, 2953 cm⁻¹ (estiramiento C-H de metilo), 1702 cm⁻¹ (estiramiento C=O en lactamas de seis miembros), 1656 cm⁻¹ (estiramiento C=O para amidas terciarias), 1549 cm⁻¹ (estiramiento C=C), 1289 cm⁻¹ (estiramiento C-N en aminas cíclicas).

El espectro de RMN¹H (Figura 4) presenta señales a 7,51 ppm (1H, singlete, HA), 3,99 ppm (3H, singlete, HB), 3,57 ppm (3H, singlete, HC) y 3,39 ppm (3H, singlete, HD).

La cuantificación realizada por el método normal de barrido y por el método de áreas relativas, dio un total del 7,08% de contenido del alcaloide con relación a los otros metabolitos identificados, dentro de los que se cuentan ácidos grasos, triterpenos y esteroides, entre otros, constituyéndose en uno de los componentes mayoritarios del extracto estudiado.

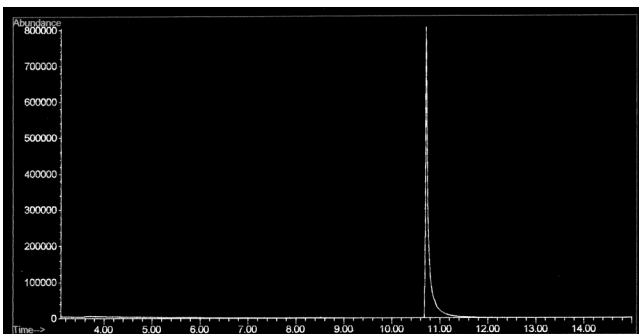


Figura 1. Cromatograma de gases de la fracción compuesta por cafeína.

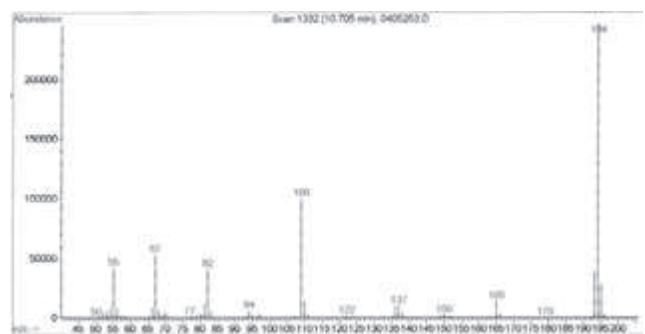


Figura 2. Espectro de masas de cafeína.

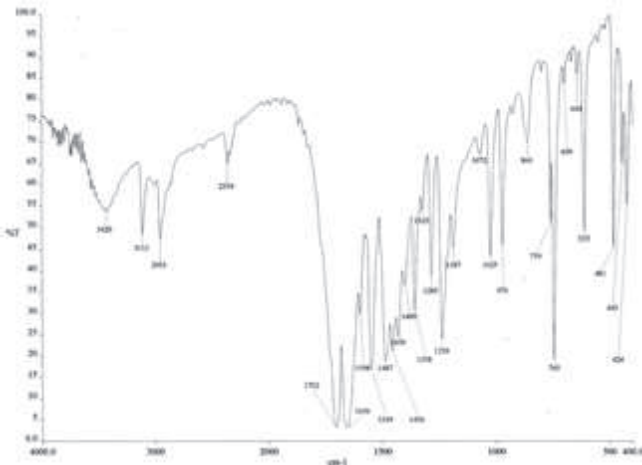


Figura 3. Espectro Infrarrojo de cafeína.

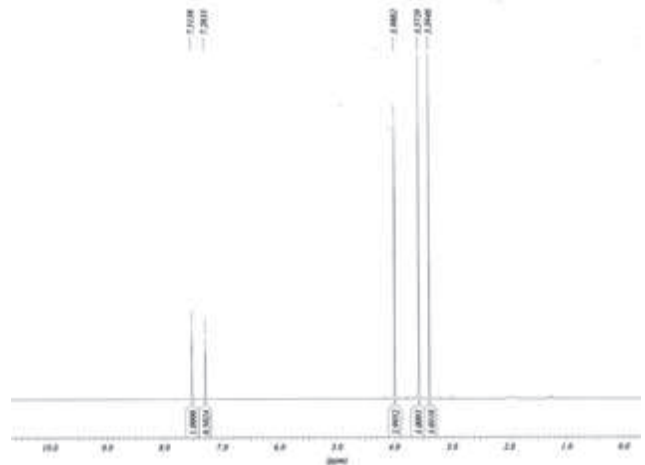


Figura 4. Espectro de resonancia magnética nuclear protónica de cafeína.

Discusión

Con los resultados obtenidos en esta investigación, se determinó la presencia de cafeína en las fructificaciones analizadas como producto del proceso de incorporación a partir del sustrato sobre el que se cultivó *P. sajor-caju*. La pulpa de café utilizada como sustrato tiene dentro de su composición un porcentaje del 1,3% del alcaloide en base seca, que fue parcialmente incorporado sin ser degradado. Este comportamiento, que no es habitual dentro de los hongos, ya que en la mayoría de los casos los componentes del sustrato son metabolizados para así conseguir sustancias que le sean útiles al hongo, coincide con lo descrito por Salmones et al. [6], quienes observaron la disminución en el contenido de cafeína en el sustrato a medida que se producía el crecimiento de *Pleurotus* spp. sobre pulpa de café, y el aumento dentro del cuerpo fructífero y el micelio de los hongos, llegando a la conclusión de que las especies pertenecientes a este género no tienen la habilidad de degradar la cafeína cuando son cultivadas sobre pulpa y cáscara de café. Dicho resultado contrasta con lo obtenido por Job [3], que empleó borra de café como sustrato para *Pleurotus ostreatus*, encontrando que el hongo no incorpora cafeína sino que, por el contrario, la degrada totalmente. Dicho investigador propone la hipótesis de que existe variación en el comportamiento fisiológico alrededor de una misma especie y que puede provenir de la diferencia entre las cepas, ya que la utilizada por él no incor-

poraba el alcaloide, como sí se ha encontrado en nuestro estudio. Esta peculiaridad de no degradar componentes que son incorporados del sustrato, es una característica que abre un amplio número de interrogantes con respecto a si estos hongos presentan esta misma particularidad con otro tipo de sustratos sobre los que pudieran cultivarse, lo que sería una herramienta interesante si el objetivo fuera la incorporación de algún componente de especial interés que pudiera aportar un valor agregado a los propios del género *Pleurotus*.

Además, dentro del estudio de los metabolitos secundarios del *P. sajor-caju*, se encontraron cuatro componentes que en las espectrometrías de masas evidenciaron un ión molecular de masa impar, dando indicios de compuestos nitrogenados que podrían provenir de la degradación parcial de la cafeína o de la incorporación de componentes del sustrato. Ello hace necesario continuar con el estudio de los hongos pertenecientes a este género cultivando sobre diferentes sustratos, para poder establecer claramente si *Pleurotus*, dados sus procesos metabólicos inusuales, tiene la particularidad de incorporar sin metabolizar constituyentes de los sustratos, y si esto se hace extensivo a las diferentes clases de cepas.

Bibliografía

- Bermúdez R, Donoso F, Martínez C, Ramírez E, Morris H. Efecto de la luz en la concentración de micosteroides de *Pleurotus ostreatus* var. Florida. Rev Cubana Aliment Nutr 2002; 16: 13-18.
- Fasidi I, Ekuere U. Studies on *Pleurotus tuber-regium* (Fries) Singer: cultivation, proximate composition and mineral contents of sclerotia. Food Chem 1993; 48: 255-258.
- Job D. La utilización de la borra del café como sustrato de base para el cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr) Kummer. Rev Iberoam Micol 2004; 21: 195-197.
- Kam T, Iek I, Choo Y. Alkaloids from the stem-bark of *Alstonia macrophylla*. Phytochem 1999; 51: 839-844.
- Rodríguez-Valencia N, Gómez-Cruz F. Cultive hongos comestibles en pulpa de café. Chinchiná-Caldas, Colombia. Avances técnicos Cenicafe 2001: 285.
- Salmones D, Mata G, Waiszewski K. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. Bioresource Technol 2005; 96: 537-544.
- Valencia G, Castelán R, Garín M, Leal H. Biological quality of proteins from three strains of *Pleurotus* spp. Food Chem 2006; 94: 494-497.
- Yang J, Lin H, Mau J. Non-volatile taste composition of several commercial mushrooms. Food Chem 2001; 72: 465-471.
- Yıldız A, Karakaplan M, Aydın F. Studies on *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kum. var. *Salignus* (Pers. ex Fr) Konr. et Maubl.: cultivation, proximate composition, organic and mineral composition of carpophores. Food Chem 1998; 61: 127-130.