

# Ecuación estequiométrica para describir el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* cepa ceba-gliie-po-010606

✉ Julio A Pineda-Insuasti<sup>1</sup>, Claudia P Soto-Arroyave<sup>2</sup>, Luis B Ramos-Sánchez<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Centro Ecuatoriano de Biotecnología del Ambiente, CEBA

<sup>2</sup> Pontificia Universidad Católica del Ecuador, PUCESI

Ibarra, Imbabura, Ecuador

<sup>3</sup> Departamento de Ingeniería Química, Universidad Ignacio Agramonte Loynaz

Camagüey, Cuba

✉ pinsuasti@yahoo.com

## RESUMEN

Se desarrolló una ecuación estequiométrica aproximada que describe el crecimiento de la cepa ceba-gliie-010606 de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos de la cosecha del fréjol. El trabajo parte de establecer fórmulas empíricas para el residuo del fréjol fresco seco ( $\text{CH}_{1.81}\text{O}_{0.81}\text{N}_{0.15}$ ) y la biomasa de la cepa del hongo ( $\text{CH}_{1.83}\text{O}_{0.84}\text{N}_{0.26}$ ). Para ello se determinó la composición elemental de estas materias primas y su contenido de cenizas. Los coeficientes estequiométricos permiten estimar importantes parámetros del proceso de crecimiento; entre ellos: la eficiencia biológica teórica (867.49 g de materia seca del hongo (MSH)/kg de materia seca del sustrato), el coeficiente medio de respiración (0.77 mol  $\text{CO}_2$ /mol  $\text{O}_2$ ), el consumo específico de aire para el proceso de crecimiento (1.36 m<sup>3</sup>/kg MSH), así como el calor metabólico (16 576.47 kJ/kg MSH).

**Palabras claves:** *Pleurotus ostreatus*, fermentación sólida, hongo comestible, estequiometría

*Biotecnología Aplicada* 2014;31:43-47

INVESTIGACIÓN

## Abstract

**Stoichiometry equation to describe the growth of the *Pleurotus ostreatus* ceba-gliie-po-010606 strain.** This work was aimed at developing a proximate stoichiometric equation to describe the growth of *Pleurotus ostreatus* mushroom strain ceba-gliie-po-010606 on picking beans (*Phaseolus vulgaris*) waste. Empirical formulas were established for the residue of fresh dried picking beans ( $\text{CH}_{1.81}\text{O}_{0.81}\text{N}_{0.15}$ ) and the biomass of the fungal strain ( $\text{CH}_{1.83}\text{O}_{0.84}\text{N}_{0.26}$ ). The elemental composition of these materials and the ashes were determined. The stoichiometric coefficients obtained further supported the estimation of parameters relevant for fungal growth characterization: theoretical biological efficiency (867.49 g of fungal dry matter (FDM)/kg of substrate dry matter), mean coefficient of breath (0.77  $\text{CO}_2$ /mol  $\text{O}_2$  consumption), specific air consumption (1.36 m<sup>3</sup>/kg FDM) and metabolic heat (16 576.47 kJ/kg FDM).

**Keywords:** *Pleurotus ostreatus*, solid fermentation, edible fungus, stoichiometry

## Introducción

Se estima que la producción mundial de biomasa, materia viva producida por la Tierra, sea de 146 billones de toneladas métricas al año [1]. Estos recursos tienen un gran potencial para enfrentar los retos de agotamiento de las fuentes tradicionales de combustibles no convencionales y los peligros para la seguridad alimentaria de la mayoría de los países.

Una de las posibles vías de aprovechamiento de estos residuos es la producción de hongos comestibles [2]. Se estima que con un cuarto de los residuos de cereales producidos anualmente, se les podrían suministrar diariamente 250 g de hongo fresco a más de cuatro millones de personas [3]. El incremento de la producción mundial de hongos y trufas es muy significativo. Según el análisis de Toland y Lucier [4] de los datos ofrecidos por la Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la producción mundial de esta importante fuente de proteínas y otros nutrientes valiosos, creció exponencialmente desde 1961 hasta 2009, y se duplica cada 13.02 años. Entre los hongos comestibles más producidos está *Pleurotus ostreatus* [2], cultivado en gran parte del mundo, tanto en climas templados como cálidos.

Los métodos de cultivo de hongos se han desarrollado mayormente de forma empírica. Muchos de los

conocimientos desarrollados no se publican o están protegidos por numerosas patentes [5-14]. El desarrollo de procesos biológicos cada vez más eficientes precisa la aplicación de procedimientos con un enfoque más mecanístico. Estos procedimientos sirven de base al desarrollo de modelos matemáticos de procesos y a la implementación de procedimientos de optimización basados en la simulación computacional [16]. De esta manera, el diseño de procesos se convierte en un problema de programación matemática, lo que algunos identifican como transición del diseño *in vitro* al diseño *in silico* [15, 17, 18].

Una de las contribuciones primarias al desarrollo de los modelos de los bioprocesos proviene de la identificación de un modelo estequiométrico, útil para establecer relaciones másicas entre las principales materias primas involucradas [19]. De estos modelos se derivan análisis simplificados, en los que se emplea una sola ecuación estequiométrica global, con un enfoque no estructurado o, más complejos, con varias ecuaciones basadas en el metabolismo celular y la interacción célula-medio de cultivo [19, 20]. Tras un análisis exhaustivo de la literatura sobre el tema, no se encontró referencia a una ecuación estequiométrica, para describir el crecimiento del basidiomiceto

1. Álvarez-Castillo A, García-Hernández E, Domínguez-Domínguez MM, Granados-Boeza J, Aguirre-Cruz A, Morales-Cepeda A, et al. Aprovechamiento integral de los materiales lignocelulósicos. *Rev Iberoam Polim.* 2012;13(4):140-50.

2. Chukwurah NF, Eze SC, Chiejina NV, Onyeonagu CC, Ugwuoke KI, Ugwu FSO, et al. Performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in different local agricultural waste materials. *Afr J Biotechnol.* 2012;11(37):8979-85.

3. Mane VP, Patil SS, Syed AA, Baig MM. Bioconversion of low quality lignocellulosic agricultural waste into edible protein by *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2007;8(10):745-51.

4. Pineda-Insuasti J, Ramos-Sánchez LB. Producción de proteínas comestibles con fuentes alternativas de materias primas. *Axioma.* 2013;1(10):5-9.

5. Álvaro H, inventor; Garrigues Fongs SL; assignee. Procedimiento para la obtención de una composición de un sustrato para el cultivo de hongos. Spain patent ES 2 166 337 A1. 2000 Jul 24.

*P. ostreatus* en residuos agroindustriales. El objetivo de este trabajo es desarrollar una ecuación estequiométrica para el crecimiento de la cepa ecuatoriana ceba-gliie-po-010106 de *P. ostreatus* sobre residuos agrícolas de la producción de fréjol.

## Materiales y métodos

### Cepa

Se usó la cepa ceba-gliie-po-010606 de *P. ostreatus*, pertenecientes a la colección de cultivos del Centro Ecuatoriano de Biotecnología del Ambiente. Esta se conservó en agar-extracto de malta a 4 °C.

### Materias primas

Para el desarrollo de las fórmulas empíricas se estudiaron dos materias primas: residuos de la cosecha de fréjol (*Phaseolus vulgaris*), o sea, la planta completa y la biomasa de *P. ostreatus*. Las muestras del residuo de fréjol, materia prima original, se tomaron en las comunidades productoras de fréjol de las provincias de Imbabura y Carchi: La Concepción, Salinas y Amabúquí (Figura 1).

### Procedimiento para el muestreo del residuo de fréjol fresco

Para el muestreo del residuo de fréjol y la biomasa del hongo, se siguieron los principios de muestreo expuestos por Oakland [21]. En un periodo de tres meses, cada mes se tomaron tres muestras de 14 kg de residuos de fréjol, previamente secados al sol durante el proceso de cosecha. En total tomaron nueve muestras. Cada mes se siguió el siguiente tratamiento: las tres muestras se trituraron por separado hasta 9 mm en un molino de martillo y luego se mezclaron. La mezcla se extendió sobre el piso en un marco cuadrado de 4 m<sup>2</sup>. El cuadrado se dividió en cuatro cuadrantes iguales. De cada cuadrante se tomó una porción de 1 kg de la mezcla y se trituró en un molino manual hasta un tamaño de 1 mm. En estas condiciones se extendió en el piso, en un marco cuadrado de 1 m<sup>2</sup> y se dividió en cuatro cuadrantes iguales, de donde se tomaron muestras de 25 g de cada cuadrante, las que se mezclaron y empaclaron en una bolsa de polietileno para ser almacenadas a 4 °C durante el período de muestreo (Figura). Este procedimiento se repitió en los tres meses, lo que generó tres muestras de 100 g para cada mes.

### Procedimiento para el muestreo de biomasa de *Pleurotus ostreatus*

El residuo de fréjol recogido cada mes se utilizó en la planta de producción de hongos *P. ostreatus*, del Centro Ecuatoriano de Biotecnología del Ambiente (CEBA). La producción de esta biomasa fue la acopiada durante tres brotes del cuerpo fructífero, hasta completar 51 días; tiempo a partir del cual no se observaba crecimiento significativo. Durante la producción no se adicionó ningún nutriente al medio de crecimiento. Se tomaron tres muestras de biomasa de 1 kg, una de cada cámara de producción, por cada mes, durante tres meses, para un total 9 kg. La biomasa fúngica producida cada mes se secó en una estufa a 70 °C hasta un peso constante. Luego fue molida en un molino manual y extendida en una mesa en un marco

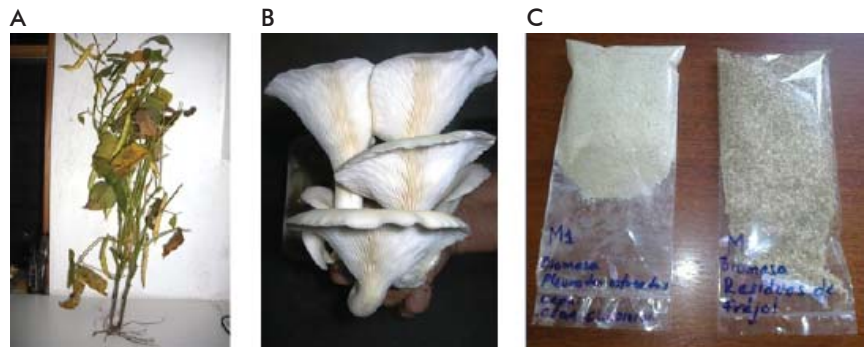


Figura. Materias primas estudiadas. A) Residuos de plantas completas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*). B) Champiñón ostra (*Pleurotus ostreatus*). C) Muestras de biomasa listas para análisis elemental.

cuadrado de 1 m<sup>2</sup>. Este cuadrado se subdividió en cuatro cuadrantes iguales, y se tomó una muestra de 25 g de cada uno. Estos 100 g se mezclaron hasta alcanzar la homogeneidad y se almacenaron a 4 °C durante el período de muestreo. En ese período se obtuvieron tres muestras de 100 g cada una.

### Procedimiento de cultivo de la biomasa por fermentación sólida

Los residuos de fréjol se trituraron hasta 9 mm, y su humedad se ajustó hasta el 70 %. Se llenaron bolsas de polipropileno con 300 g de sustrato, y posteriormente se pasteurizaron en un esterilizador, con una presión de 103.46 kPa, durante 30 min. Cuando el sustrato alcanzó la temperatura ambiente, se inoculó con 4 % de base seca. Las muestras se incubaron a una temperatura constante, a 20 °C durante 51 días. Para evitar contaminaciones durante el crecimiento de las hifas se mantuvo una humedad relativa promedio de 85 %, y luego de aparecer el primordio se incrementó hasta 90 %. Quince días después se recolectó la seta cuando esta alcanzó una talla promedio de 8 cm. El experimento se realizó con tres bolsas como réplicas.

### Técnica analítica para la composición elemental

Las muestras se analizaron en el Centro de Investigación de Servicios y Análisis Químicos (CISAQ), de la Universidad Nacional de Loja, Ecuador. Para el análisis elemental se utilizó un equipo PerkinElmer, modelo 2400, serie II [22]. Esta técnica proporciona el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre, presentes en un amplio abanico de muestras de naturaleza orgánica e inorgánica, tanto sólidas como líquidas, usando el método clásico de Pregl-Dumas [22, 23]. Este método consiste en la combustión de una muestra de masa conocida a alta temperatura (aproximadamente 900 °C), en presencia de oxígeno puro. Ello conduce a la liberación de dióxido de carbono, agua y nitrógeno. Los gases se hacen pasar por columnas especiales que absorben el dióxido de carbono y el agua. Una columna que contiene un detector de conductividad térmica separa el nitrógeno de cualquier residuo de dióxido de carbono residual y el agua, y se mide el contenido de nitrógeno resultante. El instrumento se debe calibrar primero mediante el análisis de un material que es puro y tiene una concentración de nitrógeno conocida. La señal medida desde

6. Dunn-Coleman NS, Michaels TJ, inventors; Monterey Mushrooms, Inc., assignee. Composting process for the production of mushroom cultivation substrates. United States patent US 4848026 A. 1989 Jul 18.

7. Giovannozzi G, Luigi P, Baldo R, Porri A, D'Annibale A, Perani C, inventors; Consiglio Nazionale Delle Ricerche, Università Studi Della Toscana, assignee. Process for the production of cellulose paper pulps by biodelignification vegetative masses. United States patent US 6379495 B1. 2002 Abr 30.

8. Hisakazu I, Oaza S, Hanishina-Gun N, inventors; Hisakazu Ikeda, assignee. Obtaining edible material from fungus-digested medium. Europe patent EP 0357320 A2. 1989 Aug 22.

9. Ikeda H, inventor; Ikeda H, assignee. Edible material containing mushroom. United States patent US 5028441 A. 1991 Jul 2.

10. Kok T, inventor; Everbloom Mushroom (Pte) Ltd., assignee. Mushrooms cultivation. Europe patent EP 0248636 A3. 1987 Jun 2.

11. Ladisch M, Kohlman K, Westgate P, Weil J, Yang Y, inventors; Purdue Research Foundation Office of Technology Transfer, assignee. Processes for treating cellulosic material. United States patent US 5846787. 1998 Jul 11.

12. Mee H, inventor; The Kinoko Company, assignee. Method for growing wood mushroom. United States patent US 4127965. 1978 Dec 5.

13. Suryanarayan S, Mazundar K, inventors; Biocan India Limited, assignee. Solid state fermentation. United States patent US 6197573 B1. 2001 Mar 6.

14. Toth E, Toth L, Heltay I, inventors; Licencia Talalmanyokat Ertekesito Vallalat, assignee. Mushroom growing process. United States patent US 3996038. 1976 Dec 7.

15. Kiparissides A, Koutinas M, Kontoravdi C, Mantalaris A, Pistikopoulos EN. Closing the loop in biological systems modeling - From the *in silico* to the *in vitro*. *Automatica*. 2011;47(6):1147-55.

16. Rodríguez-Fernández M, Balsa-Canto E, Egea JA, Banga JR. Identifiability and robust parameter estimation in food process modeling: Application to a drying model. *J Food Eng*. 2007;83(3):374-83.

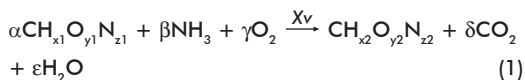
el detector de conductividad térmica para la muestra desconocida se puede convertir en un contenido de nitrógeno [24, 25].

### Cálculos para la fórmula empírica de las materias primas

Mediante la técnica antes descrita se obtienen datos de los elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre, presentes en el residuo fresco de fréjol y en la biomasa del cuerpo fructífero. El oxígeno se calcula por diferencia, lo que significa desprejar la presencia significativa de otros elementos. Las concentraciones de los elementos en la fase sólida se calculan para la fracción orgánica, luego de haber restado las cenizas presentes en la muestra. Con estos datos se calculan las proporciones atómicas relativas de cada elemento, dividiendo su fracción másica por la masa atómica de cada uno. A partir de estas proporciones atómicas relativas pueden deducirse las relaciones atómicas al dividir cada uno de los valores entre el valor del carbono, y todo se expresa por átomo-gramo de carbono. En la fórmula empírica de las materias primas de este trabajo, no se incluyó el azufre, por estar en proporciones muy pequeñas, y no ser relevante para los balances estequiométricos.

### Propuesta de modelo estequiométrico simplificado

Se parte de considerar el crecimiento aerobio de las células en un mecanismo simplificado, expresado mediante una ecuación estequiométrica. En esta ecuación, el sustrato fresco del fréjol junto a un suplemento de nitrógeno en forma de amoníaco, más el oxígeno como reactantes, se transforman en productos, debido a la presencia del hongo como biocatalizador. Los productos considerados son la biomasa de *P. ostreatus*, el CO<sub>2</sub> y el agua:



La determinación de los coeficientes estequiométricos parte de un balance por elementos en la ecuación (1) [19]:

$$\text{C: } \alpha = 1 + \delta \quad (2)$$

$$\text{H: } x_1\alpha + 3\beta = x_2 + 2\varepsilon \quad (3)$$

$$\text{O: } y_1\alpha + 2\gamma = y_2 + 2\delta + \varepsilon \quad (4)$$

$$\text{N: } z_1\alpha + \beta = z_2 \quad (5)$$

Donde:

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\varepsilon$  son coeficientes estequiométricos expresados como moles del compuesto por mol de materia seca del hongo (mol/mol MSH).

$x_i$ : contenido de hidrógeno en la molécula por átomo-gramo de carbono.

$y_i$ : contenido de oxígeno en la molécula por átomo-gramo de carbono.

$z_i$ : contenido de nitrógeno en la molécula por átomo-gramo de carbono.

Solo se dispone de cuatro ecuaciones para cinco incógnitas, por lo que se necesita una ecuación adicional. Una alternativa que se recomienda es el balance

de electrones [19, 26]. Para ello es necesario calcular el grado de reducción de las especies involucradas ( $\lambda$ ). Este factor se define como el número de moles de electrones disponibles por átomo-gramo de carbono que se debe transferir al O<sub>2</sub> en la combustión completa de un compuesto hasta CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y N<sub>2</sub>. Para el carbono, el número de electrones disponibles es 4, para el hidrógeno es 1, -2 para el oxígeno y -3 para el nitrógeno [19]. El signo se asocia a si se entregan o aceptan los electrones. Según ello, el grado de reducción para el CO<sub>2</sub>, el H<sub>2</sub>O y el NH<sub>3</sub> es cero. Un balance de electrones en la ecuación (1) conduce a:

$$\lambda: \lambda_{\text{FF}}\alpha - 4\gamma = \lambda_{\text{XV}} \quad (6)$$

Donde:

$\lambda_{\text{FF}}$  y  $\lambda_{\text{XV}}$  son los grados de reducción del residuo de fréjol fresco y de la biomasa del hongo (electrones/mol).

De esta manera, las ecuaciones (2) a la (6) conforman un sistema de ecuaciones algebraicas lineales con solución única para sus incógnitas.

### Parámetros derivados de la ecuación estequiométrica

Teniendo en cuenta la estequiometría de la ecuación (1) se pueden definir importantes factores asociados con la producción de la biomasa de hongos, como la eficiencia biológica (EB), el coeficiente de respiración (CR; mol CO<sub>2</sub>/mol O<sub>2</sub>), el consumo específico volumétrico de aire ( $q_{\text{Aire}}$ ) y el calor metabólico (- $\Delta H_m$ ):

$$\text{EB} = \frac{\text{MM}_{\text{XV}}}{\alpha \text{MM}_{\text{FF}}} \frac{(1 - A_{\text{FF}})}{(1 - A_{\text{XV}})} 1 \times 10^3 \quad (7)$$

Donde:

EB: eficiencia biológica (g MSH/kg MSS)

MSS: materia seca del sustrato

MM<sub>XV</sub>: masa molecular de la biomasa libre de cenizas (g/mol)

A<sub>FF</sub>: ceniza del residuo del fréjol fresco (g/mol)

MM<sub>FF</sub>: masa molecular del residuo de fréjol fresco libre de cenizas (g/mol)

A<sub>XV</sub>: ceniza de la biomasa (g/mol);

$$q_{\text{Aire}} = \frac{\text{MM}_{\text{O}_2}}{\text{MM}_{\text{XV}}} \frac{\gamma}{Y_{\text{O}_2} \rho_{\text{Aire}}} \quad (8)$$

Donde:

$q_{\text{Aire}}$ : consumo específico volumétrico de aire (m<sup>3</sup>/kg MSH)

MM<sub>O<sub>2</sub></sub>: masa molecular del oxígeno (g/mol)

$Y_{\text{O}_2}$ : fracción de oxígeno en el aire (mol O<sub>2</sub>/mol total);

$\rho_{\text{Aire}}$ : densidad del aire (kg/m<sup>3</sup>)

$$\text{CR} = \frac{\delta}{\gamma} \quad (9)$$

Según Ertola *et al.* [19], el calor liberado en el proceso metabólico es proporcional a la cantidad de electrones que se debe transferir al oxígeno en la reacción [27]. El valor medio ( $Q_0$ ) deducido a partir de una gran cantidad de reacciones analizadas fue de 115.137 kJ/electrón. Según esto y un análisis dimensional, el calor metabólico expresado en kJ/kg MSH se calcula por la ecuación:

$$(-\Delta H_m) = Q_0 \lambda_{\text{FF}} \frac{\alpha}{\text{MM}_{\text{XV}}} (1 - A_{\text{XV}}) 1 \times 10^3 \quad (10)$$

17. Nfor BK, Verhaert PD, van der Wielen LA, Hubbuch J, Ottens M. Rational and systematic protein purification process development: the next generation. Trends Biotechnol. 2009;27(12):673-9.

18. Lam M. *In silico* dynamic optimisation studies for batch/fed-batch mammalian cell suspension cultures producing biopharmaceuticals [dissertation]. London: Imperial College; 2009.

19. Ertola R, Yantorno O, Mignone C. Microbiología industrial. Washington: OEA; 1994.

20. Sinclair CG. Cinética de los procesos microbianos. In: Bu'lock JD, Kristiansen B, editors. Biotecnología básica. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.; 1991. p. 75-133.

21. Oakland J. Statistical process control. 5th ed. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd.; 2003.

22. Vassileva SV, Baxter D, Andersen LK, Vassileva CG. An overview of the composition and application of biomass ash. Part 2. Potential utilisation, technological and ecological advantages and challenges. Fuel. 2013;105:19-39.

23. Thompson M, editor. CHNS Elemental Analysers Report. AMC Technical Briefs [Internet]. 2008 Apr [cited 2013 Jan 6];(29):[2 p.]. Available from: [http://www.rsc.org/images/CHNS-elemental-analysers-technical-brief-29\\_tcm18-214833.pdf](http://www.rsc.org/images/CHNS-elemental-analysers-technical-brief-29_tcm18-214833.pdf)

24. Francis FJ, editor. Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology, 2nd ed. England: John Wiley and Sons; 1999.



Donde:

$(-\Delta H_M)$ : calor metabólico estequiométrico (kJ/kg MSH).

$\lambda_{FP}$ : grado de reducción del residuo de fréjol fresco (electrones/mol).

Los resultados que se computen en las ecuaciones (7) a la (10) dependerán de parámetros que determinados cuando se hayan calculado los elementos que permanecen incógnitos en la ecuación (1), como las fórmulas empíricas del substrato y la biomasa, así como los coeficientes estequiométricos.

## Resultados y discusión

### Cálculo de la composición elemental y deducción de las fórmulas empíricas

La determinación de las fórmulas empíricas de la biomasa del residuo de fréjol y del hongo *P. ostreatus*, tiene mucha relevancia para establecer la ecuación estequiométrica del crecimiento de la cepa seleccionada, así como el balance de la ecuación y el cálculo de sus coeficientes.

En la tabla 1 se agrupa el resultado de la composición elemental y del cálculo de las relaciones atómicas relativas de la biomasa del hongo, partiendo de las mediciones a las muestras recolectadas.

Los niveles de nitrógeno de *P. ostreatus* se sitúan entre los más altos para una biomasa [28], tal como habría de esperarse de una biomasa fúngica. Los niveles de carbono, sin embargo, se revelan bajos, si se comparan con una lista publicada de composiciones elementales de cuarenta materias agrícolas [29]. Ello pudiera explicar la relativamente elevada relación atómica calculada para el oxígeno, que es casi el doble de la reportada para muchos microorganismos. El contenido de cenizas se sitúa entre los niveles más bajos de once especies de hongos comestibles reportados por Sánchez y Mata [30], y se sitúa muy cercano al de *Pleurotus sajour-caju* (5.84 %).

En la tabla 2 se muestra el resultado de la composición elemental y el cálculo de las relaciones atómicas relativas del residuo fresco del fréjol, partiendo de las mediciones en la muestra recolectada.

La composición química del residuo fresco del fréjol en cuanto a carbono, se sitúa en niveles bajos si se compara con una lista de Parikh et al. [28]. Según estos autores, el contenido de carbono es únicamente superior a los valores reportados para la cáscara de arroz (40.6 %) y del tallo de algodón (41.3 %). El contenido de hidrógeno, en cambio, se sitúa en la media de los valores reportados [28], al igual que el contenido de oxígeno.

En la tabla 3 se agrupan los datos de las fórmulas empíricas de los dos componentes evaluados de forma elemental, que serán utilizados para la deducción de la estequiometría del proceso. Aunque en esta tabla solo se reportan dos cifras decimales, en todos los casos se emplearon las cifras significativas de las tablas 2 y 3.

Se observa una diferencia entre la composición elemental de *P. ostreatus* y la reportada para el *Aspergillus niger* ( $CH_{1.72}O_{0.55}N_{0.17}$ ) [31, 32]. La levadura *Kluyveromyces marxianus*, en cambio, tiene una composición reportada mucho más parecida a esta cepa ( $CH_{1.94}O_{0.76}N_{0.17}$ ) [33]. La composición elemental

Tabla 1. Composición elemental base seca de la biomasa de *Pleurotus ostreatus*

Elemento	Porcentaje de masa (base seca)	Masas atómicas (g/mol)	Proporciones atómicas relativas (mol/g)	Relaciones atómicas (mol/mol-C)
C	36.132	12.011	3.080	1.000
H	5.552	1.008	5.508	1.831
N	11.066	14.007	0.790	0.263
S	0.355	32.065	0.011	0.004
O	40.355	15.999	2.522	0.838
Cenizas	6.540	-	-	-
Total	100			

Tabla 2. Composición elemental molar del residuo de fréjol fresco

Elemento	Porcentaje de masa (base seca)	Masas atómicas (g/mol)	Proporciones atómicas relativas (mol/g)	Relaciones atómicas (mol/mol-C)
C	39.875	12.011	3.464	1.000
H	6.047	1.008	6.261	1.807
N	6.727	14.007	0.501	0.145
S	0.201	32.065	0.007	0.002
O	42.980	15.999	2.543	0.809
Cenizas	4.170	-	-	-
Total	100			

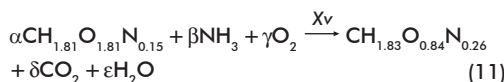
Tabla 3. Fórmulas empíricas y masa molecular estimadas para el residuo de fréjol y *Pleurotus ostreatus*

Producto	Composición (porcentaje de la masa, base seca)					Fórmula	Masa molecular (g/mol)
	C	H	N	O	S		
Residuo de fréjol	39.875	6.047	6.727	42.980	0.210	$CH_{1.81}O_{0.81}N_{0.15}$	28.804
<i>P. ostreatus</i>	36.132	5.552	11.066	40.356	0.355	$CH_{1.83}O_{0.84}N_{0.26}$	30.949

no varía mucho para las biomásas más disímiles; pero las condiciones de crecimiento, tanto nutricionales como ambientales, influyen en la existencia de pequeñas variaciones [28]. Esta composición sitúa a la cepa de *P. ostreatus* ceba-gliie-po-010606 con una masa molecular algo por encima de la media de los microorganismos, que se encuentra alrededor de 25 g/mol [19].

### Cálculo de los coeficientes estequiométricos

Con la información expuesta en la tabla 4, la ecuación estequiométrica y los balances quedan en esta forma:



$$C: \alpha = 1 + \delta \quad (12)$$

$$H: 1.81\alpha + 3\beta = 1.83 + 2\epsilon \quad (13)$$

$$O: 0.81\alpha + 2\gamma = 0.84 + 2\delta + \epsilon \quad (14)$$

$$N: 0.15\alpha + \beta = 0.26 \quad (15)$$

Con los datos de la tabla 3 se calculó el grado de reducción para el residuo sólido, y los que se agrupan

Tabla 4. Grado de reducción del residuo de fréjol y de la biomasa de *Pleurotus ostreatus*

Componente	Fórmula empírica	$\lambda$ (electrones/mol de C)
Residuo de fréjol	$CH_{1.81}O_{0.81}N_{0.15}$	3.7540
<i>P. ostreatus</i>	$CH_{1.83}O_{0.84}N_{0.26}$	3.3660

25. PerkinElmer. 2400 Series II CHNS/O Elemental Analysis. Organic Elemental Analysis. Waltham: PerkinElmer, Inc.; c2013 [cited 2013 Jan 6]; Available from: <http://www.perkinelmer.com/Catalog/Product/ID/N2410650>

26. McNeil B, Harvey LM. Practical fermentation technology. England: John Wiley & Sons, Ltd.; 2008

27. Castellanos J, García A, Herrera N, Rodríguez J, Pérez A. Estimación del calor de reacción en el transcurso de bioprocesos. Centro Azúcar. 2002;28(1):37-46.

28. Parikh J, Channiwala SA, Ghosal GK. A Correlation for calculating elemental composition from proximate analysis of biomass materials. Fuel. 2007;86(12-13): 1710-9.

29. Cuiping L, Chuangzhi W, Yanyongjie, Haitao H. Chemical elemental characteristics of biomass fuels in China. Biomass Bioenerg. 2004;27(2):119-30.

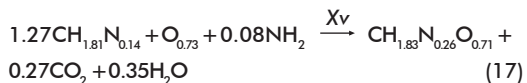
30. Sánchez JE, Mata G. Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: investigación y desarrollo en un entorno multicultural. Tapachula: El Colegio de la Frontera Sur; 2012.

en la tabla 4, se emplearon para calcular la biomasa del cuerpo fructífero del *P. ostreatus*. Con esta información puede plantearse el balance de electrones en la ecuación (6):

$$\lambda: 3.7\alpha - 4\gamma = 3.39 \quad (16)$$

La solución del sistema de ecuaciones (8-12) proporciona los coeficientes estequiométricos:  $\alpha = 1.2689$ ;  $\beta = 0.0790$ ;  $\gamma = 0.3494$ ;  $\delta = 0.2689$ ;  $\varepsilon = 0.3495$ .

Con esta información estimada se puede formular la ecuación estequiométrica. Por su simplicidad, solo se reportan dos cifras para los coeficientes estequiométricos:



### Parámetros estimados con la ecuación estequiométrica

#### Eficiencia biológica teórica

Teniendo en cuenta el contenido de cenizas y de agua del residuo del fréjol, así como para la biomasa de *P. ostreatus*, se estima que la eficiencia biológica que ha de esperarse de este sistema es de 867.49 g MSH/kg MSS. Este interesante resultado sirve como paradigma de la eficiencia que se debe lograr para unas condiciones de sustrato y cepa en específico. Varios autores han optimizado el medio de crecimiento de distintas especies de *P. ostreatus* [34]. La eficiencia máxima del proceso a 20 °C reportada es de 261.89 g MSH/kg MSS [35]. De modo que estos niveles podrían mejorarse aún más, pues apenas representan el 30.18 % del valor teórico estimado en este trabajo. La eficiencia biológica no solo depende del balance nutricional conseguido, además de otros aspectos ambientales como la capacidad de retención de agua del sustrato, la aireación y la humedad relativa en varias etapas del cultivo [3].

#### Coefficiente de respiración

Según la definición de este parámetro, este coeficiente alcanza un nivel de 0.77 mol CO<sub>2</sub>/mol O<sub>2</sub> que es relativamente bajo con respecto al reportado para hongos en crecimiento aeróbico. Los coeficientes de respiración bajos se han sido asociado con una mayor necesidad de energía para sintetizar el complejo enzimático necesario para generar azúcares más simples en el crecimiento de *A. niger* sobre residuos de cítricos [36]. Otra explicación pudiera estar en la retención de CO<sub>2</sub> que ocurre en las bolsas de crecimiento y que pueden hacer modificar ligeramente el metabolismo del crecimiento del hongo.

#### Consumo específico de aire

El consumo de aire calculado para condiciones de temperatura y presión normales se estimó que será de 1.36 m<sup>3</sup>/kg MSH. Este indicador demuestra que el crecimiento del hongo demanda una cantidad no muy significativa de aire para producir una tonelada del producto.

#### Calor metabólico

Según la ecuación (10) y la ecuación (17), se estima una liberación de calor equivalente a 16 576.47 kJ/kg MSH. En los procesos de fermentación sólida se libera una cantidad considerable de energía proveniente de la actividad metabólica [37]. Este parámetro rara vez se estima experimentalmente; más frecuentemente se deriva de relaciones estequiométricas [38], como las desarrolladas en este trabajo. González *et al.* reportó valores de calor metabólico para el crecimiento de *Aspergillus niger* muy semejantes a este, de 16 000 kJ/kg MSH. De donde se deduce que la ecuación estequiométrica ajustada genera valores que están en correspondencia con los reportados para hongos.

### Conclusiones

Se desarrolló una ecuación estequiométrica aproximada para describir el crecimiento aeróbico de la cepa ecuatoriana ceiba-gliie-po-010106 de *P. ostreatus* sobre residuos locales de la cosecha de fréjol. Para la formulación de la ecuación, se determinaron fórmulas empíricas para describir la composición elemental de los residuos de fréjol fresco secados al sol (CH<sub>1.81</sub>O<sub>0.81</sub>N<sub>0.15</sub>) y de la biomasa del hongo (CH<sub>1.83</sub>O<sub>0.84</sub>N<sub>0.26</sub>).

La estequiometría propuesta permite estimar parámetros claves para el desarrollo de procesos de la fermentación sólida, basados en modelos matemáticos con enfoque mecanístico, tales como la eficiencia biológica teórica (867.49 g MSH/kg MSS), el coeficiente medio de respiración (0.77 mol CO<sub>2</sub>/mol O<sub>2</sub>), el consumo específico de aire para el proceso de crecimiento (1.36 m<sup>3</sup>/kg MSH), y el calor metabólico (16 576.47 kJ/kg MSH).

### Agradecimientos

El trabajo de investigación que ha servido de base para esta publicación ha contado con los fondos de la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación del Ecuador (SENESCYT) otorgados en la convocatoria a beca de 2008.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran la ausencia de conflicto de intereses.

31. Vargas-Moreno JM, Callejón-Ferre AJ, Pérez-Alonso J, Velázquez-Martí B. A review of the mathematical models for predicting the heating value of biomass materials. *Renew Sust Energ Rev.* 2012; 16(5):3065-83.

32. Shen J, Zhu S, Liu X, Zhang H, Tan J. The prediction of elemental composition of biomass based on proximate analysis. *Eng Convers Manage.* 2010;51(5):983-7.

33. Yépez B, Conventi A, Maugeri F. Intrinsic activity of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 and carbon and nitrogen balances. *Food Technol Biotechnol.* 2006;44(4):479-83.

34. Andriano A, Morte MA, Honrubia M. Caracterización y cultivo de tres cepas de *Pleurotus eryngii* (Fries) Quélet sobre sustratos basados en residuos agroalimentarios. *An Biol.* 2011;(33):53-66.

35. Pineda J, Ramos L, Soto C. Cinética del crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en la etapa de producción del cuerpo fructífero. *ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar.* 2013;47(3):56-61.

36. Dimian AC, Sorin C. Chemical processing design: Computer-aided case study. Weinheim: Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2008.

37. Mitchell D, Krieger N, Berovic M, editors. Solid-state fermentation bioreactors: Fundamentals of design and operation. New York: Springer; 2006.

38. González DM, Echevarría HR, Hernández AP. Termodinámica para ingenieros químicos. La Habana: Editorial Félix Varela; 2006.

Recibido en noviembre de 2013.

Aprobado en enero de 2014.

# Stoichiometry equation to describe the growth of the *Pleurotus ostreatus* ceba-gliie-po-010606 strain

✉ Julio A Pineda-Insuasti<sup>1</sup>, Claudia P Soto-Arroyave<sup>2</sup>, Luis Beltrán<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Centro Ecuatoriano de Biotecnología del Ambiente, CEBA

<sup>2</sup> Pontificia Universidad Católica del Ecuador, PUCESI

Ibarra, Imbabura, Ecuador

<sup>3</sup> Departamento de Ingeniería Química, Universidad Ignacio Agramonte Loynaz

Camagüey, Cuba

✉ pinsuasti@yahoo.com

RESEARCH

## ABSTRACT

This work was aimed at developing a proximate stoichiometric equation to describe the growth of *Pleurotus ostreatus* mushroom strain ceba-gliie-po-010106 on picking beans (*Phaseolus vulgaris*) waste. Empirical formulas were established for the residue of fresh dried picking beans ( $\text{CH}_{1.81}\text{O}_{0.81}\text{N}_{0.15}$ ) and the biomass of the fungal strain ( $\text{CH}_{1.83}\text{O}_{0.84}\text{N}_{0.26}$ ). The elemental composition of these materials and the ashes were determined. The stoichiometric coefficients obtained further supported the estimation of parameters relevant for fungal growth characterization: theoretical biological efficiency (867.49 g of fungal dry matter (FDM)/kg of substrate dry matter), mean coefficient of breath (0.77  $\text{CO}_2/\text{mol O}_2$  consumption), specific air consumption (1.36  $\text{m}^3/\text{kg FDM}$ ) and metabolic heat (16 576.47 kJ/kg FDM).

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, solid fermentation, edible fungus, stoichiometry

*Biotecnología Aplicada* 2014;31:( ), -5&

## RESUMEN

### Ecuação estequiométrica para descrever o crescimento de *Pleurotus ostreatus* cepa ceba-gliie-po-010606.

Se desenvolveu uma equação estequiométrica aproximada que descreve o crescimento de la cepa ceba-gliie-010106 de *Pleurotus ostreatus* sobre resíduos de la cosecha del fréjol. El trabajo parte de establecer fórmulas empíricas para el residuo del fréjol fresco seco ( $\text{CH}_{1.81}\text{O}_{0.81}\text{N}_{0.15}$ ) y la biomasa de la cepa del hongo ( $\text{CH}_{1.83}\text{O}_{0.84}\text{N}_{0.26}$ ). Para ello se determinó la composición elemental de estas materias primas y su contenido de cenizas. Los coeficientes estequiométricos permiten estimar importantes parámetros del proceso de crecimiento; entre ellos: la eficiencia biológica teórica (867.49 g de materia seca del hongo (MSH)/kg de materia seca del sustrato), el coeficiente medio de respiración (0.77 mol  $\text{CO}_2/\text{mol O}_2$ ), el consumo específico de aire para el proceso de crecimiento (1.36  $\text{m}^3/\text{kg MSH}$ ), así como el calor metabólico (16 576.47 kJ/kg MSH).

Palabras claves: *Pleurotus ostreatus*, fermentación sólida, hongo comestible, estequiometría

## Introduction

The Earth produces an estimate of 146 billion tons of living matter, known as Biomass, yearly [1]. Those resources have a great potential to face the challenges of decreased availability of traditional non-conventional fuel sources and to prevent the risks to stable food supply in most countries.

One of the possible ways to take advantage of those wastes is to use them for edible fungi production [2]. A quarter of all the cereal wastes annually discarded could be used to produce fresh edible fungi, enough for a daily supply of 250 g to more than four million people [3]. There is a very significant increase in mushroom and truffles production worldwide. According to the analysis by Toland and Lucier [4] on the data provided by the United Nations Food and Agriculture Organization (FAO), the worldwide production of that food rich on proteins and nutrients have exponentially raised from 1961 to 2009, and it duplicates every 13.02 years. *Pleurotus ostreatus*, also known as oyster mushroom, is one of the most extensively cultivated either in warm or hot climates. However, mushroom cultivation techniques are mostly empirical and many of the methods remain unpublished or are protected by several patents [5-14]. Therefore, mechanistic approaches are demanded to develop more efficient

biological processes for that purpose [15]. Such procedures comprise the expression of process' mathematical models and implementing optimization procedures based on computational modeling [16]. In this sense, process design has become a mathematical programming task, being identified by several authors as a design in transit from *in vitro* to *in silico* [15, 17, 18].

One of the primary contributions to bioprocess modeling comes from identifying a stoichiometric model by establishing the mass relationships among the main raw materials [19]. These models result in, either, a simplified analysis expressed in terms of a global stoichiometric equation describing the process from a non-structured perspective, or more complex ones, with a system of several equations describing the balances of cellular metabolism and cell-culture medium interactions [19, 20].

Following this strategy and after an unsuccessful exhaustive review of the literature on this topic, we decided to develop a stoichiometric equation to describe the growth of the *P. ostreatus* basidiomycete on industrial wastes. Thus, a stoichiometric equation was obtained, describing the growth of the *P. ostreatus* Ecuadorian strain ceba-gliie-po-010106 on picking beans' harvest waste.

1. Álvarez-Castillo A, García-Hernández E, Domínguez-Domínguez MM, Granados-Baeza J, Aguirre-Cruz A, Morales-Cepeda A, et al. Aprovechamiento integral de los materiales lignocelulósicos. Rev Iberoam Polim. 2012;13(4):140-50.

2. Chukwurah NF, Eze SC, Chiejina NV, Onyeonagu CC, Ugwuoke KI, Ugwu FSO, et al. Performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in different local agricultural waste materials. Afr J Biotechnol. 2012;11(37):8979-85.

3. Mane VP, Patil SS, Syed AA, Baig MM. Bioconversion of low quality lignocellulosic agricultural waste into edible protein by *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. J Zhejiang Univ Sci B. 2007;8(10):745-51.

4. Pineda-Insuasti J, Ramos-Sanchez LB. Producción de proteínas comestibles con fuentes alternativas de materias primas. Axioma. 2013;1(10):5-9.

5. Álvaro H, inventor; Garrigues Fongs SL; assignee. Procedimiento para la obtención de una composición de un sustrato para el cultivo de hongos. Spain patent ES 2 166 337 A1. 2000 Jul 24.



## Materials and methods

### Strain

The *P. ostreatus* Ecuadorian strain ceba-gliipo-010106 was provided by the Ecuadorian Center of Environmental Biotechnology (CEBA). It was preserved in Agar-Malt extract at 4 °C until use.

### Raw materials

Two raw materials were used to develop the empirical formulas: picking beans (*Phaseolus vulgaris*) harvest wastes, the entire plant, and the *P. ostreatus* biomass. Picking beans waste samples were used as primary raw material, being collected from the production communities La Concepción, Salinas and Ambuquí at the Imbabura and Carchi provinces (Figure).

### Fresh picking beans waste sampling procedure

Both, the picking beans waste and the mushroom biomass were sampled following the procedures described by Oakland [21]. For three months, three 14-kg samples of picking beans waste were collected every month, sun-dried after harvesting, up to 9. The monthly processing procedure is described in the following. The three samples were separately grinded to a 9-mm size in a hammer hog and further mixed. The mix was extended on the floor in a 4 m<sup>2</sup> square area. The square was divided in four even quadrants, and a 1 kg portion of the mix was collected from each quadrant, and further grinded with a manual grinder down to a 1 mm in size. It was extended again in the floor in a 1 m<sup>2</sup> square area, divided in four even quadrants. Samples of 25 g were collected from each quadrant and mixed for a final sample of 100 g for each month. Samples were packed in polystyrene bags and stored at 4 °C (Figure).

### *P. ostreatus* biomass sampling procedure

The monthly-harvested picking beans waste was used for mushroom production at the CEBA production plant. The biomass produced by the three first sprouts of the fruiting body was stockpiled, during 51 days. Thereafter, mushroom growth was insignificant. The growth medium for fungal biomass production was used without nutrient supplementation. Three samples 1-kg each were harvested every month, for a final amount of 9 kg. The mushroom biomass obtained every month was dried until constant weight in an oven at 70 °C. It was further grinded in a manual grinder and extended on a 1 m<sup>2</sup> square table, which was subdivided in four even quadrants. Then, 25 g were collected from each quadrant and mixed to homogeneity. The three final samples of 100 g each were stored at 4 °C.

### Biomass culture procedure by solid fermentation

The picking beans waste samples were grinded down to 9 mm and the humidity was set to 70 %. Polypropylene bags were filled with 300 g of substrate and further pasteurized in a sterilizer at 103.46 kPa for 30 min. When the substrate reached room temperature, it was inoculated with 4 % dry base. Samples were incubated at a constant temperature of 20 °C for 51 days. The relative humidity was kept at an average of 85 % to avoid hyphal contamination, and after the

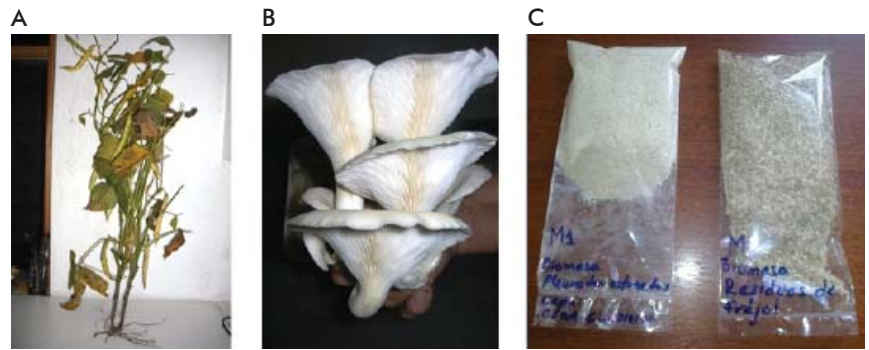


Figure. Raw materials. A) Picking beans (*Phaseolus vulgaris*) waste, whole plant. B) Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). C) Biomass samples ready for elemental analysis.

sprout of the first primordium, it was raised to 90 %. Fifteen days later, the mushroom was harvested, with an average size of 8 cm. The experiment was conducted with three bags as replicates.

### Elemental composition analytical technique

Samples were analyzed at the Center of Research Services and Chemical Analyses (CISAQ), of the National University of Loja, Ecuador. The elemental analysis was done with a PerkinElmer, model 2400, series II equipment [22]. This technique provides the total content of carbon, hydrogen, nitrogen and sulfur for a wide range of samples either organic or inorganic, solid or liquid, by using the Pregl-Dumas' classical method [22, 23]. This method consists of combusting a sample of known mass at high temperature (approximately 900 °C) in the presence of pure oxygen. The process releases carbon dioxide, water and nitrogen. The gasses are passed through special columns which absorb the carbon dioxide and water. A column carrying a thermal conductivity detector separates the nitrogen from any carbon dioxide or water residue, and the resulting nitrogen content is measured. The instrument must be previously calibrated by analyzing a pure standard of known nitrogen content. Then, the signal of an unknown nitrogen concentration sample is measured by the thermal conductivity detector, and converted into the equivalent nitrogen content value [24, 25].

### Calculation of raw materials empirical formulas

Data corresponding to carbon, hydrogen, nitrogen and sulfur were obtained from fresh picking beans waste and mushroom fruiting body biomass by the technique previously described. Oxygen content was calculated as the remaining elemental composition difference, in disregard of other elements present in significant amounts. Elements' concentrations in the solid phase were determined for the organic fraction once subtracted the ashes present in the sample. These data were used to calculate the relative atomic mass ratio for each element, by the ratio of the element's mass fraction over its atomic mass. The atomic mass ratio could be deduced from these relative atomic mass ratios, by dividing each element value over that of carbon, the final value being expressed per carbon atom-gram. The empirical formulas of the raw

6. Dunn-Coleman NS, Michaels TJ, inventors; Monterey Mushrooms, Inc., assignee. Composting process for the production of mushroom cultivation substrates. United States patent US 4848026 A. 1989 Jul 18.

7. Giovannozzi G, Luigi P, Baldo R, Porri A, D'Annibale A, Perani C, inventors; Consiglio Nazionale Delle Ricerche, Università Studi Della Toscana, assignee. Process for the production of cellulose paper pulps by biodelignification vegetative masses. United States patent US 6379495 B1. 2002 Abr 30.

8. Hisakazu I, Oaza S, Hanishina-Gun N, inventors; Hisakazu Ikeda, assignee. Obtaining edible material from fungus-digested medium. Europe patent EP 0357320 A2. 1989 Aug 22.

9. Ikeda H, inventor; Ikeda H, assignee. Edible material containing mushroom. United States patent US 5028441 A. 1991 Jul 2.

10. Kok T, inventor; Everbloom Mushroom (Pte) Ltd., assignee. Mushrooms cultivation. Europe patent EP 0248636 A3. 1987 Jun 2.

11. Ladisch M, Kohlman K, Westgate P, Weil J, Yang Y, inventors; Purdue Research Foundation Office of Technology Transfer, assignee. Processes for treating cellulosic material. United States patent US 5846787. 1998 Jul 11.

12. Mee H, inventor; The Kinoko Company, assignee. Method for growing wood mushroom. United States patent US 4127965. 1978 Dec 5.

13. Suryanarayan S, Mazundar K, inventors; Biocon India Limited, assignee. Solid state fermentation. United States patent US 6197573 B1. 2001 Mar 6.

14. Toth E, Toth L, Heltay I, inventors; Licencia Talalmanyokat Ertekisito Vallalat, assignee. Mushroom growing process. United States patent US 3996038. 1976 Dec 7.

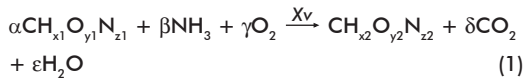
15. Kiparissides A, Koutinas M, Kontoravdi C, Mantalaris A, Pistikopoulos EN. Closing the loop in biological systems modeling - From the *in silico* to the *in vitro*. *Automática*. 2011;47(6):1147-55.

16. Rodríguez-Fernández M, Balsa-Canto E, Egea JA, Banga JR. Identifiability and robust parameter estimation in food process modeling: Application to a drying model. *J Food Eng*. 2007;83(3):374-83.

materials used on this work did not include sulfur, due to its very low proportions and, therefore, its irrelevance for stoichiometric balances.

### Proposal of a simplified stoichiometric model

It started considering the aerobic cell growth as a simplified mechanism, expressed through a simplified stoichiometric equation. It describes the transformation of fresh picking beans substrate, together with a nitrogen supplement in form of ammonia and oxygen as reactants, into products due to the presence of the mushroom as biocatalyst. The resulting reaction products considered were the *P. ostreatus* biomass, CO<sub>2</sub> and water:



The stoichiometric coefficients were determined from a balance per element from equation (1) [19]:

$$\text{C: } \alpha = 1 + \delta \quad (2)$$

$$\text{H: } x_1 \alpha + 3\beta = x_2 + 2\varepsilon \quad (3)$$

$$\text{O: } y_1 \alpha + 2\gamma = y_2 + 2\delta + \varepsilon \quad (4)$$

$$\text{N: } z_1 \alpha + \beta = z_2 \quad (5)$$

Where::

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  and  $\varepsilon$ : stoichiometric coefficients expressed as moles of the respective compound per mol of fungal dry matter (mol/mol FDM).

$x_i$ : hydrogen content on the molecule per carbon atom-gram.

$y_i$ : oxygen content on the molecule per carbon atom-gram.

$z_i$ : nitrogen content on the molecule per carbon atom-gram.

There were only five equations available for 5 variables; hence, another equation was required. A recommended alternative for this scenario is the electron balance [19, 26]. It implies to calculate the reduction degree of the species involved ( $\lambda$ ). This factor is defined as the number of moles of electrons available per carbon atom-gram to be transferred to O<sub>2</sub>, during the full combustion of a given compound to render CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub>. For carbon, 4 electrons are free electrons to be transferred, with 1 for hydrogen, -2 for oxygen and -3 for nitrogen [19]. Positive and negative values stand for electrons either to be donated or accepted, respectively. Accordingly, the reduction degree for CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O and NH<sub>3</sub> is null. An electron balance from equation (1) leads to the following expression:

$$\lambda: \lambda_{FF} \alpha - 4\gamma = \lambda_{XV} \quad (6)$$

Where:

$\lambda_{FF}$  and  $\lambda_{XV}$  are the reduction degrees of fresh picking beans waste and mushroom biomass (electrons/mol).

In this way, equations (2) through (6) form a system of linear algebraic equations with a single solution for each variable.

### Parameters derived from the stoichiometric equation

Relevant factors related to mushroom biomass production can be derived from the stoichiometric equation

(1), such as: theoretical biological efficiency (BE), mean coefficient of breath (CB; mol CO<sub>2</sub>/mol O<sub>2</sub>), specific volumetric air consumption ( $q_{Air}$ ) and the metabolic heat ( $-\Delta H_M$ ):

$$\text{BE} = \frac{\text{MM}_{XV}}{\alpha \text{MM}_{FF}} \frac{(1 - A_{FF})}{(1 - A_{XV})} 1 \times 10^3 \quad (7)$$

Where:

BE: biological efficiency (g FDM/kg SDM)

SDM: substrate dry matter

MM<sub>XV</sub>: molecular mass of the ash-free biomass (g/mol)

A<sub>FF</sub>: ash of fresh picking beans waste (g/mol)

MM<sub>FF</sub>: molecular mass of the ash-free fresh picking beans waste (g/mol)

A<sub>XV</sub>: biomass ashes (g/mol);

$$q_{Air} = \frac{\text{MM}_{O_2}}{\text{MM}_{XV}} \frac{\gamma}{Y_{O_2} \rho_{Air}} \quad (8)$$

Where:

$q_{Air}$ : volumetric specific air consumption (m<sup>3</sup>/kg MSH)

MM<sub>O<sub>2</sub></sub>: oxygen molecular mass (g/mol)

$y_{O_2}$ : air oxygen fraction (mol O<sub>2</sub>/mol total);

$\rho_{Air}$ : air density (kg/m<sup>3</sup>)

$$\text{RC} = \frac{\delta}{\gamma} \quad (9)$$

Where:

RC is the respiration coefficient

According to Ertola *et al.* [19], the heat released during the metabolic process is proportional to the number of electrons to be transferred to oxygen during the reaction [27]. The mean value ( $Q_0$ ) deduced from a large number of reactions was 115.137 kJ/electron. Following these results and also based on a dimensional analysis, the metabolic heat was calculated and expressed in kJ/kg FDM by the equation:

$$(-\Delta H_M) = Q_0 \lambda_{FF} \frac{\alpha}{\text{MM}_{XV}} (1 - A_{XV}) 1 \times 10^3 \quad (10)$$

Where:

$(-\Delta H_M)$ : stoichiometric metabolic heat (kJ/kg FDM).

$\lambda_{FF}$ : reduction degree of the fresh picking beans waste (electrons/mol).

Results computed for parameters of equations (7) through (10) depend on the results obtained once calculated the remaining variables on equation (1). They include those of the empirical formulas for the substrate and the biomass, and also the stoichiometric coefficients.

## Results and discussion

Determining the empirical formulas for biomass of the fresh picking beans waste and the *P. ostreatus* mushroom is highly relevant to establish the stoichiometric equation describing the growth of the selected *P. ostreatus* strain, and also for the stoichiometric equation balance and the calculation of its coefficients. Table 1 summarizes the elemental composition of collected samples measurements and the estimated values for relative atomic mass ratios of the fungal biomass.

17. Nfor BK, Verhaert PD, van der Wielen LA, Hubbuch J, Ottens M. Rational and systematic protein purification process development: the next generation. Trends Biotechnol. 2009;27(12):673-9.

18. Lam M. *In silico* dynamic optimisation studies for batch/fed-batch mammalian cell suspension cultures producing biopharmaceuticals [dissertation]. London: Imperial College; 2009.

19. Ertola R, Yantorno O, Mignone C. Microbiología industrial. Washington: OEA; 1994.

20. Sinclair CG. Cinética de los procesos microbianos. In: Bu'lock JD, Kristiansen B, editors. Biotecnología básica. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.; 1991. p. 75-133.

21. Oakland J. Statistical process control. 5th ed. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd.; 2003.

22. Vassilev SV, Baxter D, Andersen LK, Vassileva CG. An overview of the composition and application of biomass ash. Part 2. Potential utilisation, technological and ecological advantages and challenges. Fuel. 2013;105:19-39.

23. Thompson M, editor. CHNS Elemental Analysers Report. AMC Technical Briefs [Internet]. 2008 Apr [cited 2013 Jan 6];(29):[2 p.]. Available from: [http://www.rsc.org/images/CHNS-elemental-analysers-technical-brief-29\\_tcm18-214833.pdf](http://www.rsc.org/images/CHNS-elemental-analysers-technical-brief-29_tcm18-214833.pdf)

24. Francis FJ, editor. Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology. 2nd ed. England: John Wiley and Sons; 1999.

25. PerkinElmer. 2400 Series II CHNS/O Elemental Analysis. Organic Elemental Analysis. Waltham: PerkinElmer, Inc.; c2013 [cited 2013 Jan 6]; Available from: <http://www.perkinelmer.com/Catalog/Product/ID/N2410650>

26. McNeil B, Harvey LM. Practical fermentation technology. England: John Wiley & Sons, Ltd.; 2008.

27. Castellanos J, García A, Herrera N, Rodríguez J, Pérez A. Estimación del calor de reacción en el transcurso de bioprocesos. Centro Azúcar. 2002;28(1):37-46.



The *P. ostreatus* nitrogen levels were among the highest for a biomass tested [28], as expected from a fungal biomass. Instead, carbon levels were low, if we compare them to a list of elemental composition reported for forty agriculture matters [29]. This could explain the relatively high atomic mass ratio calculated for the oxygen, almost twice the value reported for many microorganisms. The ashes content was comparable to the lowest values reported by Sánchez and Mata [30] for eleven edible fungi species, and was closer to that of *Pleurotus sajour-caju* (5.84 %).

Results for elemental composition of collected samples measurements and the calculation of relative atomic mass ratios of the fresh picking beans waste are shown in table 2.

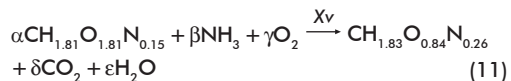
The chemical carbon composition of the fresh picking beans waste was in the same order of the values reported by Parikh et al. [28] for biomass grown on waste from different sources. According to that group, the carbon content was only higher than those reported for rice hull (40.6 %) and cotton stems (41.3 %). On the contrary, hydrogen and oxygen contents were average compared to equivalent results [28].

Data obtained from empirical formulas for the two highest components, subject of elemental analysis, are shown in table 3. They were used to deduce the process' stoichiometry. Significant values from tables 2 and 3 were further applied for calculation, in spite of showing just two decimal digit values in the case of the formulas.

There was a marked difference in the elemental composition of *P. ostreatus*, compared to that reported for *Aspergillus niger* (CH<sub>1.72</sub>O<sub>0.55</sub>N<sub>0.17</sub>) [31, 32], which was quite more similar to that of the *Kluyveromyces marxianus* yeast (CH<sub>1.94</sub>O<sub>0.76</sub>N<sub>0.17</sub>) [33]. The elemental composition does not vary for the most dissimilar biomasses; but growth conditions, either nutritional or environmental, are responsible for small variations [28]. This composition places the *P. ostreatus* strain ceba-gliie-po-010606 with a molecular mass slightly above the mean value established for microorganisms, approximately of 25 g/mol [19].

**Calculation of the stoichiometric coefficients**

The stoichiometric equation and the balances were established from data shown in table 4 as follows:



$$\text{C: } \alpha = 1 + \delta \quad (12)$$

$$\text{H: } 1.81\alpha + 3\beta = 1.83 + 2\epsilon \quad (13)$$

$$\text{O: } 0.81\alpha + 2\gamma = 0.84 + 2\delta + \epsilon \quad (14)$$

$$\text{N: } 0.15\alpha + \beta = 0.26 \quad (15)$$

The reduction degree for the solid waste was calculated (data shown in table 3). Data summarized in table 4 was used to calculate the biomass of the fruiting body of *P. ostreatus*. With this information, the electron balance of equation (6) was set:

$$\lambda: 3.7\alpha - 4\gamma = 3.39 \quad (16)$$

The solution for the system equations (8) through (12) provided the stoichiometric coefficients:  $\alpha = 1.2689$ ;

**Table 1. Elemental composition dry base for the *Pleurotus ostreatus* biomass**

Element	Mass percentage (dry base)	Atomic mass (g/mol)	Relative atomic mass ratio (mol/g)	Atomic mass ratio (mol/mol-C)
C	36.132	12.011	3.080	1.000
H	5.552	1.008	5.508	1.831
N	11.066	14.007	0.790	0.263
S	0.355	32.065	0.011	0.004
O	40.355	15.999	2.522	0.838
Ashes	6.540	-	-	-
Total	100			

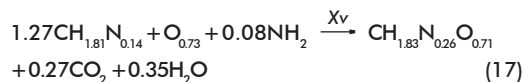
**Table 2. Molar elemental composition of the fresh picking beans (*Phaseolus vulgaris*) waste**

Element	Mass percentage (dry base)	Atomic mass (g/mol)	Relative atomic mass ratio (mol/g)	Atomic mass ratio (mol/mol-C)
C	39.875	12.011	3.464	1.000
H	6.047	1.008	6.261	1.807
N	6.727	14.007	0.501	0.145
S	0.201	32.065	0.007	0.002
O	42.980	15.999	2.543	0.809
Ashes	4.170	-	-	-
Total	100			

**Table 3. Empirical formula and molecular masses estimated for the picking beans (*Phaseolus vulgaris*) waste and oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) biomass**

Product	Composition (mass percentage, dry base)					Formula	Molecular mass (g/mol)
	C	H	N	O	S		
<i>P. vulgaris</i> waste	39.875	6.047	6.727	42.980	0.210	CH <sub>1.81</sub> O <sub>0.81</sub> N <sub>0.15</sub>	28.804
<i>P. ostreatus</i>	36.132	5.552	11.066	40.356	0.355	CH <sub>1.83</sub> O <sub>0.84</sub> N <sub>0.26</sub>	30.949

$\beta = 0.0790$ ;  $\gamma = 0.3494$ ;  $\delta = 0.2689$ ;  $\epsilon = 0.3495$ . They were used to formulate the stoichiometric equation. Due to its simplicity, only two digits were reported for the stoichiometric coefficients (17):



**Parameters estimated with the stoichiometric equation**

**Theoretical biological efficiency**

Taking into account the amount of ashes and water of picking beans waste and *P. ostreatus* biomass, it was estimated that the expected biological efficiency from this system is 867.49 g FDM/kg SDM. This result arises as a model for the efficiency that must be achieved for certain substrates and strain specific conditions. Several authors have optimized the growth medium for different *P. ostreatus* strains [34]. Nevertheless, the maximal efficiency reported for the process at 20 °C was 261.89 g FDM/kg SDM [35]. Hence, these levels could have been further improved, since they represent just 30.18 % of the estimated theoretical

28. Parikh J, Channiwala SA, Ghosal GK. A Correlation for calculating elemental composition from proximate analysis of biomass materials. *Fuel*. 2007;86(12-13): 1710-9.

29. Cuiping L, Chuangzhi W, Yanyongjie, Haitao H. Chemical elemental characteristics of biomass fuels in China. *Biomass Bioenerg*. 2004;27(2):119-30.

30. Sánchez JE, Mata G. Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: investigación y desarrollo en un entorno multicultural. *Tapachula: El Colegio de la Frontera Sur*; 2012.

31. Vargas-Moreno JM, Callejón-Ferre AJ, Pérez-Alonso J, Velázquez-Martí B. A review of the mathematical models for predicting the heating value of biomass materials. *Renew Sust Energ Rev*. 2012; 16(5):3065-83.

32. Shen J, Zhu S, Liu X, Zhang H, Tan J. The prediction of elemental composition of biomass based on proximate analysis. *Energy Convers Manage*. 2010;51(5):983-7.

33. Yépez B, Converti A, Maugeri F. Intrinsic activity of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 and carbon and nitrogen balances. *Food Technol Biotechnol*. 2006;44(4):479-83.

**Table 4. Reduction degree (l) of picking beans (*Phaseolus vulgaris*) waste and the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) biomass**

Component	Empirical formula	$\lambda$ (electrons/mol C)
<i>Phaseolus vulgaris</i> waste	CH <sub>1.81</sub> O <sub>0.81</sub> N <sub>0.15</sub>	3.7540
<i>P. ostreatus</i>	CH <sub>1.83</sub> O <sub>0.84</sub> N <sub>0.26</sub>	3.3660

value according to our results. Noteworthy, the biological efficiency depends not only on the attained nutritional balance, but also on other environmental aspects such as: the water retention capacity of the substrate, aeration and the relative humidity at different culture phases, among others [3].

#### Mean coefficient of breath

As defined for this parameter, the coefficient reached 0.77 mol CO<sub>2</sub>/mol O<sub>2</sub>, a relatively low value compared to that reported for the fungal aerobic growth. The breath coefficients commonly derive from increased demands for energy to synthesize the enzyme complexes required to produce simple sugar molecules during growth, as reported for *A. niger* growth on citric wastes [36]. Another plausible explanation comes from the CO<sub>2</sub> retention that occurs in growth bags, which could slightly modify the fungal growth metabolism.

#### Specific air consumption

The air consumption was calculated for normal temperature and pressure conditions, being estimated as 1.36 m<sup>3</sup>/kg FDM. This indicator demonstrates that the fungal growth demands a non-significant amount of air to produce a ton of products.

#### Metabolic heat

According to equations (10) and (17), metabolic heat was estimated as the heat release equivalent to 16 576.47 kJ/kg FDM. A huge amount of energy is normally released in the form of heat during solid fermentation processes due to metabolic activity [37]. This parameter is scarcely estimated by experimentation, being most frequently calculated from stoichiometric balances [38] similar to those developed in our

work. For example, González *et al.* reported metabolic heat values for the growth of *A. niger* of 16 000 kJ/kg FDM, very similar to ours. This implies that the adjusted stoichiometric equation generates values which are in agreement with those previously reported for fungal growth.

#### Conclusions

A proximate stoichiometric equation was developed to describe the aerobic growth of the Ecuadorian *P. ostreatus* strain ceba-gliie-po-010106 on local picking beans (*Phaseolus vulgaris*) harvest wastes. Empirical formulas were established to describe the elemental composition of fresh sun-dried picking beans waste (CH<sub>1.81</sub>O<sub>0.81</sub>N<sub>0.15</sub>) and that of the mushroom biomass (CH<sub>1.83</sub>O<sub>0.84</sub>N<sub>0.26</sub>).

In this paper, the results of the proposed stoichiometry supports the estimation of key parameters for the development of fungal solid fermentation processes based on mathematical models with a mechanistic approach. They included the theoretical biological efficiency (867.49 g FDM/kg SDM), the mean respiration coefficient (0.77 mol CO<sub>2</sub>/mol O<sub>2</sub>), the specific air consumption to grow (1.36 m<sup>3</sup>/kg FDM) and the metabolic heat (16 576.47 kJ/kg FDM).

#### Acknowledgements

The research resulting on this publication was funded by the National Secretary of Higher Education, Science, Technology and Innovation of Ecuador (SENESCYT), through a Scholarship granted in 2008.

#### Declaration of conflict of interests

The authors declare the absence of conflicts of interests.

34. Andriano A, Morte MA, Honrubia M. Caracterización y cultivo de tres cepas de *Pleurotus eryngii* (Fries) Quélet sobre sustratos basados en residuos agroalimentarios. *An Biol.* 2011;(33):53-66.

35. Pineda J, Ramos L, Soto C. Cinética del crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en la etapa de producción del cuerpo fructífero. *ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar.* 2013;47(3):56-61.

36. Dimian AC, Sorin C. Chemical processing design: Computer-aided case study. Weinheim: Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2008.

37. Mitchell D, Krieger N, Berovic M, editors. Solid-state fermentation bioreactors: Fundamentals of design and operation. New York: Springer; 2006.

38. González DM, Echevarría HR, Hernández AP. Termodinámica para ingenieros químicos. La Habana: Editorial Félix Varela; 2006.

Received in November, 2013.

Accepted in January, 2014.