



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

---

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

Cuantificación de la biomasa y  
de los polisacáridos producidos  
por *Pleurotus ostreatus* en cultivo líquido

Licenciatura en Nutrición

P R E S E N T A

P. L. Nutrición. Yazmín González Alvarado

Bajo la Dirección de:  
M. en C. Martha Gayosso Canales

Pachuca, Hgo., Mayo, 9, 2010.



## Índice

I. Resumen.....	i
Abstract.....	ii
<b>II. Marco Teórico.....</b>	<b>8</b>
2.1. Reino fungi.....	8
2.2 Basidiomicetos.....	11
2.3 Hongos comestibles.....	12
2.4 Fermentación en fase sólida (FFS).....	15
2.5	
<b>Fermentación en líquido (FL).....</b>	<b>17</b>
2.6 Polisacáridos producidos por hongos .....	19
2.7 <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	21
2.7.1 Cultivo de <i>Pleurotus</i> .....	23
<b>III. Problema de investigación .....</b>	<b>25</b>
<b>IV. Justificación.....</b>	<b>26</b>
<b>V. Hipótesis.....</b>	<b>28</b>
<b>VI. Objetivo General.....</b>	<b>28</b>
<b>VII. Objetivos específicos.....</b>	<b>28</b>
<b>VIII. Diseño Metodológico.....</b>	<b>29</b>
8.1 Organismo.....	29
8.2 Condiciones de cultivo.....	29
8.3 Cuantificación de biomasa.....	30
8.4 Extracción de los polisacáridos.....	30
8.4.1 Cuantificación de los polisacáridos.....	31
8.5 Análisis de los datos.....	31
<b>IX. Resultados.....</b>	<b>32</b>
9.1 Cuantificación de la biomasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> en diferentes medios de cultivo líquido.....	32
9.2 Concentración de polisacáridos intracelulares.....	34
9.3 Concentración de polisacáridos extracelulares.....	35

X. <b>Discusión</b> .....	38
10.1 <b>Cuantificación de la biomasa de <i>P. ostreatus</i> en diferentes medios de cultivo líquido</b> .....	38
10.2 <b>Determinación de la concentración de PSI producidos por <i>P. ostreatus</i> en diferentes medios de cultivo líquido</b> .....	40
10.3 <b>Determinación de la concentración de PSE producidos por <i>P. ostreatus</i> en diferentes medios de cultivo líquido</b> .....	41
XI. <b>Conclusiones</b> .....	43
XII. <b>Referencias bibliográficas</b> .....	44
XIII <b>Anexo</b> .....	55

## Índice de Figuras

Figura 1. Los filos del reino fungi.....	8
2. Las basidiosporas.....	11
3. Taxonomía de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	22
4. Producción de biomasa por <i>P. ostreatus</i> , medios de cultivos: PC ■; PT ◆; CC ▲; CN □; T ◇.....	32
5. Producción de polisacáridos intracelulares por <i>P. ostreatus</i> , medios de cultivo: PC ■; PT ◆; CC ▲; CN □; T ◇.....	35
6. Producción de polisacáridos extracelulares por <i>P. ostreatus</i> , medios de cultivo: PC ■; PT ◆; CC ▲; CN □; T ◇.....	37
7. Curva de calibración para cuantificar polisacáridos, a 490 nm.....	47
8. Curva de calibración para cuantificar polisacáridos, a 480 nm.....	47

## Índice de cuadros

1. Valor nutricional de las setas (peso redondeado 100 g en peso fresco).....	13
2. Matriz del diseño experimental.....	29
3. Análisis de varianza de la producción de biomasa .....	33
4. Análisis de varianza de la producción de PSI.....	34
5. Análisis de varianza de la producción de PSE.....	36

### **Lista de abreviaturas**

CC	Cáscara de cacahuete
CN	Cáscara de naranja
EB	Eficiencia biológica
FFS	Fermentación en fase sólida
FL	Fermentación líquida
g	Gramos
Kcal	Kilocalorías
L	Litro
Lb	Libra
mL	Mililitro
PC	Pulpa de café
PDA	Agar papa dextrosa
Pulg <sup>2</sup>	Pulgada cuadrada
PSE	Polisacáridos extracelulares
PSI	Polisacáridos intracelulares
PT	Paja de trigo
T	Testigo
μL	Microlitro

## Resumen

*Pleurotus ostreatus* es un hongo comestible, ampliamente conocido, que produce polisacáridos que tienen propiedades medicinales importantes. La información respecto a como la producción de tales polisacáridos es afectada por la formulación del medio de cultivo en el que crece el hongo es escasa, el objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes medios de cultivo sobre el crecimiento y la producción de polisacáridos intra y extracelulares (PSI y PSE) de *P. ostreatus* en cultivo líquido. Un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos fue utilizado para realizar el estudio; los tratamientos fueron los diferentes medios de cultivo formulados a base de glucosa y extracto de levadura adicionados con extractos acuosos de paja de trigo (PT), pulpa de café (PC), cáscara de cacahuate (CC), cáscara de naranja (CN) y como control (T), un medio sin adicionar extracto; para obtener los extractos se uso una concentración de 2.5 g/L de cada suplemento. Las determinaciones se hicieron a 5, 10 y 15 días de cultivo. La biomasa se cuantificó en peso seco del micelio y la concentración de polisacáridos fue medida por espectrofotometría. La producción máxima de biomasa fue en el medio PC con  $4.54 \pm 0.008$  g/L en el día 10 de cultivo. La máxima producción de PSI ( $21.76 \pm 0.65$  mg/g de biomasa) se obtuvo en el medio T, a los 10 días de cultivo; la concentración máxima de PSE se registró en el medio CC a los 15 días de cultivo y fue de  $442.31 \pm 13.40$  mg/L.

**Palabras clave:** *Pleurotus ostreatus*, polisacáridos, cultivo líquido.

## Abstract

*Pleurotus ostreatus* is an edible mushroom widely known, that produces polysaccharides that have important medicinal properties. The information regarding as the production of such polysaccharides it is affected by the formulation of the culture media in which the mushroom grows it is scarce, the objective of this work was to evaluate different culture media on the growth and the production of intracellular and extracellular polysaccharides (PSI and PSE) of *P. ostreatus* in liquid culture at 5, 10 and 15 days of culture. An experimental design totally at random with five treatments it was used to carry out the study; the treatments were the different culture media formulated with glucose and yeast extract added with aqueous extracts of wheat straw (PT), coffee pulp (PC), peanut shell (CC), orange peel (CN) and as control (T), a medium without supplement; to obtain the extracts was used a concentration of 2.5 g/L of each supplement. The biomass was quantified in dry weight of the micelium and the concentration of polysaccharides was measured by spectrometry. The biomass was greater in the medium PC with a production of  $4.54 \pm 0.008$ g/L at 10 days of culture. The highest production of PSI ( $21.76 \pm 0.65$  g/L of biomass) was obtained in the medium T, at 10 days of culture; the highest concentration in PSE was registered in the medium CC at 15 days of culture and it was of  $442.31 \pm 13.40$  mg/L.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, polysaccharides, liquid culture.

## II. Marco Teórico

### 2.1. Reino fungi

En este reino se encuentran las levaduras, los mohos y las setas; en un principio los hongos se clasificaron dentro del reino vegetal, en la actualidad los biólogos reconocen que estos organismos difieren en muchos sentidos de plantas, animales y protistas, por lo que se asignan a un reino aparte (Fig. 1) y pueden ser definidos como macrófagos con un cuerpo fructífero distintivo, el cual puede ser hipogeo y epigeo (Solomon *et al.*, 1999; Lindequist *et al.*, 2005). Los hongos son eucariotes, sus células contienen mitocondrias y otros organelos rodeados por una membrana; son heterótrofos, no realizan fotosíntesis, obtienen nutrimentos por absorción al secretar enzimas hidrolíticas en los alimentos o materia orgánica muerta a través de su pared celular y membrana plasmática (Sánchez y Royse, 2001), son muy eficaces para convertir nutrimentos en nuevo material celular. Si se dispone de nutrimentos en exceso, los almacenan en el micelio, por lo común en la forma de gotitas de lípido o glucógeno.



**Figura 1. Los filos del reino fungi**

Estos organismos se desarrollan mejor en hábitats húmedos y pueden obtener agua del ambiente; cuando el ambiente se torna demasiado seco, ellos sobreviven entrando en una fase latente o produciendo esporas resistentes a la desecación. El pH óptimo para la mayoría de los hongos es alrededor de 5.6, algunas especies toleran valores de pH de 2 a 9. Muchos son menos sensibles que las bacterias a presiones osmóticas elevadas; pudiendo desarrollarse en soluciones salinas concentradas, o en soluciones azucaradas como jalea. Los hongos también prosperan en un amplio intervalo de temperatura; ni siquiera los alimentos refrigerados son inmunes a una invasión fúngica (Solomon *et al.*, 1999).

Su función en la naturaleza también es positiva, ecológicamente ayudan a degradar sustancias tóxicas, junto con las bacterias forman el grupo de los degradadores (Herrera y Ulloa, 1990). Además se utilizan como alimento humano (hongos comestibles), las levaduras se emplean en la elaboración de ciertos quesos, pan y de bebidas alcohólicas. Son útiles en la fabricación de productos químicos, industriales y antibióticos pero otras veces sus funciones son tan negativas al grado de actuar

como patógenos o parásitos y ocasionar gran parte de la pérdida de cosechas (McCarty, 1978).

Los hongos se reproducen por medio de esporas microscópicas, las cuales son estructuras reproductivas inmóviles que pueden ser esparcidas por viento, agua o animales. En algunos hongos, las hifas forman grandes y complejas estructuras reproductivas, llamadas cuerpos fructíferos o carpóforos, en las que se producen las esporas. Cuando se forman estas estructuras complejas no vemos la mayor parte del organismo, ya que una red casi invisible de hifas se desarrolla bajo la superficie del material en descomposición o del suelo en que se desarrolla (Alexopolus *et al.*, 1996).

Las esporas fúngicas pueden producirse de manera sexual o asexual a diferencia de la mayor parte de las células animales y vegetales. En la reproducción sexual, las hifas de dos tipos conjugantes genéticamente compatibles se reúnen y sus citoplasmas y núcleos se fusionan, formando una célula diploide conocida como cigoto. En dos grupos de hongos (ascomicetos y basidiomicetos) las hifas se fusionan pero los dos núcleos distintos no lo hacen de inmediato, sino que permanecen separados dentro del citoplasma, estos núcleos tienen características genéticas distintas sexualmente; dichas células ahora con dos núcleos son dicarióticas (micelio secundario). Las hifas que contienen sólo un núcleo haploide por célula se denominan monocarióticas ó micelio primario (Sánchez y Royse, 2001).

En la mayor parte de los hongos la etapa vegetativa (no reproductiva) se caracteriza por la presencia de hifas que forman una maraña o un agregado parecido a tejido al que se denomina micelio (Herrera y Ulloa, 1990). El aspecto algodonoso que a veces se observa en el pan que está en pudrición es el micelio de un hongo (moho), que puede ser blanco, amarillo brillante o naranja y a menudo se dispersa hacia enfrente, creciendo en forma de abanico. Lo que no se ve es el extenso micelio que crece bajo la superficie del pan ya que se infiltra en el alimento o el hábitat (Sánchez y Royse,

2001). Algunas hifas son cenocíticas, esto es, no se dividen en células individuales, sino que tienen el aspecto de una célula gigante multinucleada alargada; otras están divididas por paredes transversales, llamadas septos (o tabiques), estos pueden contener un núcleo (monocariótica) o más núcleos (policariótica). Los septos de muchos hongos están perforados por un poro que puede ser lo suficientemente grande para permitir el paso de los organelos de una célula a otra (Herrera y Ulloa, 1990).

El citoplasma fluye dentro de las hifas, de modo que constituye un sistema de transporte interno. Las células fúngicas, al igual que las células de bacterias, plantas y determinados protistas, están delimitadas por paredes celulares cuando menos en alguna fase de su ciclo vital, esta pared celular esta compuesta por quitina, un polímero cuyo monómero es la N-acetilglucosamina; que también es un componente de los exoesqueletos de insectos y de otros artrópodos, que es mucho más resistente a la degradación por microorganismos que la celulosa y la lignina, que constituyen las paredes celulares de las plantas (Alexopolus *et al.*, 1996).

## 2.2. Basidiomicetos

Los basidiomicetos (filo Basidiomycota) incluyen champiñones y demás setas, hongos corticiáceos o “de repisa” y bejines o cuescos del lobo, también algunos parásitos vegetales importantes, como el herrumbre del trigo y el tizón de maíz o huitlacoche, también pertenecen a este filo. Los basidiomicetos u hongos de maza deben su nombre al hecho de que forman basidios microscópicos (Fig. 2), estructuras en forma de garrote, cada basidio es una célula hifal grande en cuya punta se desarrollan cuatro basidiosporas (Alexopolus *et al.*, 1996).



## **Figura 2. Las basidiosporas**

Cada hongo individual produce millones de basidiosporas, y cada basidiospora puede producir un nuevo micelio primario. Cuando en el curso del crecimiento una hifa de un micelio primario encuentra otra hifa monocariótica con diferente tipo conjugante, las dos hifas se fusionan produciendo un micelio secundario, que crece en forma extensa, y cuando las condiciones ambientales son favorables, forman a lo largo del micelio masas compactas llamadas botones o yemas. Cada botón se convierte en un cuerpo fructífero, que llamamos seta u “hongo” o de manera más formal carpóforo (Kües y Liu, 2000).

Una seta consta de un pie o pedúnculo y un sombrerillo, muchas placas delgadas perpendiculares llamadas laminillas se extienden en dirección radial desde el pie hasta el borde del sombrerillo en la superficie inferior de éste. En estas laminillas se fusionan los núcleos haploides, de las células dicarióticas del interior de los basidios jóvenes para formar cigotos diploides. Estas son las únicas células diploides que se producen en el ciclo vital de un basidiomiceto, después ocurre la meiosis, que forma cuatro núcleos haploides los cuales se desplazan al borde externo del basidio. Éste desarrolla extensiones digitiformes, dentro de las que se desplazan los núcleos y parte del citoplasma; cada una de estas extensiones se convierte en una basidiospora que pende del basidio por medio de un delicado pedicelo, el cual se rompe cuando la basidiospora se libera con fuerza (Royse, 1997; Kües y Liu, 2000).

Existen basidiomicetos que son llamados de la pudrición blanca, son eficientes degradadores de lignocelulosa, debido a su capacidad de sintetizar enzimas

hidrolíticas y oxidativas de acción extracelular (Elisashvili *et al.*, 2006). Estas enzimas son importantes por su aplicación industrial, biotecnológica y ambiental ya que degradan los materiales lignocelulósicos convirtiéndolos en compuestos de bajo peso molecular que son asimilados por el hongo (Cohen *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2003).

### 2.3. Hongos comestibles

Desde la antigüedad existen hongos que son consumidos como alimento en muchas culturas, por ejemplo, los griegos creían que les proporcionaban fortaleza en las batallas que libraban contra otros guerreros; los egipcios los catalogaban como un manjar, los romanos sólo los comían en ocasiones especiales, pues los consideraban como un alimento de los dioses y los chinos los han adoptado en su dieta para mantenerse saludables. Actualmente sabemos por los estudios científicos que los hongos *Flammulina velutipes* (enokitake), *Grifola frondosa* (maitake), *Lentinus edodes* (shiitake), *Pleurotus ostreatus* (ostra) y *Agaricus blazei* (murril) contienen en su cuerpo fructífero no solo sustancias medicinales sino que también aportan una cantidad importante de nutrientes (Chang, 1996; Wasser y Weis, 1999; Pínheiro *et al.*, 2003; Chang y Miles, 2004; Firenzuoli *et al.*, 2008). De las más de 10,000 especies conocidas de macromicetos, aproximadamente 700 son comestibles y más de 200 especies tienen valor medicinal (Dikeman *et al.*, 2005). Los hongos comestibles con mayor importancia social, ecológica y económica son el champiñón, *Agaricus bisporus*; las setas, *Pleurotus*, y el shiitake, *Lentinus edodes* (Sobal *et al.*, 2007).

**Cuadro 1. Valor nutricional de las setas (peso redondeado 100 g en peso fresco)**

Energía (Kcal)	Proteína (g)	Lípidos (g)	Hidratos de carbono (g)	Fibra (g)	Tiamina (mg)	Riboflavina (mg)	Niacina (mg)	Ac. Ascórbico (mg)
22	2.6	0.3	3-28	14	4.8-7.8	4.7-4.9	55-109	36-58

Fuente: Pérez y Marvan, 2001.

Además, una dieta a base de hongos proporciona nutrientes y componentes bioactivos como proteínas, algunas vitaminas y minerales (cuadro 1), ácidos grasos insaturados y fibra (Chang, 1996; Mattha *et al.*, 2001). La fracción de los polisacáridos incluye pentosas, hexosas, sacarosa (azúcar de alcohol), ácidos glucónicos, metil pentosas y amino azúcares (como quitina). *P. ostreatus* tiene un contenido alto de hidratos de carbono, así como de fibra cruda, de la cual el 47% es fibra dietética (Breene, 1990; Burns *et al.*, 1994). Aunque, las setas comestibles también pueden contener compuestos antinutricionales como taninos e inhibidor de la tripsina o tóxicos (Pb, Cd, Ni, As, Hg y Cr) (Adewusi *et al.*, 1993; Falade *et al.*, 2008). En general las setas contienen cada mineral presente en su sustrato de crecimiento, incluyendo cantidades sustanciales de fósforo y potasio, en menor cantidad calcio y una muy pequeña cantidad de hierro (Baldrian y Gabriel, 2003).

Las setas son ricas en proteínas y otros nutrientes importantes; el contenido proteico de *Pleurotus* spp. depende de la especie, en peso seco es de un 10% a un 40% y contiene todos los aminoácidos esenciales (Jacinto y Burrola, 2007). El contenido total de aminoácidos libres es de 289  $\mu\text{mol/g}$  (aproximadamente 25% - 30%) incluyendo alanina, ácido glutámico y la glutamina que es uno de los aminoácidos predominantes. Los hongos tienen bajo contenido de aminoácidos que contienen azufre (metionina y cisteína) pero *P. ostreatus* está limitado en metionina, cisteína, triptófano, lisina, leucina, fenilalanina y tirosina (Breene, 1990; Silva *et al.*, 2002).

El contenido de lípidos es mayor en el talo que en el sombrero, además los ácidos grasos son componentes importantes de las células fúngicas, forman parte del citoplasma y de la membrana de organelos celulares; el hongo ostra contiene todas las clases de compuestos lipídicos, incluyendo ácidos grasos libres como los mono-, di-, y triglicéridos, esteroides, esteroles, esterol ésteres, y fosfolípidos. Los lípidos neutros constituyen de un 20 a un 30% de los lípidos totales, aproximadamente 10% de glicolípidos, y de un 60 a un 70% de fosfolípidos. Entre los ácidos grasos se encuentran el ácido palmítico y esteárico junto con sus derivados insaturados, los

ácidos palmitoleico, oleico, linoleico y linolénico. Los ácidos linoleico y linolénico constituyen de un 70% a un 80% del total de los ácidos grasos, los cuales son de fácil digestión y de naturaleza hipolipémica (Mikhailova *et al.*, 1993). En la nutrición humana, los ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico son esenciales para el metabolismo basal (Parikh *et al.*, 2005).

La fosfatidil colina y la fosfatidil etanolamina son de los principales fosfolípidos encontrados. *Pleurotus* spp. tiene una alta concentración de esteroides de los cuales el ergosterol es el más importante y comprende más del 70% del total de éstos (Brenne, 1990). Factores ambientales como la concentración de oxígeno y la temperatura, así como las condiciones nutricionales pueden afectar la composición micelial y lipídica; la insaturación de los ácidos grasos puede incrementar conforme la temperatura disminuye (Suutari *et al.*, 1990; Suutari y Laakso, 1994; Suutari, 1995).

Los hongos también son una buena fuente de tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina, biotina, y ácido ascórbico (vitamina C), pero, las vitaminas A y D no son muy comunes, aunque varias especies contienen una cantidad detectable de  $\beta$  caroteno, y muchos ergosteroides que son convertidos en vitamina D cuando se someten a luz ultravioleta. *P. ostreatus* contiene tiamina, riboflavina y niacina. *P. ostreatus* y *P. sajor caju*, tienen alto contenido de ácido ascórbico, (Breene, 1990; Opletal, 1993); por esta razón los derivados de éste ácido se extraen de *P. ostreatus*. Éstos son utilizados como antioxidantes y agentes reductores en medicina para el tratamiento de escorbuto, diabetes, cáncer y en la industria alimentaria como aditivos (Gunde-Cimerman, 1999).

#### **2.4. Fermentación en fase sólida (FFS)**

El cultivo del *P. ostreatus*, se ha incrementado considerablemente alrededor del mundo y una de las técnicas más utilizada para esta tarea es la fermentación en fase sólida, en la cual la energía utilizada por el hongo procede de una gran variedad de sustratos orgánicos sólidos, tales como desechos de madera y residuos de las operaciones de cosecha, paja de trigo, desperdicio de algodón, cacahuate, cáscara de cacahuate, frijol de soya y sorgo (Gregori *et al.*, 2007) pulpa de café (Hernández *et al.*, 2003), paja de calabaza (Ancona Mendez *et al.*, 2005) agrodesperdicios como tallos de algodón, fibra de coco, sorgo cocido y mezclas de estos desperdicios (Ragunathan y Swaminathan, 2003), avellana, *Tilia* spp., hojas de álamo europeo y desperdicio de papel (Yildiz *et al.*, 2002), desperdicios sin pretratar de granos usados en la industria cervecera (Wang *et al.*, 2001).

Incluso se han usado sustratos como el aserrín y la paja, que son pretratados fisicoquímicamente, principalmente para la eliminación de contaminantes. Así el uso de tales sustratos incrementa los ingresos económicos y ayuda a limpiar y renovar el ecosistema (Croan, 2000; Croan, 2004). Los estudios recientes se han enfocado en la utilización de desechos agrícolas como sustratos para la degradación de lignina y producción de alimentos con alto valor nutricional.

Esta fermentación es muy simple de realizar, los métodos de cultivo del género *Pleurotus* spp. son los siguientes: anaquel, bolsa, botella, bandejas, jarras, estructuras con malla, estructuras empotradas en la pared, pero en la práctica las más usadas son la bolsa, la botella y los estantes (Stamets, 2000). Después de la cosecha del cuerpo fructífero, los residuos del sustrato se agotan y pueden convertirse en una amplia fuente de enzimas. Asimismo la suplementación con nutrientes y aditivos sobre diferentes tipos de paja puede incrementar la eficiencia biológica (EB) y la producción de enzimas.

La EB es el rendimiento en peso fresco de hongos por 100 g de sustrato en peso seco, un ejemplo de esto es *P. ostreatus* cuya EB es menor cuando se cultiva sobre

aserrín fresco que cuando se cultiva sobre un compuesto mezclado de aserrín y salvado (Obodai *et al.*, 2003). Los sustratos lignocelulósicos que se han utilizado para la producción de enzimas son principalmente aserrín de madera y paja que pueden ser pre-tratados o adicionados con suplementos, también se utilizan las hojas de árboles, cáscara de mandarina, plátano, manzana, desechos de la industria vinícola (Sánchez *et al.*, 2007), salvado de trigo, desechos de la industria cervecera, aserrín de madera, lima, bagazo de caña de azúcar, salvado de arroz reventado y viruta de coníferas pre-tratada, aunque con esta última no siempre se tiene el éxito deseado debido a los componentes inhibidores que contiene (Watanabe *et al.*, 2006; Elisashvili *et al.*, 2008).

No obstante que la FFS es una forma de cultivo sencilla pues no requiere de procedimientos difíciles para su realización, lo cual le daría ventajas respecto a la fermentación líquida, sin embargo, ha demostrado tener severos problemas de ingeniería como los amplios espacios para la incubación y la fácil contaminación de los cultivos; además la siembra de *Pleurotus* spp. sobre troncos naturales no es muy usado debido a que ha mostrado dificultades como largos periodos de incubación, bajos rendimientos y una dependencia del medio ambiente para la producción del hongo si se realiza al aire libre (Gregori *et al.*, 2007).

## **2.5 Fermentación en líquido (FL)**

La FL ofrece la posibilidad de incrementar la producción de biomasa en un espacio reducido, en tiempo más corto y con una menor probabilidad de contaminación (Yang y Liau, 1998; Friel y McLoughlin, 2000). Estas ventajas han sido aprovechadas por compañías en el aspecto biotecnológico y utilizadas en el área de la medicina (Smith *et al.*, 2002). Se han desarrollado diferentes técnicas de FL para diversos hongos y se ha usado la propagación del micelio para diferentes aplicaciones, por ejemplo la producción de cuerpo fructífero en sustratos sólidos con micelio crecido en un medio

líquido, producción de alimento, suplementos dietéticos y farmacéuticos, la bioconversión de desechos y la producción de enzimas (Songulashvili *et al.*, 2007).

La FL es apropiada para la producción de enzimas, principalmente de tipo hidrolíticas; los trabajos más recientes se han enfocado en la optimización del sustrato para una máxima producción de enzimas ligninolíticas extracelulares, hidrolíticas y oxidativas. Incluso se han observado diferencias importantes en la actividad de enzimas lignocelulíticas de *L. edodes* y *Pleurotus* spp. en FFS y FL, y éstas básicamente dependen del tipo de desechos lignocelulósicos y del medio de cultivo utilizado (Elisashvili *et al.*, 2008).

El desarrollo de los hongos es afectado por varios factores, así, la temperatura afecta el metabolismo de las células; influyendo en su capacidad enzimática y en la fluidez de los lípidos de su membrana celular. La sensibilidad a la temperatura depende de la etapa de desarrollo y de la cepa del hongo. El pH del medio de cultivo donde crece un hongo tiene una influencia directa sobre éste, porque puede desnaturalizar las proteínas de la membrana celular; asimismo afecta la actividad de las enzimas ligadas a la pared celular. Si el pH del sustrato no es el adecuado, aunque las condiciones de temperatura y nutriente sean óptimos, el crecimiento se verá afectado. De igual forma, la composición del medio de cultivo líquido es esencial para el crecimiento de un hongo, si éste contiene todos los nutrientes suficientes, el hongo tomará la energía que requiere y sintetizará sus metabolitos. Naturalmente, la naturaleza y concentración de los nutrientes varía según la especie del hongo (Sánchez y Royse, 2001).

Es bien sabido que la concentración de carbono es de vital importancia como fuente de energía para la formación de diferentes estructuras celulares y para la producción de metabolitos (Kim *et al.*, 2005), por ello este elemento es requerido en mayores cantidades. Y los hongos pueden utilizar el carbono proveniente de diferentes fuentes como son hidratos de carbono, lípidos, lignina, celulosa, etc. Asimismo, el

nitrógeno también es importante en el crecimiento y desarrollo fúngico, la concentración y la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo afectan la producción de biomasa y polisacáridos. Gern *et al.*, (2008) reportan que *P. ostreatus* produce mayor cantidad de biomasa cuando se sustituye el extracto de levadura por licor de maíz, en cultivo líquido. Además se ha observado que un incremento en la concentración de nitrógeno en el medio tiene un efecto positivo en la producción de biomasa, y en la concentración de polisacáridos (Burns *et al.*, 1994; Gern *et al.*, 2008). Del mismo modo, la falta de nitrógeno en el medio inhibe el crecimiento micelial y la producción de metabolitos (Kim *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008).

Wang *et al.* (2005) determinaron que la relación C/N adecuada para el crecimiento en medio líquido de *P. ostreatus* era 40:1, y los minerales y las vitaminas actúan como estimulantes del crecimiento fúngico. También el oxígeno es un elemento de gran importancia para el crecimiento de los basidiomicetos ya que son organismos aerobios, así la aireación del cultivo es trascendental y estos organismos tienen requerimientos de oxígeno, que dependen del estado fisiológico en que se encuentren (Sánchez y Royse, 2001). Para *P. ostreatus* se encontró que la velocidad y la intensidad de la aireación afectan el crecimiento y el tamaño del pellet, siendo el tamaño del pellet inversamente proporcional al índice de crecimiento específico (Márquez- Rocha *et al.*, 1999).

## **2.6 Polisacáridos producidos por hongos**

Durante los últimos 30 años, muchos de los polisacáridos y complejos polisacárido-proteína han sido aislados de macromicetos, hongos filamentosos, levaduras, algas, líquenes y plantas (Ooi y Liu, 2000), y son consumidos por el hombre para estimular el sistema inmune no específico, con la finalidad de ejercer una actividad antitumoral a través de la activación de un mecanismo de defensa (Reshetnikov *et al.*, 2001); similar al que provoca un medicamento, activando a las células que son parecidas a

macrófagos, a los linfocitos T y a las células NK (Natural Killer) para secretar citoquinas e inducir apoptosis y diferenciación en las células tumorales (Zhuo y Gao, 2002).

Recientes estudios han demostrado que los polisacáridos de los hongos poseen actividades biológicas interesantes (Hu *et al.*, 2006). Los  $\beta$ -glucanos, como se les conoce a estos polisacáridos, son un amplio grupo de polímeros de  $\beta$ -glucosa, cuya diferencia radica en la posición de sus enlaces glicosídicos. Estos compuestos, pueden causar una reacción inmune similar o idéntica en los macroorganismos, la diferencia la causa su estructura o su solubilidad en agua o en álcalis. Los  $\beta$ -glucanos muestran un notable efecto fisiológico, razón por la cual han ganado notable importancia.

A este amplio grupo de compuestos fisiológicamente activos se les denomina modificadores de la respuesta biológica (MRB). De acuerdo con sus efectos, los MRB pueden ser clasificados en dos grandes grupos: citoquinas, responsables de la comunicación entre las células del sistema inmune y la regulación del sistema, y los inmuno-moduladores. Los inmuno-moduladores pueden ser positivos (inmunopotencializador) o negativos (inmunosupresor) en la activación del sistema inmune y se les clasifica en tres grupos: 1) microbios intactos y compuestos de la célula microbial entre ellos los polisacáridos de las células fúngicas; 2) componentes naturales del sistema inmune y 3) compuestos sintéticos (Novak y Vetvicka, 2008).

Entre los  $\beta$ -glucanos de origen fúngico se encuentran la lentina, aislada de *Lentinus edodes*, el esquizofilano de *Schizophyllum commune*, la fracción Maitake-D de *Grifola frondosa* y compuestos de *Trametes versicolor*, usados en el área clínica de muchos países orientales. La lentina (1-3)- $\beta$ -D-glucano, que ha reportado tener una actividad antitumoral importante administrada por vía intravenosa en una dosis de 0.5-1.0 mg por día, se ha empleado especialmente en Japón y China para mejorar el tratamiento de cáncer en conjunto con la radioterapia y la quimioterapia (Lindequist *et al.*, 2005).

Asimismo las propiedades medicinales, como antitumorales (Bobek *et al.*, 1998), inmunomoduladores, antigenotóxicos, antioxidantes, antiinflamatorios (Jose *et al.*, 2002), hipocolesterolemiantes (Bobek *et al.*, 1991; Bobek y Galbavy, 1999; Fukushima *et al.*, 2000), antihipertensivos, anticoagulantes, antihiperlipémicos (Hu *et al.*, 2006), antimicrobianos y antivirales (Jong y Donovan, 1989) que poseen varias especies de *Pleurotus* se deben a la actividad biológica de numerosos polisacáridos y complejos proteína/polisacáridos (Ooi y Liu, 1999; Ooi y Liu, 2000).

En el caso de *Pleurotus*, las propiedades de los polisacáridos producidos en FL dependen de las especies usadas, de los parámetros de crecimiento, de la regulación de crecimiento y de las condiciones nutrimentales del medio de cultivo (Kim *et al.*, 2002; Rosado *et al.*, 2003). Estudios realizados con *P. citrinopileatus* demostraron que la producción más alta de polisacáridos fue obtenida en un medio de cultivo con una relación C/N de 40:1, un pH inicial de 5.5 y una temperatura de cultivo de 25 °C (Wang *et al.*, 2005). Otro parámetro que influye en la producción de polisacáridos y en el crecimiento de *P. ostreatus* es el coeficiente de transferencia del oxígeno ( $K_{La}$ ). La mejor producción de polisacárido fue obtenida con un  $K_{La}$  inicial bajo (Gern *et al.*, 2008).

## **2.7 *Pleurotus ostreatus***

*Pleurotus* es conocido como “hongos ostra”, es uno de los más populares hongos comestibles debido a sus propiedades organolépticas y medicinales, su vigoroso crecimiento y sencillas condiciones de cultivo (Gregori *et al.*, 2007). El sabor es la razón más importante que ha incrementado el consumo de los hongos ostra, se han identificado compuestos volátiles de ocho carbonos como responsables de su característico aroma lo que incrementa sus propiedades organolépticas, cuyos precursores son ácido linoleico y linolénico (Rajaratnam y Bano, 1991; Beltrán García *et al.*, 1997).

*P. ostreatus* es un basidiomiceto de la pudrición blanca (Sarikaya y Ladish, 1997), está ampliamente distribuido en la naturaleza, crece en maderas o árboles muertos (Fig.3), que generalmente son pobres en nutrientes y vitaminas, así como en una gran variedad de desechos agrícolas y forestales (Eichlerová-Volákavá y Homolka, 1997). Su comercialización es alta en muchos países alrededor del mundo debido a sus propiedades sensoriales, medicinales y a su alto valor nutricional (Gunde-Cimerman, 1999; Ooi y Liu, 2000; Bao *et al.* 2004; Chang y Miles, 2004; Royse *et al.*, 2004).

El sombrerillo o píleo es redondeado (Fig. 3), su superficie es lisa, abombada o convexa cuando es joven, el borde es enrollado al principio; el tamaño depende de la edad, oscilando entre 5 y 15 cm. de diámetro, el color es variable, desde gris claro a gris oscuro, con el tiempo puede tomar una coloración amarillenta en el borde. El pie suele ser corto, ligeramente duro y algo peloso en la base; el cuerpo es blando y con olor a anís. Al interior del sombrero existen laminillas de forma radial que van desde el pie hasta el borde, las laminillas son anchas, cuyo color va del blanco al crema, en ellas se producen las espores. Éstas esporas son de tamaño microscópico (7.5 a 11.5 x 3 a 5.6  $\mu\text{m}$ ) casi cilíndricas (Chang, 1996).

Reino:	Fungi
Filo o División:	<i>Basidiomycota</i>
Orden:	<i>Agaricales</i>
Familia:	<i>Tricholomataceae</i>
Género:	<i>Pleurotus</i>
Especie:	<i>ostreatus</i>



### **Figura 3. Taxonomía de *Pleurotus ostreatus***

Este saprofito es extensamente cultivado en distintas partes del mundo, su cultivo es una alternativa parcial para solucionar algunos problemas como son la escasez de alimentos nutritivos, la contaminación que generan algunos desechos orgánicos de origen agroindustrial, la falta de nuevas fuentes de alimentación humana y animal y la generación de abonos orgánicos, pues una vez degradado el sustrato por el hongo, éste se puede usar como alimento para el ganado o bien como abono (Kües y Liu, 2000).

#### **2.7.1 Cultivo de *Pleurotus***

En los últimos años el cultivo de las especies de *Pleurotus* se ha desarrollado mundialmente, llegando a ocupar el tercer lugar en producción entre los hongos comestibles cultivados (Valencia del Toro *et al.*, 2007). A pesar de existir una ancestral tradición micófaga, el cultivo de hongos comestibles en México es relativamente reciente, empezó durante la primera mitad del siglo pasado y fue *Pleurotus* el primer género cultivado. El cultivo de este hongo ya ocupa el segundo lugar en producción en Latinoamérica, solo después del champiñón; en América, México es el principal productor.

En la mayoría de los países latinoamericanos se incrementa el interés por cultivar setas, tanto como una estrategia de desarrollo económico y de producción de un alimento como por ser una alternativa de utilización de subproductos agrícolas (Sánchez *et al.*, 2007). Además de que éstos hongos son importantes como alimento humano de alta calidad nutritiva y propiedades medicinales, también sirven para

elaborar suplementos dietéticos y producir enzimas y metabolitos con amplio potencial de utilización en la industria (Mora y Martínez, 2007).

El interés de muchos cultivadores por *Pleurotus* se ha incrementado debido a que la técnica de producción es sencilla y barata, crecen de manera rápida (Gaitán *et al.*, 2007) en diversos productos agroforestales, hierbas, desechos de comida (Gregori *et al.*, 2007) y se adaptan a diversas condiciones climáticas, esto también ha motivado la investigación sobre el tema (Gaitán *et al.*, 2007). Actualmente las investigaciones se han centrado en las diferentes técnicas de cultivo, ya sea por FFS o FL enfocándose a la optimización del sustrato, la producción de biomasa, el aislamiento de compuestos bioactivos y la producción de enzimas que favorecen la degradación de sustancias dañinas (Elisashvili *et al.*, 2008).

En México, el cultivo ha incrementado tanto a nivel industrial como entre los pequeños productores (Valencia del Toro *et al.*, 2007), con cepas silvestres o extranjeras (Ramírez *et al.*, 2007). Aunque inicialmente la venta de las setas en el mercado nacional fue restringida debido al reducido conocimiento que los consumidores tenían sobre la especie (Salmones *et al.*, 2007) ahora la producción comercial en fresco de *Pleurotus* en México es de 2,193.0216 toneladas anuales (Mora y Martínez, 2007). El kg de setas en México tiene un costo de \$45.00.

Los sustratos empleados en el cultivo de setas en México son: bagazo de caña de azúcar, bagazo de caña tratado con hidróxido de sodio (NaOH), bagazo de maguey tequilero, cáscara de cacahuete, fibra de coco, hoja de caña de azúcar, hojarasca de parques y jardines, hojas de pimienta, hoja seca de maíz, hojas usadas de canela, hojas de zacate de limón, olote de maíz, paja de cebada, paja de sorgo, paja de trigo, papel desechado de oficina, pulpa de café, pulpa de cardamomo, rastrojo de frijol, rastrojo de haba, rastrojo de maíz, residuos de granos de producción de cerveza, residuos vinícolas, tamo de maíz, viruta de pino (Mora y Martínez, 2007).

### **III. Problema de investigación**

Muchos polisacáridos aislados de hongos han sido consumidos por el hombre para estimular el sistema inmune y provocar diversas actividades biológicas (Bohn y BeMiller, 1995). Se requiere mayor investigación que permita la obtención de polisacáridos, con aplicación potencial en la salud humana, provenientes de fuentes naturales, como los hongos, debido a las propiedades medicinales y terapéuticas que estos compuestos han mostrado tener (Gregori *et al.*, 2007). Además es necesario que los procesos de obtención sean limpios y de bajo costo (Gern *et al.*, 2008). Es bien sabido que las condiciones nutricionales del cultivo y los parámetros del crecimiento influyen sobre la producción de estos polisacáridos, lo antes mencionado sugiere la siguiente pregunta: ¿la suplementación del medio de cultivo líquido

incrementará el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* y la producción de sus polisacáridos?

#### **IV. Justificación**

La especie *Pleurotus* ha sido usada por muchas culturas alrededor del mundo por su valor nutricional, propiedades medicinales, aporte de fibra a la dieta y contenido de compuestos bioactivos con actividades terapéuticas. En muchos países, gran parte de la población trabaja en la agricultura, pero la mayoría no se alimenta de manera suficiente o tiene una situación nutricional inadecuada. Los residuos agroindustriales anualmente generan vastas cantidades de rastrojos, tallos y desechos, de los cuales una porción es quemada para utilizar las cenizas como fertilizante en el campo y otra es incorporada al suelo para enriquecerlo con materia orgánica; sin embargo, la mayor parte se deja podrir y no se usa en absoluto.

El resultado final es que esas naciones agrícolas producen una enorme cantidad de materiales de desecho que permanecen sin uso, salvo raras excepciones. El cultivo de especies de *Pleurotus* sobre desechos agrícolas es una buena alternativa para producir alimentos. Los hongos comestibles convierten los desechos agrícolas en alimentos, por lo que son una buena fuente de proteína barata. La mayoría pueden ser producidos en un corto periodo de tiempo, bajo costo y en áreas reducidas. Además, el desarrollo del cultivo de hongos a pequeña escala en países en

desarrollo necesita una tecnología sencilla en condiciones poco sofisticadas y con insumos de bajo costo, como lo son estos desechos agrícolas (Sánchez y Royse, 2001).

No obstante que México es el principal país productor de setas en América (Sánchez *et al.*, 2007) y un 49.4% de los consumidores de zonas urbanas compra hongos comestibles, la mayor parte de la población desconoce los beneficios nutricionales y medicinales que genera el consumo de este alimento (Martínez-Carrera *et al.*, 2007).

*Pleurotus* spp. produce polisacáridos denominados  $\beta$ -1,3 glucanos que juegan un importante papel como modificadores de la respuesta biológica y ejercen una gama de actividades inmuno farmacológicas, en particular un efecto antitumoral e inhibición de la metástasis, así como la estimulación de la hematopoyesis. La producción de tales polisacáridos es mayor en cultivo líquido pero la investigación sobre la FL de *Pleurotus* spp. es escasa, la optimización de la producción de biomasa y polisacáridos ( $\beta$ -1,3 glucanos) contribuirá al desarrollo de su aplicación con fines medicinales (Kim *et al.*, 2002; Rosado *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Gern *et al.*, 2008).

## **V. Hipótesis**

La suplementación del medio de cultivo con extractos acuosos de paja de trigo, pulpa de café, cáscara de cacahuate o cáscara de naranja incrementará el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* y la producción de polisacáridos bajo condiciones de cultivo líquido.

## **VI. Objetivo General**

Evaluar el efecto de la adición de extractos acuosos de paja de trigo, pulpa de café, cáscara de naranja ó cáscara de cacahuate al medio de cultivo sobre el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* y sobre la producción de sus polisacáridos bajo condiciones de cultivo líquido para establecer las mejores condiciones de cultivo.

## **VII. Objetivos específicos**

- Determinar el mejor medio cultivo para la producción de biomasa de *P. ostreatus* en cultivo líquido.
- Establecer la formulación del medio de cultivo que produce la mayor cantidad de polisacáridos de *P. ostreatus* en cultivo líquido.

## VIII. Diseño Metodológico

### 8.1 Organismo

Para este estudio se utilizó la cepa *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, ATCC 38540 crecida en agar papa dextrosa. Cinco discos de agar, de 5 mm de diámetro, invadidos con micelio fueron inoculados en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 80 mL de MMB (medio mínimo para basidiomicetos), composición: 5 g/L de glucosa, 5 g/L de extracto de levadura a pH 5.5; e incubada a 150 rpm y 25 °C durante 7 días.

### 8.2 Condiciones de cultivo

Para evaluar el efecto de la composición de los medios de cultivo sobre la producción de biomasa y polisacáridos de *P. ostreatus* se usó un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos, el tratamiento T fue el control. La matriz del diseño experimental se muestra en el cuadro 2.

**Cuadro 2. Matriz del diseño experimental**

Tratamiento	Suplemento (tipo de extracto)	Tiempo de cultivo (días)
T	Sin extracto	5, 10, 15
CC	Cáscara de cacahuete	5, 10, 15

CN	Cáscara de naranja	5, 10, 15
PC	Pulpa de café	5, 10, 15
PT	Paja de trigo	5, 10, 15

Para preparar los extractos acuosos 2.5 g de residuo agroindustrial, seco y molido, fueron sumergidos en 1 L de agua destilada, luego la mezcla fue calentada a 85 °C durante 1 h, finalmente el sólido fue eliminado y el filtrado fue utilizado para preparar el medio de cultivo (Sánchez *et al.*, 2005). Los residuos agroindustriales empleados fueron: cáscara de cacahuate, pulpa de café, cáscara de naranja y paja de trigo. 40 mL del medio de cultivo fueron vertidos en matraces Erlenmeyer de 125 mL y esterilizados a 121 °C (15 Lb/plg) durante 15 minutos en una autoclave (Mca. Felisa, Mod. FE339). Luego, el medio de cultivo fue inoculado con 1 mL de una suspensión acuosa de micelio de *P. ostreatus*, que se preparó al mezclar los pellets cultivados durante 7 días en un MMB, con 40 mL de agua destilada estéril, en una licuadora (Mca. Osterizer) durante 30 s. Posteriormente los matraces inoculados fueron incubados a 28 °C en una incubadora orbital (Mca. ESEVE) a 150 rpm durante 15 días (Kim *et al.*, 2002). Como variables de respuesta se cuantificaron la producción de biomasa y la concentración de polisacáridos intra y extracelular. Las determinaciones se efectuaron cada cinco días y todas las mediciones se realizaron por triplicado, con dos repeticiones.

### 8.3 Cuantificación de biomasa

La biomasa se cuantificó a través de su peso seco: el caldo de cultivo fue filtrado en papel Whatman No. 2, previamente puesto a peso constante. El micelio recuperado fue lavado con agua destilada y secado en una estufa de vacío a 50 °C durante 48 h. Finalmente, la biomasa seca fue pesada.

$$\text{Biomasa [mg/L]} = \frac{\text{PB-PP}}{V}$$

Donde:

PB= Peso de la biomasa seca con el papel.

PP= Peso constante del papel.

V= Volumen del caldo de cultivo en cada matraz (L).

## **8.4 Extracción de los polisacáridos**

La biomasa seca fue pulverizada y suspendida en 10 mL de agua destilada, luego se hirvió por 4 h para extraer los polisacáridos intracelulares. Después la suspensión fue filtrada y el filtrado fue mezclado con etanol frío (8 °C) en una proporción de volumen 4:1 (etanol: muestra). Después la mezcla se dejó en refrigeración (10 °C) durante 48 h, transcurrido este tiempo la muestra fue centrifugada a 8000 g por 10 min (Xu *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003). Los exopolisacáridos fueron extraídos del caldo de cultivo después de la separación de la biomasa, siguiendo el mismo procedimiento descrito para la extracción de polisacáridos intracelulares, con excepción del proceso de hervido por 4 horas.

### **8.4.1 Cuantificación de los polisacáridos**

Para los polisacáridos intracelulares el sedimento obtenido de la centrifugación se disolvió con 25 mL de agua destilada, posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL y se diluyó en 5 mL de agua destilada. Finalmente 1 mL de esta dilución se hizo reaccionar con 25  $\mu$ L de fenol al 80% (p/p). Después se adicionaron rápidamente 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado y después de 10 min de reacción la mezcla fue agitada en un vortex y colocada en un baño de agua a 25 °C durante 10 min. 1 mL de la mezcla de reacción fue colocada en una celda espectrofotométrica y las lecturas fueron tomadas a 490 nm para hexosas y 480 nm para pentosas y ácidos urónicos. Los polisacáridos extracelulares fueron centrifugados y el sedimento se disolvió en 25 mL de agua destilada, se tomó una alícuota de 1 mL y se diluyó en 25 mL de agua destilada, finalmente se cuantificaron (Dubois *et al.*, 1956). La

cuantificación se hizo en base a una curva de calibración usando glucosa y xilosa como estándares de calibración (Anexo, Figuras 7 y 8).

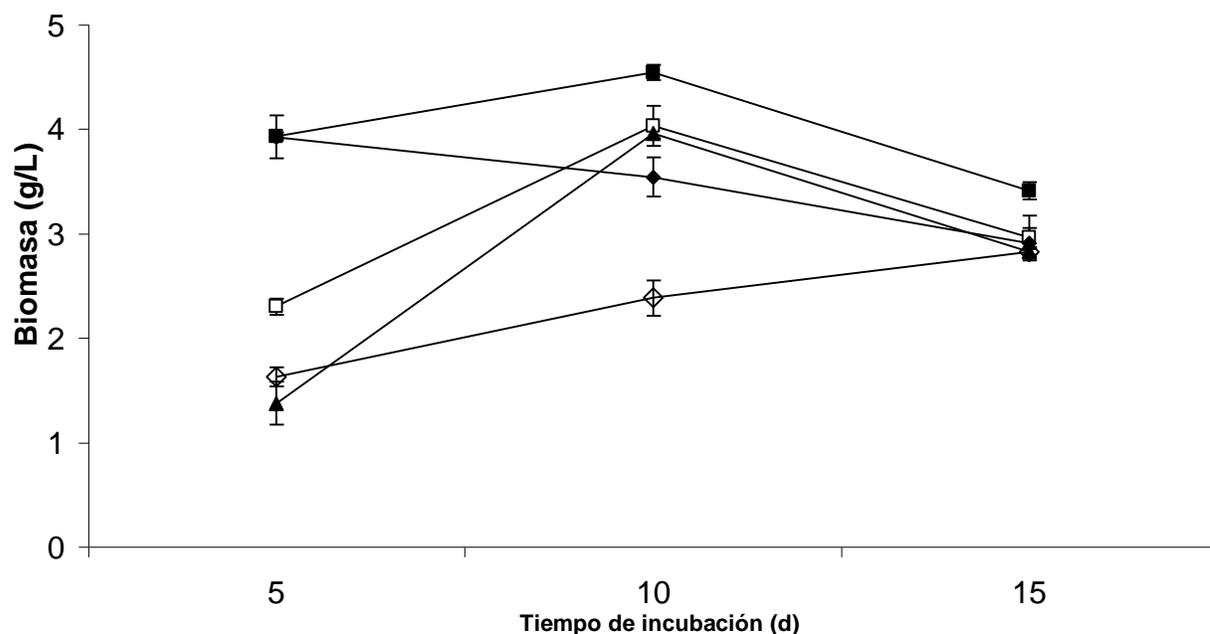
## **8.5 Análisis de los datos**

Los datos obtenidos fueron analizados con el paquete estadístico SAS (V 8.0). Para determinar la diferencia entre los tratamientos de cultivo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un modelo lineal general (GLM) nivel de significancia ( $P \leq 0.5$ ) mientras que para identificar el mejor tratamiento se utilizó una separación de medias por prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

## **IX. Resultados**

### **9.1 Cuantificación de la biomasa de *P. ostreatus* en diferentes medios de cultivo líquido**

La influencia de los extractos acuosos de cáscara de cacahuete (CC), pulpa de café (PC), cáscara de naranja (CN) y paja de trigo (PT) sobre el crecimiento de *P. ostreatus* se observa en la figura 4. La producción de biomasa entre los cinco y 15 días de incubación osciló entre 3.96 g de biomasa/L en el tratamiento PC y 2.28 g de biomasa/L para T, además se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ) (cuadro 3). El mejor tratamiento fue PC, el cual registró una producción promedio durante los 15 días de cultivo de 3.96 g de biomasa/L, seguido por PT cuya producción fue de 3.46 g de biomasa/L; mientras que CN produjo 3.1 g de biomasa/L y la CC 2.57 g de biomasa/L. El medio con la mínima producción fue T con 2.28 g de biomasa/L.



**Figura 4. Producción de biomasa por *P. ostreatus*, medios de cultivos: PC ■; PT ◆; CC ▲; CN □; T ◇.**

El tiempo de cultivo también afectó la producción de biomasa ( $p \leq 0.05$ ), mostrando la mayor producción a 10 días con una producción promedio de 3,68 g de biomasa/L, la menor producción se registró a los 15 y cinco días de cultivo con 2.99 y 2.63 g de biomasa/L respectivamente. El crecimiento del hongo tuvo el siguiente comportamiento, al día cinco, PC y PT registraron la mayor producción de biomasa (3.94 y 3.93 g de biomasa/L, respectivamente), seguidos de CN con 2.3 g de biomasa/L, mientras que la producción más baja fue para los tratamientos T y CC que lograron obtener 1.63 y 1.38 g de biomasa/L, respectivamente.

Al día 10 de incubación, el medio de cultivo suplementado con PC fue el que registró el mayor crecimiento y registró una producción de 4.55 g de biomasa /L, mientras que CN obtuvo 4.04 g de biomasa/L, CC registró 3.97 g de biomasa/L y fue estadísticamente igual a CN y PT (3.54 g de biomasa/L), el tratamiento T fue el que reportó la producción más baja de biomasa, cuyo valor fue de 2.39 g de biomasa/L. Finalmente después de 15 de incubación, PC obtuvo la mayor producción de

biomasa con un crecimiento de 3.41 g de biomasa/L y los tratamientos CN, PT, CC y T no mostraron diferencia significativa entre sí, siendo la producción de biomasa de 2.96, 2.91, 2.83 y 2.83 g de biomasa/L, respectivamente (Fig. 4).

**Cuadro 3. Análisis de varianza de la producción de biomasa**

Fuente	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr > F
Modelo	6	23.74	3.96	12.54	< 0.0001
Error	37	11.67	0.32		
Total corregido	43	35.41			
Tratamiento	4	16.21	4.05	12.85	< 0.0001
Tiempo	2	7.53	3.76	11.93	0.0001
		R <sup>2</sup> 0.67	C V 18.2		

\* altamente significativo.

## 9.2 Concentración de polisacáridos intracelulares (PSI)

La producción de PSI fluctuó entre 13.99 y 6.03 mg/g de biomasa y fue afectada significativamente por el medio de cultivo y por el tiempo de incubación ( $p \leq 0.01$ , cuadro 4). Los mejores medios de cultivo fueron CN y T, los cuales registraron 13.99 y 13.54 mg/g de biomasa, respectivamente; PT y CC (10.34 y 9.31 mg/g de biomasa) fueron estadística iguales a T y CN y a PC (6.03 mg/g de biomasa). El tiempo de cultivo al cual se registró la mayor producción de PSI fue al día 5 de cultivo con 16.46 mg/g de biomasa, para el día 10 la producción fue de 10.52 mg/g de biomasa y al día 15 fue de tan sólo 4.39 mg/g de biomasa.

**Cuadro 4. Análisis de varianza de la producción de PSI**

Fuente	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr > F
Modelo	6	1390.32	231.72	13.40	< 0.0001

Error	35	605.39	17.30		
Total corregido	41	1995.71			
Tratamiento	4	344.04	86.01	4.97	0.003
Tiempo	2	1046.28	523.14	30.24	< 0.0001
	R <sup>2</sup> 0.70	C V 39.22			

La concentración de PSI al día cinco de cultivo estuvo entre 9.91 y 20.92 mg/g de biomasa y no hubo diferencia estadística entre CN, PT y CC, cuya producción fue de 20.92, 20.82 y 18.52 mg/g de biomasa, respectivamente; la menor producción se observó en los tratamientos PC y T que reportaron 9.94 y 9.92 mg/g de biomasa, respectivamente (Fig. 5). Al día 10 de cultivo la producción de polisacáridos registró valores de 5.04 y 21.76 mg/g de biomasa, siendo el mejor tratamiento T, seguido de CN con 12.83 mg/g de biomasa; mientras que PT y CC fueron estadísticamente iguales, registrando 7.14 y 6.38 mg/g de biomasa, respectivamente. Finalmente a los 15 días de cultivo la producción fue de 1.65 mg/g de biomasa para el tratamiento PC, y fue estadísticamente igual a CC y PT con 3.03 y 3.05 mg/g de biomasa, respectivamente. Los mejores tratamientos fueron T y CN, cuya producción fue de 7.75 y 6.16 mg/g de biomasa, respectivamente.

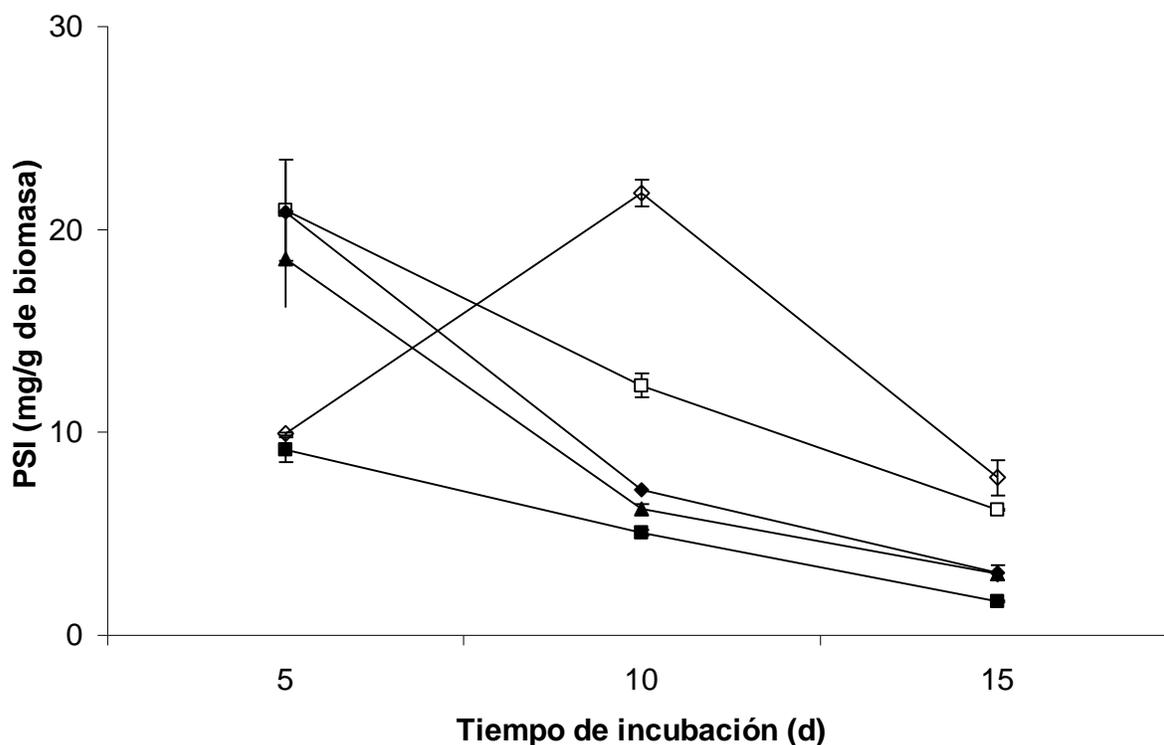


Figura 5. Producción de polisacáridos intracelulares por *P. ostreatus*, medios de cultivo: PC ■; PT ◆; CC ▲; CN □; T ◇.

### 9.3 Concentración de polisacáridos extracelulares (PSE)

La producción de PSE durante los 15 de cultivo registró niveles entre 222.07 mg/L de cultivo para T y 320.19 mg/L de cultivo para CN, los tratamientos PT, CC y PC alcanzaron una producción de PSE de 286.26, 232.82 y 239.37 mg/L de cultivo; siendo estadísticamente iguales todos los tratamientos. Sin embargo, el tiempo de cultivo fue significativo en la producción de PSE ( $p \leq 0.01$ , cuadro 5). El promedio de producción de PSE a los 15 días de incubación fue de 307.42 mg/L de cultivo y fue estadísticamente igual a la producción registrada al día 10 (276.79 mg/L de cultivo), la producción más baja fue registrada a los cinco días de cultivo con apenas 231.36 mg/L de cultivo.

La producción de PSE por tiempo de cultivo mostró el siguiente comportamiento, a los cinco días de cultivo la concentración de PSE fluctuó entre 182.18 y 377.59 mg/L y el mejor tratamiento fue CN, seguido de PC con 209.05 mg/L de cultivo; PT y CC fueron estadísticamente iguales registrando una producción de 196.43 y 191.54 mg/L de cultivo, respectivamente, no mostrando diferencia significativa con PC y T.

**Cuadro 5. Análisis de varianza de la producción de PSE**

Fuente	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Pr > F
Modelo	6	95452.82	15908.80	2.90	0.02
Error	37	202690.27	5478.12		
Total corregido	43	298143.09			
Tratamiento	4	54893.42	13723.36	2.51	0.059
Tiempo	2	40559.39	20279.70	3.70	0.03
R <sup>2</sup> 0.32		C V 27.31			

Al día 10 de cultivo la producción de estos polisacáridos fue de 217.6 mg/L de cultivo para CC a 324.26 mg/L de cultivo para CN, siendo los mejores tratamientos CN y T (310.41 mg/L de cultivo), seguidos por PC y PT, que no mostraron diferencia significativa entre sí y cuyas producciones de PSE de 268.07 y 263.6 mg/L de cultivo. Así el tratamiento con la producción de PSE más baja fue CC. Finalmente, a los 15 días de cultivo la producción de PSE fue de entre 173.63 y 442.32 mg/L y el medio CC fue el que registró la producción mayor (442.32 mg/L de cultivo), PT registró 398.75 mg/L de cultivo; CN y PC no registraron diferencia significativa entre sí, y la producción de PSE fue de 258.71 y 241.81 mg/L de cultivo, respectivamente; la producción más baja fue para T, cuyo nivel fue de 173.63 mg/L de cultivo (Fig. 6).

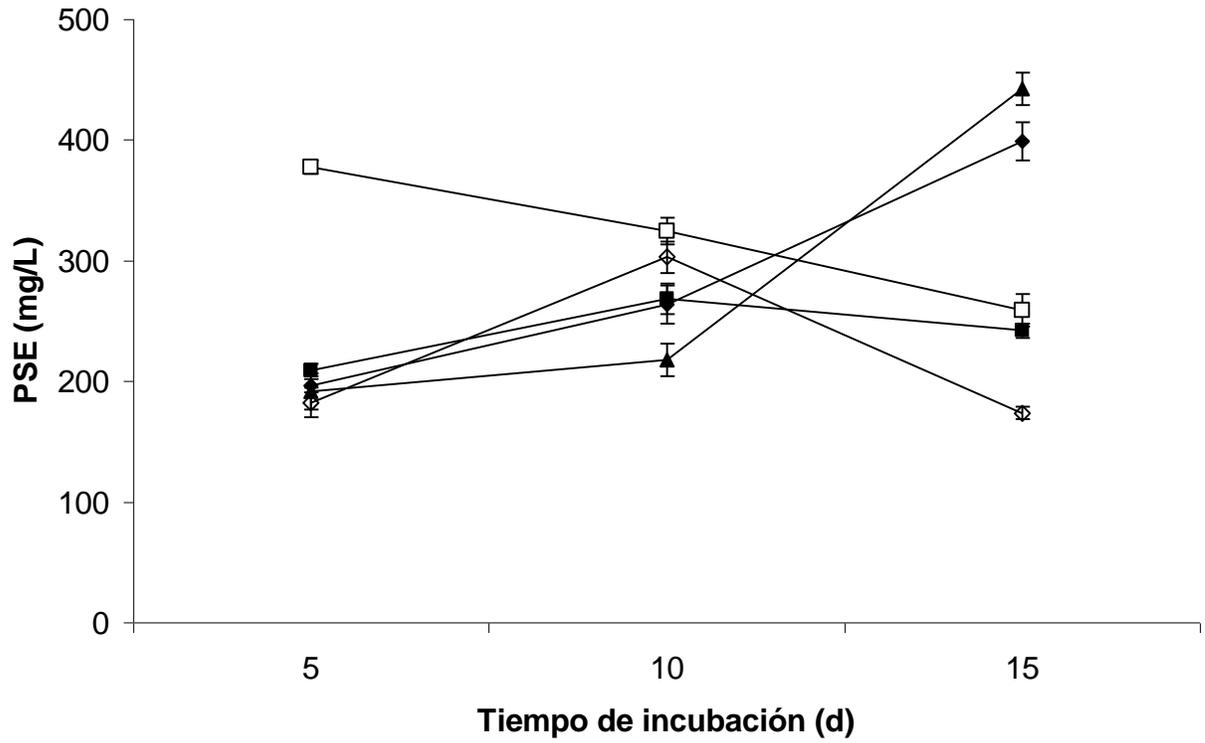


Figura 6. Producción de polisacáridos extracelulares por *P. ostreatus*, medios de cultivo: PC ■; PT ◆; CC ▲; CN □; T ◇.

## X. Discusión

La influencia de la adición de los extractos acuosos provenientes de PC, PT, CC y CN al medio de cultivo sobre la producción de biomasa y concentración de polisacáridos intra y extracelulares de *P. ostreatus* fue evaluada en este estudio.

### **10.1 Cuantificación de la biomasa de *P. ostreatus* en diferentes medios de cultivo líquido**

Durante todo el cultivo el mayor crecimiento de *P. ostreatus* fue observado en presencia de PC, lo que sugiere que los compuestos extraídos de este residuo son los responsables de incrementar el crecimiento del hongo. Entre estos compuestos están los azúcares libres contenidos en la PC (Martínez-Carrera, 1989), que son fácilmente degradados por el hongo y favorecen su crecimiento (Malinowska *et al.*, 2009), asimismo, se ha reportado que los compuestos fenólicos estimulan la actividad de la lacasa, permitiendo así acelerar el proceso de colonización sobre el sustrato (Mata y Savoie, 1998; Savoie, 1998; Murrieta *et al.*, 2002; Salmones y Mata, 2002; Salmones *et al.*, 2005), compuestos de este tipo se encuentran en la pulpa de café y algunos de ellos dan al café su aroma característico.

Además los monosacáridos y fenoles extraídos de PC podrían ser más fácilmente degradados o bien estar en mayor concentración que en los otros residuos agroindustriales, ejerciendo así el efecto estimulante sobre el crecimiento de *P. ostreatus* (Salmones *et al.*, 2005). PT también proporciona monosacáridos, fibra soluble y compuestos fenólicos al medio de cultivo mientras que la CN durante es un residuo agroindustrial de una fruta y contiene el azúcar que caracteriza a este grupo de alimentos y Cho *et al.*, (2006) reportaron un efecto estimulante de la fructosa sobre la producción de biomasa de *Tremella fuciformis*.

A pesar de que la CN no ha sido reportada por otros autores como suplemento en el medio de cultivo de *Pleurotus*, podría contener al igual que la cáscara de mandarina azúcares solubles (32-34%) y fáciles de metabolizar, los cuales han demostrado ser una buena fuente de carbono para varias especies de *Pleurotus* (Stajić *et al.*, 2006),

igualmente los componentes de la cáscara de mandarina han mostrado ser eficientes estimulantes para la producción de lacasa (Elisashvili *et al.*, 2008).

Es evidente que la suplementación del medio de cultivo, con los extractos de los diferentes residuos agroindustriales evaluados, incrementó la producción de biomasa, el medio de cultivo T (sin suplementar) fue el que registró la menor producción de biomasa a lo largo de los 15 días de cultivo. Todos los extractos probados suministran sustancias químicas que estimulan el crecimiento del hongo a través de su degradación directa o bien por el incremento de la actividad lacasa (Salmones *et al.*, 2005). Naturalmente el efecto en crecimiento de *P. ostreatus* depende del tipo de residuo agroindustrial que se utilice para suplementar el medio de cultivo.

Por otra parte, la producción de biomasa obtenida en este estudio fue mayor (4.54 g/L) a lo que reportan Guillén-Navarro *et al.* (1998), quienes obtuvieron 2.55 g/L, en un medio de cultivo formulado con 5 g/L de glucosa y 5 g/L de extracto de levadura y pH 4 con *P. ostreatus*. Mientras que Gern *et al.*, (2008) registraron una producción 14.15 g/L, utilizando un medio de cultivo cuya composición química fue de 5 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de glucosa; en una infusión de trigo (1 kg/L) y pH 4.5 para el mismo hongo. Sin duda en éste último estudio la mayor concentración de glucosa y la alta concentración de trigo en la infusión proporcionaron monosacáridos y disacáridos al medio de cultivo que promovieron una producción de biomasa mayor. Desde luego, la cepa del hongo también es determinante en su comportamiento fisiológico, ello explicaría en cierta medida este crecimiento.

Asimismo, la baja tasa de crecimiento de *P. ostreatus* al quinto día de cultivo, especialmente en los medios no suplementados con PC o PT, evidenció que el hongo estaba en la fase de adaptación al medio de cultivo, mientras que en los medios de cultivo suplementados con PC y PT, la tasa de crecimiento fue similar a la máxima producción de biomasa observada al día 10 de incubación en el resto de los medios de cultivo. Del día cinco al día 10 de incubación, el hongo mostró un

crecimiento acelerado con un corto periodo de adaptación, característico de una fase de crecimiento exponencial (Fig. 3), más acentuado en CC y CN; y que para el caso de T continuó hasta el día 15 de incubación. El comportamiento del crecimiento fúngico observado indica que mientras más rápido se adapte el hongo a un medio de cultivo, significa que cuenta con la capacidad de aprovechar al máximo las condiciones ambientales y de nutrientes que el medio de cultivo le ofrece y como consecuencia muestra una tasa de crecimiento elevada (Sánchez y Royse, 2001).

## **10.2 Determinación de la concentración de PSI producidos por *P.* en diferentes medios de cultivo líquido**

Para el día cinco de cultivo la mayor producción de PSI se obtuvo en los medios suplementados con CN, PT y CC, lo que sugiere que los compuestos extraídos de estos residuos agroindustriales aportan al medio de cultivo nutrientes y compuestos químicos que promueven la producción de PSI en una etapa temprana del crecimiento del hongo (Fig. 5). Asimismo el medio de CN contiene varios compuestos que podrían incrementar la producción de los PSI, por ejemplo la pectina que esta presente en la cáscara de naranja (25-40% en base seca) (Valdés, 2006), los carotenoides (Britton y Hornero-Hernández, 1997), así como aldehídos, ésteres y alcoholes solubles en agua que son los principales responsables del aroma del aceite de la cáscara de las frutas cítricas.

La paja de trigo contiene fibra soluble y extracto libre de nitrógeno (Cañas, 1998), ambos compuestos solubles en agua y la cáscara de cacahuate también contiene fibra soluble (Sudweeks *et. al.*, 1981), dichos compuestos en el momento de preparar los extractos pueden ser liberados al medio y podrían ser los responsables del efecto estimulante en la producción de PSI de *P. ostreatus*. El comportamiento observado al día cinco cambió radicalmente para el día 10 y 15 del cultivo, a estos periodos de

incubación, el medio sin suplementar fue el que mejores resultados mostró en la producción de PSI.

La suplementación del medio de cultivo incrementa la producción de PSI sólo al cabo de cinco días de cultivo, pero este incremento no es importante comparado con los niveles obtenidos al día 10, donde por el contrario un medio de cultivo sin suplementar da un rendimiento de PSI mucho mayor que el obtenido en medios de cultivo suplementados. Por otra parte, se observa que este medio T fue el que registró el mínimo crecimiento, lo cual sugiere que una menor producción de biomasa favorece un rendimiento alto de PSI provocando que el hongo priorice el uso de su energía para metabolizar el sustrato y producir PSI y no en crecer.

Además, la concentración de PSI obtenida en esta investigación fue mayor a lo reportado por otros autores quienes obtuvieron una concentración de PSI de 14.84 mg/g de biomasa en un medio de cultivo formulado con 5 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de glucosa; en una infusión de trigo (1 Kg/L) y pH 4.5 (Gern *et al.*, 2008), mientras que en nuestro caso la concentración obtenida osciló entre 1.65 y 21.76 mg/g de biomasa. Ello indica de que un medio de cultivo pobre en nutrientes incrementa sustancialmente la producción de PSI para el caso de *P. ostreatus*. Además se ha reportado que una alta concentración de glucosa ejerce un efecto negativo en la producción de polisacáridos (Gern *et al.*, 2008).

### **10.3 Determinación de la concentración de PSE producidos por *P. ostreatus* en diferentes medios de cultivo líquido**

La producción de polisacáridos extracelulares mostró que el menor nivel al día cinco de cultivo y el nivel más alta al día 15 de incubación ello parece indicar que la producción de éstos metabolitos se genera después que el hongo ha satisfecho sus requerimientos esenciales, primero sintetiza los PSI que son parte de su estructura y posteriormente libera polisacáridos al medio de cultivo (Sánchez y Royse, 2001),

como lo demuestran los índices de producción de PSE al día 10 y 15 de cultivo registrados en este estudio (Fig.6).

Kim *et al.*, (2002) evaluaron la producción de polisacáridos extracelulares con varias especies de hongos comestibles y diferentes medios; sus resultados para la especie de *P. ostreatus* oscilan entre 91 y 1044.6 mg/L, mientras que los nuestros se encuentran entre 173.63 y 442.31 mg/L, sin embargo, ellos utilizaron tres tratamientos distintos basados en diferentes concentraciones de glucosa (10-20 g/L), extracto de malta (3-10 g/L), peptona (1-5 g/L), caldo de papa dextrosa (24 g/L), extracto de levadura (2-3 g/L) y sales minerales, y aunque se ha observado que la composición del medio de cultivo, así como la diferencia de cepas y especies causa alteraciones en la producción de los PSE (Kim *et al.*, 2002), nuestros resultados se encuentran dentro de los intervalos reportados, lo cual sugiere que el hongo es capaz de producir una cantidad importante de PSE en un medio con concentraciones de nutrientes menores que las usadas por estos investigadores.

## **XI. Conclusiones**

La suplementación de un medio de cultivo a base de extracto de levadura y glucosa con extractos acuosos de PC, CC, CN y PT favorece el crecimiento de *P. ostreatus* en cultivo líquido e incrementa la producción de PSE a los 15 días de incubación, Sin embargo la producción de PSI es mayor cuando el medio de cultivo no se suplementa. PC es el extracto que registra el mayor incremento en la producción de biomasa y CN es el mejor extracto para estimular la producción de PSE.

## XII. Referencias bibliográficas

- Adewusi, S. R. A., Alofe, F. V., Odeyemi, O., Afolabi, O. A. y Oke, O. L. 1993. Studies on some edible wild mushrooms from Nigeria: Nutritional, teratogenic and toxic considerations. *Plant Foods for Human Nutrition*. 43: 115-121.
- Alexopolus, C. J., Mims, C. W y Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. En: Introductory Mycology. (ed) John Wiley & Sons, Inc. N. Y.
- Ancona Mendez, L., Sandoval Castro, C. A., Belmar Casso, R., y Capetillo Leal, C. M. 2005. Effect of substrate and harvest on the amino acid profile of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *J. Food Compos. Anal.* 18: 447-450.
- Baldrian, P. y Gabriel, J. 2003. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. *FEMS Microbiol. Lett.* 220:235-240.
- Bao, Y. Y., Zhang, Y., y Tolgor, L. Y. 2004. Chemical components of *Pleurotus citrinopileatus* Singer. *Mycosystema*. 23: 262-269.
- Beltran Garcia, M. J., Estarron Espinosa, M., y Ogura, T. 1997. Volatile compounds secreted by the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4049-4052.
- Bobek, P., Galbavy, S., y Ozdin, L. 1998. Effect of oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) on pathological changes in dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *Oncol Rep.* 5: 727-730.
- Bobek, P., Ginter, E., Jurcovicova, M., y Kuniak, I. 1991. Cholesterol lowering effect of the mushroom *Pleurotus ostreatus* in hereditary hypercholesterolemic rats. *Ann. Nutr. Metab.* 35: 191-195.
- Bobek, P., y Galbavy, S. 1999. Hypocholesteremic and antiatherogenic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rabbits. *Nahrung*. 43: 339-342.
- Bohn, J. A., y BeMiller, J. N. 1995. (1,3)- $\beta$ -D-glucans as biological response modifiers: a review on structure-functional activity relationships. *Carbohydr. Polym.* 28: 3-14.
- Breene, W. M. 1990. Nutritional and medicinal value of speciality mushrooms. *J. Food Protection*. 53: 327-329.

- Burns, P. J., Yeo, O., Keshavarz, T., Roller, S., y Evans, C. S. 1994. Physiological studies of exopolysaccharide production from the basidiomycetes *Pleurotus sp.* Florida; effect of C source and N source on polysaccharide production for potentials as a hypocholesterolemic, antitumor and a fat mimetic. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 566-572.
- Cañas, R. 1998. Alimentación y nutrición animal. En: Alimentación y nutrición animal. Facultad de Agronomía. Pontificia Universidad Católica de Chile. Chile. pp: 551.
- Chang, R. 1996. Functional properties of edible mushrooms. *Nutr. Rev.* 54: S91-S93
- Chang, S. T., y Miles, P. G. 2004. The nutritional attributes of edible mushrooms. En: Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. 2nd Edition. (ed) S.T. Chang y P. G. Miles. CRC, USA. pp: 27-37.
- Cho, E. J., Oh J. Y., Chang, H. Y., Yun, J. W. 2006. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. *J Biotechnol* 127:129–140.
- Cohen, R., Persky, L., y Hadar, Y. 2002. Biotechnological applications and potencial of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 582-594.
- Croan, S. C. 2000. Conversion of wood waste into value-added products by edible and medicinal *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. Species (Agaricales s.l., Basidiomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms.* 2: 73-80.
- Croan, S. C. 2004. Conversion of conifer wastes into edible and medicinal mushrooms. *Forest Prod. J.* 54: 68-76.
- Dikeman, L. C., Bauer, L. L., Flickinger, E., y Fahey C. G. Jr. 2005. Effects of stage of maturity and cooking on the chemical composition of select mushroom varieties. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1130-1138.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry.* 28: 350-356.

- Eichlerová-Voláková, I., y Homolka, L. 1997. Variability of ligninolytic enzyme activities in basidiocarpo isolates of the fungus *Pleurotus ostreatus* in comparison with that of protoplast-derived isolates. *Microbiol.* 42: 583-588.
- Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Asatiani, M., y Kvesitadze, G. 2006. Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme Microb. Technol.* 38: 998-1004.
- Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Kharziani, T., y Kvesitadze, G. 2008. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulotyc enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresour. Technol.* 99: 457-462.
- Falade, S. O., Adepoju, O. O., Owoyomi, O., y Adewusi, R. S. 2008. Chemical composition and toxic trace element composition of some Nigerian edible wild mushrooms. *Int. J. Food Sci. Tech.* 43: 24-29.
- Firenzuoli, F., Gori, L. y Lombardo, G. 2008. The medicinal mushroom *Agaricus blazei murrill*: review of literature and pharmaco-toxicological problems. *Oxford J.* 5: 3-15.
- Friel, M. T. y McLoughling. 2000. Production of a liquid inoculum spawn of *Agaricus bisporus*. *Biotechnol. Lett.* 22: 351-354.
- Fukushima, M., Nakano, M., Morii, Y., Ohashi, T., Fujiwara, Y. y Sonoyama, K. 2000. Hepatic LDL receptor mRNA in rats is increased by dietary mushroom (*Agaricus bisporus*) fiber and sugar beet fiber. *J. Nutr.* 130: 2151-2156.
- Gaitán, H. R., Mata, G. y Salomones, D. 2007. Cómo llegar a la certificación de calidad el inóculo para la producción de *Pleurotus* spp. En: *El Cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. 1ra. Edic. Editores J. E. Sánchez V., D. Martínez C., G. Mata y H. Leal. ECOSUR, México. pp: 73.
- Gern, R. M. M., Wisbeck, E., Rampinelli, J. R., Ninow, J. L. y Furlan, S. A. 2008. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresour. Technol.* 99: 76-82.

- Gregori, A., Svagelj, M., y Pholeven, J. 2007. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technol. Biotechnol.* 45: 236-247.
- Guillén-Navarro, G. K., Márquez-Rocha F. J., y Sancezh-Vázquez J.E. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Rev. Iberoam. Micol.* 15: 302-306.
- Gunde-Cimerman, N. 1999. Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (Agaricales s. l., Basidiomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms.* 1: 69-80.
- Herrera, T. M., y Ulloa, M. 1990. El reino de los hongos. En: *Micología básica aplicada*. UNAM FCE. México. pp: 552.
- Hernández, D., Sánchez, J. E. y Yamasaki, K. 2003. A simple procedure for preparing substrate for *Pleurotus ostreatus* cultivation. *Bioresour. Technol.* 90: 145-150.
- Hu, S.-H., Wang, J. C., Lien, J.-L., Liaw, E.-T. y Lee, M.-Y. 2006. Antihyperglycemic effect of polysaccharide from fermented broth of *Pleurotus citrinopileatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 102-106.
- Jacinto, E. O. y Burrola, A. C. 2007. Comparación de dos inóculos comerciales de *Pleurotus ostreatus* en el Estado de México. En: *El Cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. 1ra. Edic. Editores J. E. Sánchez V., D. Martínez C., G. Mata y H. Leal. ECOSUR, México. pp: 65.
- Jong, S. C., y Donovick, R. 1989. Antitumor and antiviral substances from fungi. *Adv. Appl. Microbiol.* 34: 183-261.
- Jose, N., Ajíth, T. A., y Jananrdhanan, K. K. 2002. Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of culinary-medicinal mushroom *Pleurotus pulmonarius*. *Int. J. Med. Mushrooms.* 4: 329-335.
- Kim, S. W., Hwang, H. J., Park, J. P., Cho, Y. J., Song, C. H. y Yun, J. W. 2002. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 56-61.
- Kim, H. O., Llim, J. M., Kim, S. W., Hwang, H. J., Choi, J. W. y Yun, J. W. 2005. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresour Technol.* 96:1175-1182.

- Kües, U., y Liu, Y. 2000. Mini-review: Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 141-152.
- Lee, B. C., Bae, J. T., Pyo, H. B., Choe, T. B., Kim, S. W., Hwang, H. J., y Yun, J. W. 2003. Biological Activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme. Microb. Technol.* 32: 574- 581.
- Li, J., Li, P., y Liu, F. 2008. Production of theanine by *Xerocomus badius* (mushroom) using submerged fermentation. *LWT-Food Sci Technol.* 41:883-889.
- Lindequist, U., Timo, H. J. N., y Wolf-Dieter, J. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *Oxford J.* 2: 285-299.
- Malinowska, E., Krzyczkowski, W., Herold, F., Lapienis, G., Slusarczyk, J., Suchocki, P., Kuras, M., y Turlo, J. 2009. Biosynthesis of selenium-containing polysaccharides with antioxidant activity in liquid culture of *Hericium erinaceum*. *Enzyme Microb Technol.* 44: 334-343.
- Márquez-Rocha, F. J., Guillén, G. K., Sánchez, J. E., y Vázquez-Duhalt, R. 1999. Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors. *Biotechnol. Tech.* 13: 29-32.
- Martínez-Carrera, D. 1989. Simple technology to cultivate *Pleurotus* on coffee pulp in the tropics. *Mushroom Sci.* 12(Part II):169-178.
- Martínez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M., y Martínez, W. 2007. México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción-consumo de los hongos comestible. En: *El cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. 1ra. Edición. Editores J. E. Sánchez V., D. Martínez C., G. Mata y H. Leal. ECOSUR, México. pp: 209-224..
- Mata, G., y Savoie, J. M., 1998. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 1-7.
- Mattha, P., Könkö, K., Eurola, M., Pihlava, J. M., Astola, J., Vahteriso, L., Hietaniemi, V., Kumpulainen, J., Valtonen, M., y Piironen, V. 2001. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J. Agric. Food. Chem.* 49: 2343-2348.

- McCarty, M. 1978. Parte 4: Infecciones bacterianas y micóticas. En: *Tratado de microbiología*. 2da. Edición (ed) D. B. Davis, R. Dulbecco, N. H. Eisen, S. H. Ginsberg, W. B. Wood Jr. Y M. McCarty. Salvat Editores, España. pp. 988.
- Mikhailova, M. V., Feofilova, E. P., Shumskaya, G. G., y Shevtsov, V. K. 1993. Change in lipid composition during cytodifferentiation of Agaricales fungi. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 29: 315-320.
- Mora, V. M. y Martínez, C. D. 2007. Investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas *Pleurotus* en México. En: *El Cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. 1ra. Edición. Editores J. E. Sánchez V., D. Martínez C., G. Mata y H. Leal. ECOSUR, México. pp: 7,8, 16-20.
- Murrieta-Hernández, D. M., Mata, G., y Iglesias-Andreu, L. G. 2002. Cambios en la producción de lacasa por el hongo *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. cultivado en pulpa de café en confrontación con *Trichoderma viride* Pers., un moho contaminante. *Foresta Veracruzana* 4, 47–52.
- Novak, M y Vetvicka, V. 2008.  $\beta$ -Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action. *Journal of Immunotoxicology*. 5:47-57.
- Obodai, M., Cleland-Okine, J., y Vowotor, K. A. 2003. Comparative study of the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* on different lignocellulosic by products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 146-149.
- Ooi, V. E., y Liu, F. 1999. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. *Int. J. Med. Mushrooms*. 1: 195- 206.
- Ooi, V. E., y Liu, F. 2000. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide–protein complexes. *Curr. Med. Chem.*7: 715–729.
- Opletal, L. 1993. Phytoterapeutic aspects of diseases of the circulatory system. 2. The oyster mushroom and this potential use. *Ceskoslovenska Farmacie*. 42: 160-166.
- Parikh, P., McDaniel, M. C., Ashen, D., Miller, J., Sorrentino, M., Chan, V., Blumenthal, R. S., Sperling, L. S. 2005. Diets and cardiovascular disease: an evidence-based assessment. *J. of the American College of Cardiology*. 45: 1379–1387.
- Peréz, L. A. B, y Marvan, L. L. 2001. Verduras. En: *Sistema Mexicano de alimentos equivalentes*. (ed) GRA Rodríguez Impresores, S. A. d e C.V. México. pp: 11

- Pínheiro, F., Faria, R. R, de Camargo, J. L. V, Spinardi Barbisan, L. F. 2003. Chemoprevention of preneoplastic liver foci development by dietary mushroom *Agaricus blazei* Murril in the rat. *Food. Chem. Toxicol.* 41: 1543- 1550.
- Ragunathan, R., y Swaminathan, K. 2003. Nutricional status of *Pleurotus* spp. grown on various agro-wastes. *Food Chem.* 80: 371-375.
- Rajarathnam, S. y Bano, Z. 1991. Biological utilization of edible fruiting fungi. En: *Handbook of applied mycology*. Vol. 3 (ed) D. K. Arora, K. G. Mukerji, y E. H. Marth. Marcel Dekker, USA. pp: 241-192.
- Ramírez, C. R., Hernández, V. O., Galván, P. F. y Leal, L. H. 2007. Productividad de cepas híbridas de *Pleurotus* x *Lentinula*. En: *El Cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. 1era. Edición (ed) V. J. E. Sánchez, C. D. Martínez, G. Mata y L. Leal. ECOSUR, México. pp: 55.
- Reddy, G. V., Ravindra Babu, P., Komaraiah, P., Roy, K. R. R. M., y Kothari, I.L. 2003. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochem.* 38: 1457-1462.
- Reshetkinov S.V., Wasser S. P., y Tan K. K. 2001. Higher basidiomycetes as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides (review). *Int. J. Med. Mushrooms.* 3: 361-394.
- Rosado, F. R., Germano, S., Carbonero, E. R., da Costa, S. M. G., Iacomini, M., y Kimmelmeier, C. 2003. Biomasa and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* "florida" (Jack.: Fr.) Kummer. *J. Basic Microbiol.* 43: 230-237.
- Royse, D. J. 1997. Speciality mushroom: consumption, production and cultivation. *Revista Mexicana de Micología.* 13: 1-11.
- Royse, D. J., Rhodes, T. W., Ohga S., y Sanchez J. E. 2004. Yield, mushroom size and time to production of *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) grown on switch grass substrate spawned and supplemented at various rates. *Bioresour. Technol.* 91: 85–91.

- Salmones, D., y Mata, G. 2002. Detection of extracellular enzymes produced by *Pleurotus* spp. grown on coffee pulp. En: *Mushroom Biology and Mushroom Products*. (ed) J. E. Sánchez, G., Huerta y Montiel, E. Universidad Autónoma de Morelos, Cuernavaca México. pp: 213-219.
- Salmones, D., Mata, G. y Gaitán, H. R. 2007. Aportaciones del sector académico en la producción del inóculo de *Pleurotus* spp. En: *El Cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. 1ra. Edición. Editores J. E. Sánchez V., D. Martínez C., G. Mata y H. Leal. ECOSUR, México. pp: 41.
- Salmones, D., Mata G., y Waliszewski, N. F. 2005. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource Technology*. 96: 537-544
- Sánchez, J. E. y Royse, D. 2001. Generalidades sobre los hongos con énfasis en los basidiomicetos. En: *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* 1ra. Edic. Editores J. E. Sánchez y D. Royse. Editorial Limusa, México. pp: 29-32, 54.
- Sánchez, V. J. E., Martínez, C. D., Mata, G. y Leal, L. E. 2007. El Cultivo de setas *Pleurotus* spp. en México. En: *El Cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. 1ra. Edición. Editores J. E. Sánchez V., D. Martínez C., G. Mata y H. Leal. ECOSUR, México. pp: 3.
- Sánchez, C., Sainos, E., Díaz, Godínez, G., y Loera, O. 2005. Mycelial growth of *Pleurotus ostreatus* on different types of inoculum. *Agro Food industry hi-tech*. 5:14-16.
- Sarikaya, A., y Ladish, M. R. 1997. Mechanism and potencial applications of bioligninolytic systems in a CELSS. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 62:131-149.
- Savoie, J. M. 1998. Changes in enzyme activities during early growth of the edible mushroom, *Agaricus bisporus*, en compost. *Mycol. Res*. 102: 1113-1118.
- Silva, S. O., Costa, S. M. G. y Clement, E. E. 2002. Chemical composition of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel., substrates and residue after cultivation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 45: 531-535.

- Smith, J. E., Rowan, N. J., y Sullivan, R. 2002. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnol. Lett.* 24: 1839-1845.
- Sobal, M., Morales, P., Bonilla, M., Huerta, G. y Martínez, C. D. 2007. El centro de recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) Del Colegio de Postgraduados. En: *El Cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. 1era. Edición (ed) V. J. E. Sánchez, C. D. Martínez, G. Mata y L. Leal. ECOSUR, México. pp: 27.
- Solomon, E. P., Berg, L. R. y Martin, D. W. 1999. En: *Biología*. 5ta. Edición. Mc Graw-Hill Interamericana, México. pp: 12-14; 530-545.
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S. P., Nevo, E., y Hadar Y. 2007. Basidiomycetes lacasse and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme Microb. Technol.* 41: 57-61.
- Soto, V. C. 2007. El desarrollo del cultivo de setas en Jalisco. En: *El Cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. 1era. Edición (ed) V. J. E. Sánchez, C. D. Martínez, G. Mata y L. Leal. ECOSUR, México. pp: 98.
- Stajić, M., Persky, L., Friesem, D., Haddar, Y., Wasser, S.P., Nevo, E., y Vukojrić, S.P. 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on lacasse and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme Microb. Technol.* 38:65-73.
- Stamets, P. 2000. Growing gourmet and medicinal mushrooms. En: *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Ten speed Press. USA. pp: 150.
- Sudweeks, E. M., Ely, L. O., Mertens, D. R., y Sisk, L. R. 1981. Assessing Minimum Amounts and Form of Roughages in Ruminant Diets: Roughage Value Index System. *J Anim Sci.* 53:1406-1411.
- Suutari, M. 1995. Effect of growth temperature on lipid fatty acids of four fungi (*Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, and *Trichoderma reesei*). *Archives of Microbiol.* 164: 212–216.
- Suutari, M., Liukkonen, K., y Laakso, S. 1990. Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. *J. General Microbiol.* 136: 1469-1474.

- Suutari, M., y Laakso, S. 1994. Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Critical Reviews In Microbiol.* 20: 285–328.
- Valencia del Toro, G., Tepechco, M. A., Ramírez, R. y Leal, H. 2007. Productividad de cepas híbridas del genero *Pleurotus*. En: *El Cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. 1era. Edición (ed) V. J. E. Sánchez, C. D. Martínez, G. Mata y L. Leal. ECOSUR, México. pp: 45.
- Wang, D., Sadoka, A., y Suzuki, M. 2001. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresour. Technol.* 78: 293-300.
- Wang, J. C., Hu, S. H., Liang, Z. C., y Yeh, C. J. 2005. Optimization for the production of water- soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 759-766.
- Wasser, S. P., y Weis, A. L. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). *Int. J. Med. Mushrooms.* 1: 31-62.
- Watanabe, A., Kobayashi, M., Hayashi, S., Kodama, D., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Tamesada, M., y Yagi, K. 2006. Protection against D-galactosamine-induced acute liver injury by oral administration of extracts from *Lentinus edodes* mycelia. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1651-1654.
- Xu, Chun- Ping, Kim, Sang-Woo, Hwang, Hye- Jin, Choi, Jang- Won, Yun, y Jong- Won. 2003. Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240. *Process Biochem.* 38: 1025-1030.
- Yang, F. C., y Liao, C. B. 1998. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidium* in submerged cultures. *Process Biochem.* 33: 547-553.
- Yildiz, A. Karakaplan, M. y Aydin, F. 1998. 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 Chemistry.* 61:127-130.

- Yildiz, S., Yildiz, Ü. C., Gezer, E. D., y Temiz, A. 2002. Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. *Process Biochem.* 38: 301-306.
- Zhuo, S., y Gao, Y. 2002. The immunomodulating effects of *Ganoderma lucidium*. *Int. J. Med. Mushrooms.* 4: 1-11.

## Anexo

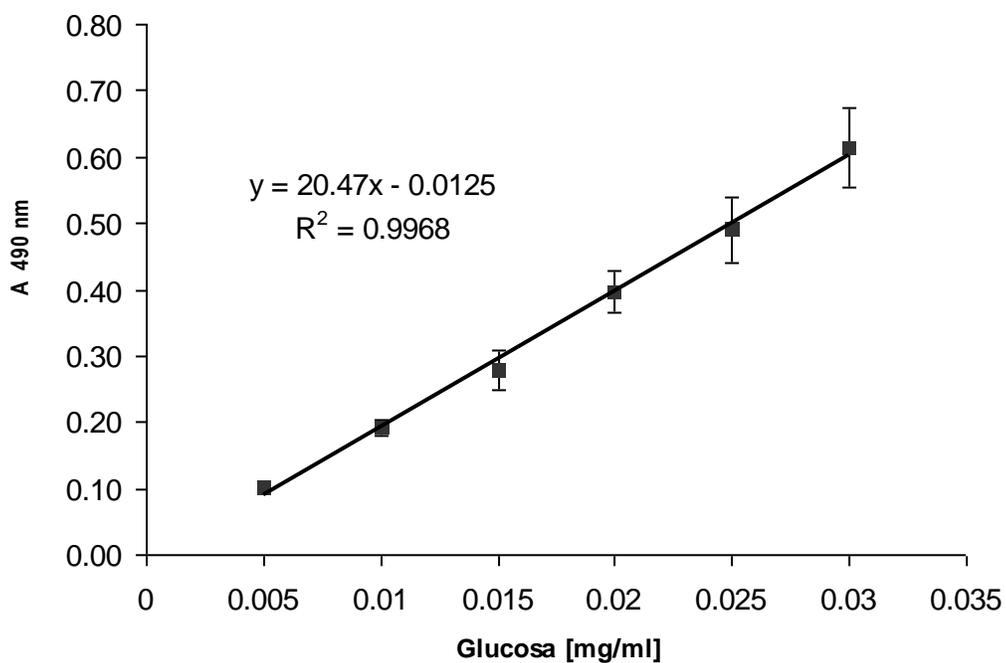


Figura 7. Curva de calibración para cuantificar polisacáridos, absorbancia medida a 490 nm, n = 3.

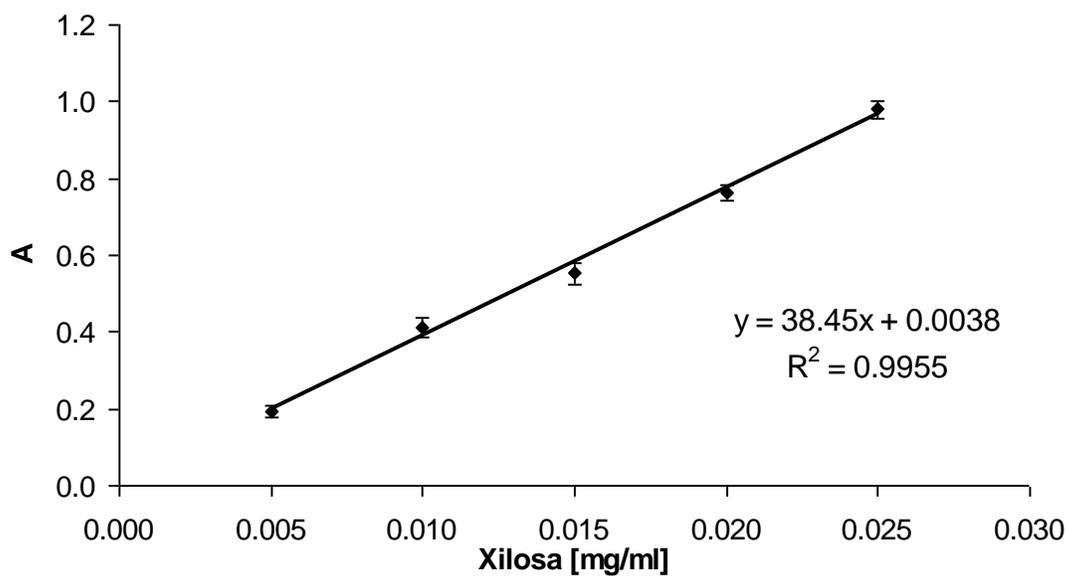


Figura 8. Curva de calibración para cuantificar polisacáridos, absorbancia medida a 480 nm, n = 3.