



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Presentada para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

por

Alma Luz Molina Garcia
Ingeniera Bioquímica

“Producción de polisacáridos de extractos crudos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp.
y su evaluación biológica.”

Dirigida por:

Dr. Gustavo Valencia del Toro
M. en C. María Eugenia Garín Aguilar

México, D.F. 29 de Julio de 2013.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 12:00 horas del día 26 del mes de JUNIO del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de La UPIBI-IPN, para examinar la tesis titulada:

"Producción de polisacáridos de extractos crudos de cuerpos fructíferos de Pleurotus spp. y su evaluación biológica."

Presentada por la alumna:

<u>MOLINA</u> Apellido paterno	<u>GARCIA</u> Apellido materno	<u>ALMA LUZ</u> Nombre(s)
Con registro:		
B	1	1
0	4	3
	3	3

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dr. Gustavo Valencia del Toro

Co-Director de tesis

M. en C. María Eugenia Garín Aguilar

Dr. Fabián Robles Martínez

Dr. Ramón Villanueva Arce

Dr. Jorge Vázquez Fernández



EL PRESIDENTE DEL COLEGIO INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Dra. Guadalupe Ramírez Sotelo

UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

"Yo declaro que esta tesis, así como lo resultados en ella reportados son productos de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita."



IBQ. Alma Luz Molina Garcia

Vo. Bo.



Dr. Gustavo Valencia del Toro



M. en C. Maria Eugenia Garin Aguilar



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 26 del mes de Junio del año 2013, la que suscribe IBQ. Alma Luz Molina Garcia alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos, con número de registro B110433, adscrito(a) a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Gustavo Valencia del Toro y codirección M.C. María Eugenia Garín Aguilar y cede los derechos del trabajo titulado “Producción de polisacáridos de extractos crudos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp. y su evaluación biológica”; al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones gvalencia@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

IBQ. Alma Luz Molina Garcia

ÍNDICE

RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Generalidades de los hongos.....	1
1.2. El género <i>Pleurotus</i>	2
1.2.1. Composición nutricional de los hongos.....	3
1.2.2. Importancia ecológica, económica y biotecnológica de <i>Pleurotus</i>	4
1.3. Polisacáridos: características y usos.....	5
1.4. Actividad antibacteriana.....	6
1.5. Actividad antioxidante.....	8
II. ANTECEDENTES.....	10
2.1. Extracción y uso de polisacáridos de <i>Pleurotus</i>	10
2.1.1. Actividad antibacteriana de polisacáridos.....	11
2.1.2. Actividad antioxidante de polisacáridos.....	12
2.2. Antecedentes de actividad antibacteriana de extractos de polisacáridos de cepas de <i>Pleurotus</i> spp.....	13
III. JUSTIFICACIÓN.....	15
IV. OBJETIVOS.....	16
4.1. Objetivo general.....	16
4.2. Objetivos específicos.....	16
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1. Obtención de cuerpos fructíferos.....	17
5.2. Extracción de polisacáridos.....	20
5.2.1. Cuantificación de azúcares totales.....	21
5.2.2. Cuantificación de proteínas.....	22
5.3. Caracterización de polisacáridos.....	23
5.3.1. Cromatografía en capa fina (CCF).....	23
5.3.2. Espectroscopía infrarrojo.....	24
5.3.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	24
5.4. Evaluación biológica.....	24

5.4.1.	Evaluación de la actividad antibacteriana.....	25
5.4.1.1.	Determinación de halo de inhibición.....	25
5.4.1.2.	Evaluación de la concentración mínima inhibitoria.....	26
5.4.2.	Evaluación de la actividad de captación de radicales libres DPPH (1,1-diphenil-2-picrylhidrazil).....	26
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	28
6.1.	Obtención de cuerpos fructíferos.....	28
6.2.	Extractos crudos de polisacáridos.....	30
6.3.	Caracterización de polisacáridos.....	35
6.3.1.	Cromatografía en capa fina (CCF).....	35
6.3.2.	Cromatografía líquida de alta resolución.....	39
6.3.3.	Espectroscopía infrarrojo.....	42
6.3.4.	¹ HRMN.....	47
6.4.	Evaluación de actividad biológica.....	51
6.4.1.	Evaluación de la actividad antibacteriana.....	51
6.4.2.	Evaluación de la actividad de captación de radicales libres DPPH (1,1-diphenil-2-picrylhidrazil).....	54
VII.	CONCLUSIONES.....	58
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes principales de un hongo. Cuerpos fructíferos del hongo Tamasopo.....	2
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Pleurotus</i> spp. (Modificado de Martínez-Carrera, 1998).....	3
Figura 3. Enfermedades inducidas por estrés oxidativo en seres humanos (Modificada de Pham-Huy <i>et al.</i> , 2008).....	8
Figura 4. Estrategia experimental de trabajo.....	17
Figura 5. Cepa del género <i>Pleurotus</i> en medio EMA (a), inóculo grano de cepas de <i>Pleurotus</i> spp (b), sustrato paja inoculado con cepas de <i>Pleurotus</i> spp. (c), sustrato con cuerpos fructíferos de cepa Caz Rosa (d).....	18
Figura 6. Metodología para extracción de extractos crudos de polisacáridos.....	20
Figura 7. Curva patrón de glucosa obtenida por el método de Fenol sulfúrico....	31
Figura 8. Curva patrón de BSA obtenida por el método de Bradford.....	32
Figura 9. Promedio de contenido de azúcares y proteínas ten extractos crudos de polisacáridos. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas por columnas.....	33
Figura 10. CCF de estándares y muestras de extractos crudos de polisacáridos sin hidrolizar, obtenidos por reducción de volumen por evaporación. Donde (a) IE200, (b) IE201, (c) Tamasopo y (d) Caz Rosa.....	36
Figura 11. CCF de estándares y muestras de extractos crudos de polisacáridos sin hidrolizar, obtenidos por reducción de volumen por secado por aspersion. Donde (a) IE200, (b) IE201, (c) Caz Rosa y (d) Tamasopo.....	37
Figura 12. CCF de estándares y muestras de extractos crudos de polisacáridos hidrolizados, obtenidos por reducción de volumen por evaporación. Donde (a) IE200, (b) IE201, (c) Tamasopo y (d) Caz Rosa.....	38
Figura 13. CCF de estándares y muestras de extractos crudos de polisacáridos hidrolizados, obtenidos por reducción de volumen por secado por aspersion. Donde (a) IE200, (b) IE201, (c) Caz Rosa y (d) Tamasopo.....	39
Figura 14. Cromatogramas de extractos de polisacáridos sin hidrolizar.....	40

Figura 15. Cromatogramas de extractos de polisacáridos hidrolizados con H ₂ SO ₄	41
Figura 16. Cromatogramas de extracto de Caz Rosa hidrolizados con diferentes ácidos. a): H ₂ SO ₄ , b) HCl, c) TCA y d) TFA.....	42
Figura 17. Espectro infrarrojo de extractos crudos de polisacáridos concentrados por evaporación sin hidrolizar.....	43
Figura 18. Espectro infrarrojo de extractos crudos de polisacáridos concentrados por secado por aspersion sin hidrolizar.....	44
Figura 19. Espectro infrarrojo de extractos crudos de polisacáridos concentrados por evaporación hidrolizados.....	45
Figura 20. Espectro infrarrojo de extractos crudos de polisacáridos concentrados por secado por aspersion hidrolizados.....	46
Figura 21. IR de polisacárido soluble en agua unido a proteína, obtenido de cuerpos fructíferos de <i>Pleurotus sajor saju</i> (Tomado de Xia <i>et al.</i> , 2011).....	47
Figura 22. ¹ HRMN de extracto crudo de polisacárido de la cepa Caz Rosa.....	47
Figura 23. Espectro de ¹ HRMN a 400 Hz de polisacáridos aislados de tres fracciones (PC, PH y PB) de cuerpos fructíferos de <i>Pleurotus ostreatus</i> (Palacios <i>et al.</i> , 2012).....	49
Figura 24. ¹ HRMN de un hetero-polisacárido aislado de cuerpos fructíferos de <i>Ganoderma lucidum</i> (Tomado de Pan <i>et al.</i> , 2012).....	50
Figura 25. Halo de inhibición de los extractos crudos de polisacáridos sobre <i>S. typhi</i> . CE: extracto concentrado por evaporación, CSA: extracto concentrado por secado por aspersion. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas por columnas (post hoc Duncan, p<0.05).....	52
Figura 26. Curvas patrón de ácido gálico por el método DPPH a) para concentración en equivalentes de ácido gálico; b) para porcentaje de inhibición.....	54
Figura 27. Porcentaje de actividad antioxidante de los extractos crudos de polisacáridos. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas por columnas (post hoc Duncan, p<0.05).....	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del género <i>Pleurotus</i>	1
Cuadro 2. Principales componentes de los hongos del género <i>Pleurotus</i>	4
Cuadro 3. Parámetros usados en secador por aspersión.....	21
Cuadro 4. Bacterias utilizadas en la prueba de actividad antibacteriana.....	25
Cuadro 5. Valor promedio de los parámetros de productividad evaluados durante la primera cosecha de las cepas utilizadas.....	28
Cuadro 6. Valor promedio de rendimientos de extracción de extractos crudos de polisacáridos de las cepas trabajadas.....	30
Cuadro 7. Promedio de contenido de azúcares y proteínas en extractos crudos de polisacáridos.....	33
Cuadro 8. Valores de Rf para estándares y muestras de extractos crudos de polisacáridos, sin hidrolizar e hidrolizados.....	35
Cuadro 9. Tiempo de retención de cromatogramas de estándares.....	40
Cuadro 10. Propuesta de asignación de ¹ H RMN para los residuos de tres fracciones de polisacáridos aislados de <i>Pleurotus ostreatus</i> con desplazamientos químicos aislados.....	50
Cuadro 11. Promedio de halos de inhibición de los extractos crudos de polisacáridos sobre la bacteria <i>S. typhi</i>	51
Cuadro 12. Promedio de porcentaje de inhibición y concentración de ácido gálico en extractos crudos de polisacáridos.....	55

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio Bioconversiones de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI) del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Gustavo Valencia del Toro y Co-Dirección de la M. en C. María Eugenia Garín Aguilar. Se contó con el apoyo de la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN, a través del proyecto SIP 20131354, del CONACYT: CB-2008-105683 y del ICYTDF: PICS012-096.

Además se contó con el apoyo Beca PIFI durante tres semestres, por los proyectos SIP con número de clave 20110977 y 20121790.

A Emma

Te dedico este trabajo con todo mi amor, gracias por formar parte de mí; fuiste, eres y serás de las cosas más bellas de mi vida. Fué poco el tiempo que tuve la dicha de tenerte cerca de mí. Gracias por la enseñarme a ser fuerte, contigo aprendí y seguiré aprendiendo, aunque ya no estés físicamente, estás presente espiritualmente.

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas, son muchas las personas a las que agradezco su apoyo, amistad, ánimo y compañía. Algunos están aún conmigo, otras siguen en mis pensamientos y ocupando un espacio especial en mi corazón; a ellos espero, si existe otra vida verlos nuevamente. Mientras eso pasa, gracias por formar parte de mi vida, porque a pesar de que algunos partieron muy pronto dejaron grandes enseñanzas.

Al creador de todas las cosas, el que me ha dado fortaleza para continuar cuando parece ser imposible, porque gracias a los momentos difíciles he aprendido a valorar lo que tengo, y gracias a los momentos felices es que continué aquí.

A mi familia: a mi mamá Irene, mi tía María, primos, tios, hermanos, sobrinos, en fin a toda la familia, por el apoyo que me han dado en todo momento. Por los sentimientos, hábitos y valores, que me han inculcado. Y por enseñarme que se pueden lograr las cosas con esfuerzo y dedicación. Gracias por ayudarme a ser fuerte, cuando parecer ser es imposible.

A mi amigas y compañeras: Nidiyare, Sandra, Lizbeth, Camelia por ser grandes personas, porque de todas he aprendido. Gracias por que han estado conmigo cuando ha sido necesario, y sobre todo espero que nuestra amistad se conserve.

Al Dr. Gustavo Valencia del Toro, por su comprensión, por el apoyo no solo en la parte académica sino también en lo personal. Es un gran profesor, pero sobre todo una gran persona.

A las personas que hicieron posible que se realizará este trabajo satisfactoriamente, gracias por tomarse el tiempo para revisar y aportar. Especialmente los revisores de Tesis: al Dr. Gustavo Valencia del Toro, M. en C. María Eugenia Garín Aguilar, Dr. Jorge Yañez Fernández, Dr. Ramón Villanueva Arce y al Dr. Fabián Robles Martínez.

A todas las personas que me ayudaron con la realización de algunas técnicas, por los tips y por el tiempo dedicado, M. en C. Teresita, M. en C. Leticia, entre otros.

RESUMEN

El aislamiento y uso de polisacáridos obtenidos de hongos del género *Pleurotus* se ha intensificado debido su actividad como antioxidante, antibacteriano, antitumoral, antiviral, antitrombótico, sus efectos inmunomoduladores, entre otros. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antioxidante y antibacteriana de extractos crudos de polisacáridos de cepas del género *Pleurotus*. Se realizó el cultivo en sustrato paja y la obtención de cuerpos fructíferos de cuatro cepas del género *Pleurotus*: IE200, IE201, Caz Rosa y Tamasopo. Los cuerpos fructíferos se secaron y molieron para obtener extractos crudos de polisacáridos a los que se les cuantificó azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico y el contenido de proteínas por el método de Bradford. Se evaluó actividad antibacteriana (Kirby Bauer y CMI) y antioxidante (DPPH) de los extractos crudos de polisacáridos. Posteriormente, los extractos crudos de polisacáridos fueron hidrolizados, para caracterizarlos por Cromatografía en Capa Fina (CCF), Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Espectroscopía Infrarrojo (IR) y Resonancia Magnética Nuclear (¹HRMN). No hubo diferencias estadísticas significativas para la Eficiencia Biológica (%EB), Tasa de Producción (%TP), y Rendimiento (%R), pero si para el Peso Medio de las cuatro cepas trabajadas. La CCF indicó que los extractos crudos de polisacáridos, tienen entre sus componentes manosa, xilosa, arabinosa, maltosa y celobiosa. Los extractos crudos de polisacáridos, mostraron halos de inhibición sobre la cepa bacteriana *Salmonella typhi*. Los extractos que presentaron mayores halos de inhibición fueron los concentrados por evaporación (CE), Tamasopo CE (8.98 mm), IE200 CE (8.29 mm); seguidos de los extractos crudos de polisacáridos concentrados por secado por aspersion (CSA): IE200 (7.54 mm), IE201 (7.73 mm), Tamasopo (7.26 mm) y Caz Rosa (6.79 mm). La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos probados fue mayor a 12 mg/mL. Todos los extractos crudos de polisacáridos presentaron efecto antioxidante que va desde 63 % hasta 84 %, y una concentración en equivalentes de ácido gálico de 0.24 a 0.34 mg/mL

ABSTRACT

The isolation and use of polysaccharides of mushrooms of genus *Pleurotus* has increased because these compounds have antioxidant, antibacterial, antitumor, antiviral, antithrombotic and immunomodulatory effects. The aim of the present study was to evaluate the antibacterial and antioxidant activity of crude extracts from polysaccharides of *Pleurotus* spp. strains. Four strains of mushrooms (IE200, IE201, Caz Rosa and Tamasopo) were cultivated on straw substrate and the fruiting bodies were obtained. Fruiting bodies were dried and milled to obtain crude extracts from polysaccharides, the total sugars were quantified by the phenol-sulfuric method and protein content by the Bradford method. With crude extracts of polysaccharides, antibacterial activity was evaluated (Kirby-Bauer and MIC) and antioxidant activity by DPPH. Subsequently, the crude extracts of polysaccharides were hydrolyzed and characterized by Thin Layer Chromatography (TLC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Infrared Spectroscopy (IR) and Nuclear Magnetic Resonance (1H NMR). Statistically significant differences were not obtained with respect to Biological Efficiency (%EB), Production Rate (%TP) and Yield (%R), however for the Mean Weight (PM) significant differences were obtained in four strains worked. TLC indicated that in crude extracts of polysaccharides were presented the following components: mannose, xylose, arabinose, maltose and cellobiose. Crude extracts of Polysaccharides showed inhibition zones on the bacterial strain *Salmonella typhi*: Tamasopo CE (8.98 mm), IE200 CE (8.29 mm), followed by crude extracts of polysaccharides obtained by spray-drying: IE200 (7.54 mm), IE201 (7.73 mm), Tamasopo (7.26 mm) and Caz Rosa (6.79 mm). The minimum inhibitory concentration (MIC) of the extracts tested was greater than 12 mg/mL. All crude extracts of polysaccharides showed antioxidant activity ranging from 63% to 84% and a concentration of gallic acid equivalents of 0.24 to 0.34 mg/mL.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de los hongos

Los hongos son organismos eucarióticos, desprovistos de clorofila, no poseen tallo, raíces ni hojas, ni han desarrollado un sistema vascular, se reproducen sexual y asexualmente, sus estructuras somáticas, ramificadas y filamentosas, están rodeadas por paredes celulares constituidas químicamente por polisacáridos, proteínas, lípidos y otras sustancias (Andrews y Harris, 2007; Feofilova, 2004; Alexopolus y Mins, 1985).

Los hongos Eumycota (hongos verdaderos), han sido ampliamente estudiados, debido a la facilidad de obtener cultivos puros, obteniendo grandes cantidades y tasas de crecimiento, lo que los hace atractivos para investigaciones científicas, este grupo se divide de acuerdo a las características de las esporas sexuales y de los cuerpos fructíferos, en: Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota y Deuteromycota (Feofilova, 2004; Carlile *et al.*, 2001). Dentro de los Basidiomycota se encuentra el género *Pleurotus* cuya clasificación taxonómica se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del género *Pleurotus*.

Clasificación	Nombre
Reino	<i>Fungi</i>
División	<i>Basidiomycota</i>
Clase	<i>Basidiomycetes</i>
Orden	<i>Agaricales</i>
Familia	<i>Pleurotaceae</i>
Género	<i>Pleurotus</i>
Especie	<i>Pleurotus</i>

Fuente Kirk *et al.*, (2001).

1.2. El género *Pleurotus*

Las raíces etimológicas del género *Pleurotus* vienen del griego *pleurá* o *pleurón*, costado o lado y del latín *otus*, oreja; es decir hongo oreja u hongo ostra, es conocido como hongo comestible, crece en los bosques de zonas montañosas y se cultiva en regiones templadas y subtropicales. Produce basidiosporas, como resultado de la plasmogamia, la cariogamia y la meiosis. Las basidiosporas se producen en los basidios de los cuerpos fructíferos (Figura 1), son estructuras reproductivas altamente organizadas, también conocidos como basidiocarpos, los cuales contienen laminillas verticales que se extienden desde la parte superior del “pie” hasta el borde del “sombbrero” (Alexopolus y Mins, 1985). El micelio de los basidiomicetos está formado por hifas que penetran en el sustrato y absorben el alimento.

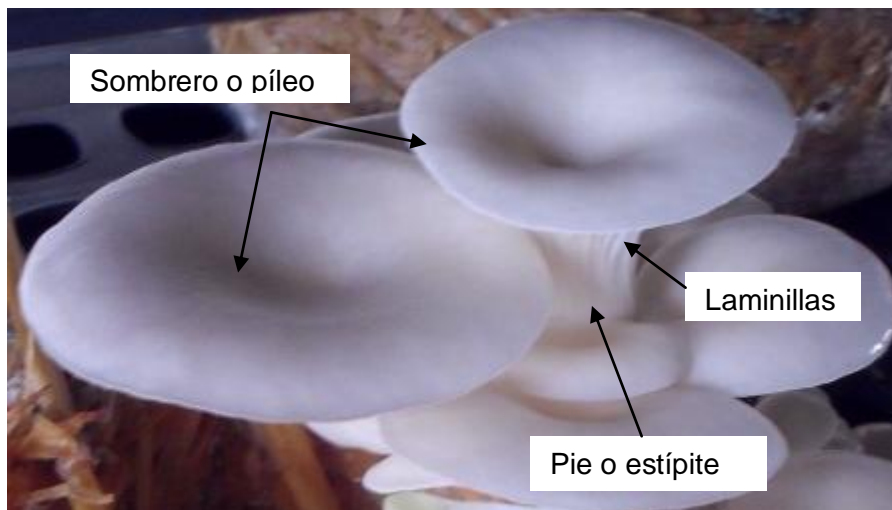


Figura 1. Partes principales de un hongo. Cuerpos fructíferos del hongo Tamasopo.

La germinación de una basidiospora (Figura 2), produce el desarrollo de hifas filamentosas monocarióticas y haploides las cuales al ramificarse forman al micelio, este continúa creciendo (de forma monocariótica), hasta llegar a la plasmogamia con otro micelio contiguo que sea sexualmente compatible. Cuando las células se fusionan, el septo o doliporo, que permanecía cerrado para evitar el intercambio intranuclear se abre para que ocurra la migración nuclear y después la formación de micelio secundario dicariótico por división conjugada simultánea de los dos núcleos iniciales y la distribución de los pares de núcleos hermanos

compatibles o dicarion en las células hijas. Una vez que se ha formado el cuerpo fructífero, a partir del micelio indiferenciado generado por crecimiento vegetativo, se llevan a cabo la cariogamia y la meiosis, la meiosis da como resultado núcleos haploides (poseen de manera aislada factor de incompatibilidad) que emigran a una tétrada de esporas formadas en la parte externa del basidio, donde son liberados durante el proceso de esporulación del basidiocarpio maduro, finalmente si las basidiosporas se encuentran en condiciones ambientales apropiadas germinan produciendo micelio monocariótico y comienza nuevamente el ciclo de vida del género *Pleurotus* (Valencia del Toro, 2002; Alexopolus y Mins, 1985).

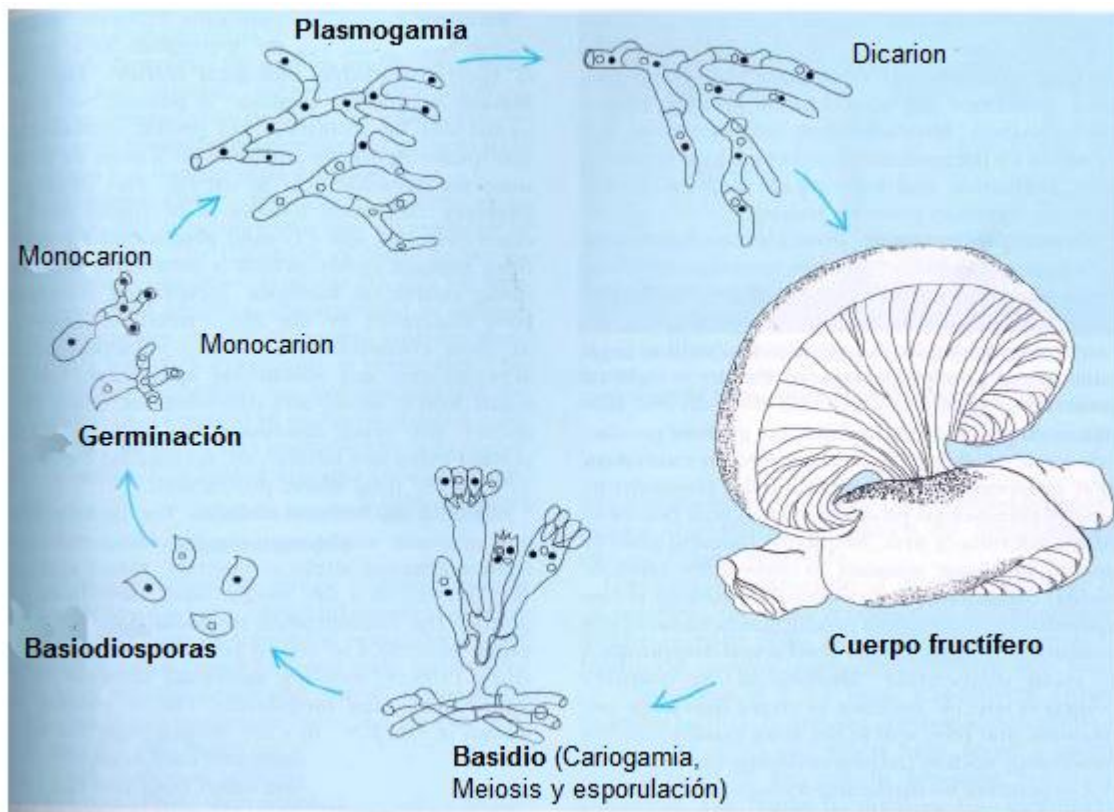


Figura 2. Ciclo biológico de *Pleurotus* spp. (Modificado de Martínez-Carrera, 1998)

1.2.1. Composición nutricional de *Pleurotus*

La composición nutricional de los carpóforos o basidiocarpos de *Pleurotus* sp., está influida por el tipo de sustrato utilizado en el cultivo, en general los hongos contienen 90 % de agua y 10 % materia seca. Ragunathan y Swaminathan (2003),

reportaron que los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp., cultivados en diferentes sustratos (tallos de algodón, rastrojo de sorgo, fibra de coco y mezcla de los anteriores), están constituidos de componentes similares (Cuadro 2).

Cuadro 2. Principales componentes de los hongos del género *Pleurotus*.

Componente	Contenido
Humedad	93.08 %
Hidratos de carbono	40.13-46.2 %
<i>Base seca</i>	
Proteína cruda	25.63-44.3 %
Nitrógeno amino	2.98-8.63 mg/g
Grasa	0.95-3.16 mg/g
Calcio	0.64-2.10 mg/g
Hierro	6.1-12.7 mg/g
Potasio	10.3 a 33.2 mg/g
Magnesio	9.40-18.8 mg/g
Sodio	0.78-1.15 mg/g
Fósforo	118 a 220 mg/g
<i>Sustancias poliméricas</i>	
Celulosa	27.4-46.2 %
Hemicelulosa	23.40-40.30 %
Lignina	14.00-20.40 %
Fibra cruda	11.40-20.48 %

Fuente Ragunathan y Swaminathan (2003).

1.2.2. Importancia ecológica, económica y biotecnológica de *Pleurotus*

Los hongos del género *Pleurotus* se consideran importantes por su sabor, valor económico y ecológico, así como por sus propiedades medicinales. El cultivo de hongos para consumo humano es un proceso biotecnológico en el cual se reciclan desechos lignocelulósicos, además genera gran cantidad de sustrato que puede ser utilizado como alimento para animales, acondicionamiento de suelo, biorremediación y nuevos cultivos de hongos. Los cultivos no convencionales en el actual sistema agrícola pueden ayudar a mejorar la situación social así como la

situación económica de los pequeños agricultores (Sánchez, 2004; Shah *et al.*, 2004; Alexopolus y Mins, 1985).

En 2007, se reportó que la importancia ecológica del cultivo de hongos comestibles, principalmente champiñón y setas (*Pleurotus*), radica en el uso y reciclaje de más de 474 000 t de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales; siendo México el mayor productor de hongos en Latinoamérica, generando alrededor de 58.9% de la producción total por lo que se ubica en el 16^o productor a nivel mundial. Se estimó que los volúmenes de producción ascienden a 47 468 t anuales de hongos frescos, además con esta actividad se generaron alrededor de 25 mil empleos directos e indirectos, dando un monto anual de operaciones comerciales que superó los 200 millones de dólares (Martínez-Carrera *et al.*, 2007).

En China, Japón y otros países asiáticos, los hongos son utilizados como medicina tradicional y alimentos funcionales; por lo que en la actualidad las setas se investigan por sus propiedades alimenticias y la posibilidad para obtener productos farmacéuticos. El interés ha crecido en torno a la obtención de componentes bioactivos a partir de hongos, por sus propiedades y usos como fuentes naturales de antioxidantes, antitumorales, antivirales, antimicrobianos y agentes inmunomoduladores. Entre los componentes bioactivos, los polisacáridos obtenidos de hongos del género *Pleurotus*, tienen gran importancia, actualmente se encuentran en investigación para tratamientos contra el cáncer. Entre los polisacáridos que componen la pared celular de los hongos, del género *Pleurotus* se encuentran la quitina y una matriz compuesta de β -glucano, α -glucano y glicoproteínas (Xu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2007).

1.3. Polisacáridos: características y usos

Los polisacáridos contienen de 1 a 5 unidades de monosacáridos, las unidades de azúcar pueden tener distintas configuraciones anómericas o estar unidas por diferentes enlaces glicosídicos y con estructuras lineales o ramificadas. Contienen una gran variedad de grupos funcionales, incluyendo grupos amino

(especialmente en polisacáridos bacterianos), grupos carboxilo (en polisacáridos que contienen ácidos urónicos, succinato de éster y grupos piruvil acetal cíclico) y variedad de enlaces de ésteres orgánicos e inorgánicos, grupos amida y éter.

Para determinar la estructura de un polisacárido, se consideran generalmente aspectos como: 1) composición de monosacáridos, 2) enlaces de varios monosacáridos constituyentes, 3) la secuencia de las unidades de monosacáridos, 4) configuraciones anoméricas, 5) presencia y ubicación de cualquier grupo sustituyente (éster, éter, acetal cíclico), 6) peso molecular medio y el grado de polidispersidad (BeMiller, 2008).

Por otro lado, la búsqueda de compuestos bioactivos ha aumentado y los hongos son candidatos potenciales, ya que contienen carbohidratos como, la quitina, hemicelulosa, grupos α -glucanos, mananos, xilanos y galactanos, que según reportes estos grupos de polisacáridos muestran actividad antibacteriana (Zhu *et al.*, 2012; He *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2006), antioxidante (Patra *et al.*, 2013; Maity *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2011; Iwalokun *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2006), antitumoral (Chen *et al.*, 2010; Tong *et al.*, 2009), anticoagulante (Telles *et al.*, 2011), prebiótica (Synytsya *et al.*, 2009), entre otras. Además de que los polisacáridos participan en diversas actividades celulares y están ligados a movimientos vitales *in vivo* las glicoproteínas y los lipopolisacáridos juegan un papel importante en el reconocimiento de células, así como en la modificación de proteínas y el proceso de transporte (Wang *et al.*, 2007).

1.4. Actividad antibacteriana

Los antibacterianos actúan contra procesos fisiológicos, estructuras y rutas bioquímicas específicas para las bacterias, por lo que se considera que no son activos contra hongos, protozoos o virus. Las bacterias se clasifican en dos grupos, las Gram (+) y Gram (-), existiendo diversidad en la fisiología y las rutas bioquímicas. Por lo que, no todos los antibióticos son activos contra todas las bacterias. Por ejemplo, la penicilina actúa en la pared celular de las bacterias inhibiendo su crecimiento, pero para el caso de las micobacterias (causantes de la

tuberculosis) cuya pared celular es más rica en lípidos y es bastante hidrofóbica, la penicilina no afectará su crecimiento. Algunas bacterias crecen en biopelículas que son poblaciones bacterianas múltiples incrustadas en una película que se une a cierta superficie y estas no pueden ser fácilmente penetradas por los antibióticos, ejemplo de estas bacterias son las del sarro dental que causan la caries (Xu y Siedlecki, 2012; Fux *et al.*, 2009; Marquez-López *et al.*, 2008; U.S. Congress, Office of Technology Assessment, 1995).

La acción de un antibiótico se mide en términos de su espectro de acción sobre las bacterias; aquellos que actúan en un sector restringido (grupos selectos de microorganismos), se les denomina de espectro limitado. Cuando es contra un mayor número de bacterias son conocidos como de amplio espectro y cuando lo hacen en un solo grupo de bacterias se les llama de espectro selectivo (Patiño, 2003).

Se ha evaluado la actividad antibacteriana de polisacáridos obtenidos de diferentes fuentes y con base en los resultados obtenidos se especula que pueden jugar un papel importante en la prevención de la descomposición y toxicidad de alimentos o para tratamiento médico, debido a la compleja relación entre la estructura nativa, conformación y funciones biológicas, los mecanismos de bioactividad funcional de los polisacáridos necesita ser más estudiada (Zhu *et al.*, 2012; He *et al.*, 2010). El modo de acción de los polisacáridos sobre las bacterias, usando microscopia electrónica, no está claro; y se ha propuesto que los polisacáridos rompen la pared celular y la membrana citoplasmática, lo que conduce a la disolución de proteínas y salida de moléculas esenciales, provocando la muerte celular, además el ADN puede ser descompuesto en partes pequeñas después de que los polisacáridos entran a la célula. Por lo que se ha reportado que los polisacáridos tienen varios objetivos de acción contra las bacterias, incluyendo la pared celular, la membrana citoplasmática y el ADN, lo que podría resultar en bacterias incapaces de desarrollar resistencia. Además debido a la estabilidad al calor y no toxicidad se ha sugerido que los polisacáridos y demás extractos de setas son fuentes potenciales para ser usados como

antimicrobianos en alimentos, sin embargo, hay poca información acerca de estos (He *et al.*, 2010).

1.5. Actividad antioxidante

Entre las principales causas que generan estrés oxidativo, se encuentran el medio ambiente (radiación), ingesta de algún contaminante o como consecuencia de nuestro metabolismo, generando moléculas dañinas conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), estas se han asociado a enfermedades como cáncer, problemas cardiacos o neurodegenerativos, desordenes autoinmunes e incluso al envejecimiento humano natural (Salmon *et al.*, 2010; Pham-Huy *et al.*, 2008; Neira, 2004). Algunas enfermedades causadas por estrés oxidativo son las siguientes (Figura 3).



Figura 3. Enfermedades inducidas por estrés oxidativo en seres humanos (Modificada de Pham-Huy *et al.*, 2008).

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. El sistema de defensa antioxidante está constituido por compuestos de naturaleza enzimática como: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, y compuestos de naturaleza no enzimática como: vitamina E, β -caroteno, vitamina C, glutatión reducido, albúmina, flavonoides y metales de transición como Se, Cu, Zn, entre otros (Ramos *et al.*, 2008).

Los mecanismos para contrarrestar el estrés oxidativo son mediante la producción de antioxidantes, ya sea generados naturalmente *in situ* (antioxidantes endógenos), o por generación externa a través de los alimentos (antioxidantes exógenos). El objetivo de los antioxidantes es neutralizar el exceso de radicales libres, para proteger a las células contra los efectos tóxicos y de contribuir a la prevención de enfermedades (Pham-Huy *et al.*, 2008). Numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos en el cuerpo humano producen radicales libres centrados en el oxígeno y otras especies reactivas de oxígeno como subproductos, los suplementos antioxidantes o productos naturales que contienen antioxidantes se pueden utilizar para ayudar a reducir el daño oxidativo (Li *et al.*, 2007).

II. ANTECEDENTES

2.1. Extracción y uso de polisacáridos de *Pleurotus*

Existen diversos reportes acerca del aislamiento y uso de polisacáridos obtenidos de cuerpos fructíferos y micelio, del género *Pleurotus*. Se ha demostrado que tienen propiedades para reducir el colesterol, además de ser utilizados como antitumoral, antiviral, antitrombótico, actividad antioxidante y por sus efectos inmunomoduladores (Jayakumar *et al.*, 2011).

En el 2006 Carbonero *et al.*, aislaron β -glucanos de cuerpos fructíferos de *P. eryngii* y de *P. ostreatoroseus*, la primera extracción con diclorometano-metanol (CHCl_3 -MeOH) y la segunda con metanol-agua (MeOH- H_2O) para eliminar los compuestos de bajo peso molecular. El residuo se sometió a extracción con agua, el extracto acuoso se concentró por evaporación y la recuperación de los polisacáridos se realizó por precipitación con etanol. Se dializaron los precipitados de *P. eryngii* y de *P. ostreatoroseus* con agua, se concentraron a presión reducida y se liofilizaron. Luego de la descongelación, las fracciones se separaron por centrifugación. En el fraccionamiento se encontró que los principales componentes de las fracciones solubles en agua contienen glucosa, manosa, galactosa y 3-O-metil-galactosa, mientras que las fracciones insolubles contienen glucosa como componente principal, con un glucano predominante.

La pureza de los polisacáridos extraídos de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*, se ve afectada por el número de extracciones y las condiciones de extracción (temperatura, proporción de agua en la materia prima y tiempo), de tal manera que algunos autores reportaron que la mayor pureza (64.1 ± 1.17 %), se obtuvo cuando las muestras se extrajeron cuatro veces, con una temperatura de 94.9 °C, relación de agua: materia prima de 22, y tiempo de 2.7 h (Sun *et al.*, 2010).

Zhang *et al.*, (2004), reportaron el aislamiento de 4 tipos de polisacáridos por extracción con agua caliente y tratamiento ultrasónico de micelios y esclerocios de *P. tuber-regium*, donde los extractos solubles en agua de esclerocios presentaron menor contenido de proteínas que los de micelios; de estos dos tratamientos de extracción, se concluyó que la extracción con agua caliente fue mejor que la

realizada por ultrasonificación, para la obtención de polisacáridos que tuvieron mayor actividad antitumoral.

Los extractos crudos de polisacáridos han sido evaluados para comprobar su actividad, prueba de ello es lo reportado por Synytsya *et al.*, (2009). La extracción de polisacáridos de estípites de *P. eryngii* y *P. ostreatus*, se realizó con agua hirviendo y una posterior extracción alcalina. Los principales componentes de las paredes celulares de las cepas mencionadas contienen ramificaciones de β -1-3-6-glucano y α -1-3-glucano lineal, y en cantidades menores otros polisacáridos, tales como α -1,4-glucano, quitina y galactomananas. Los extractos de polisacáridos obtenidos y purificados, mostraron efecto positivo como estimulante de crecimiento sobre cepas específicas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*, esta evaluación mostró diferentes características de crecimiento dependientes del extracto utilizado, teniendo mejores resultado con *P. eryngii*, con este ensayo se demostró que los extractos crudos de polisacáridos funcionan como prebióticos.

2.1.1. Actividad antibacteriana de polisacáridos

Polisacáridos obtenidos de *Lygodium japonicum* (helecho), se purificaron con una columna de celulosa DEAE 52 y se evaluó su actividad antibacteriana a una concentración de 20 mg/mL, siendo *H. anómala* y *C. albicans*, los microorganismos que presentaron mayores halos de inhibición, 36 y 33 mm respectivamente, mientras que para *E. coli*, *S. typhi*, y *Nocardia asteroides* los halos de inhibición fueron de 12, 13 y 23 mm. Además se demostró que al aumentar la concentración y purificación de los polisacáridos, estos muestran mayor actividad antibacteriana frente a los microorganismos seleccionados de una manera dependiente de la dosis. Por lo que se sugiere que los polisacáridos purificados se pueden emplear como agentes antibacterianos de amplio espectro (Li *et al.*, 2006).

En otro estudio, se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de los polisacáridos obtenidos del sustrato usado en la producción de setas, por el método de difusión

en disco. Se obtuvieron zonas de inhibición para *E. coli* (10.46 mm), *S. aureus* (9.22 mm) y *Sarcina lutea* (7.92 mm). La CMI fue de 12.5, 25 y 100 µg/mL, respectivamente (Zhu *et al.*, 2012).

Por otro lado, un polisacárido aislado a partir de caldo de *Streptomyces virginia* H03 mostró fuerte actividad antibacteriana, por lo que se sugiere que pueden ser utilizados como antimicrobianos en alimentos. Para esta prueba, se usó la técnica de difusión en disco, para determinar los halos de inhibición para diferentes bacterias *S. aureus* (38.5 mm), *B. subtilis*, (37.4 mm), *L. monocytogenes* (36.8 mm) *E. coli* (40.4) *Z. bailii*, (28.5 mm) y *C. utilis* (29.1 mm) y la concentración mínima inhibitoria fue de 15.6, 31.3, 31.3, 31.3, 125 y 125 µg/mL, respectivamente. De este estudio se indica que los posibles objetivos de acción de los polisacáridos en bacterias es la pared celular (filtración de proteínas), la membrana citoplásmica (permeabilidad de la membrana citoplasmática) y el ADN (unión a ADN), esto de acuerdo con fotos tomadas por microscopía electrónica (He *et al.*, 2010).

2.1.2. Actividad antioxidante de polisacáridos

Se purificaron polisacáridos obtenidos de *Lygodium japonicum* (helecho), con una columna de DEAE-celulosa 52 (1.6 x 30 cm). La actividad antioxidante de los extractos purificados se evaluó por diferentes técnicas; incluyendo el DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil), se usó vitamina C como patrón. Los resultados indican que los polisacáridos purificados mostraron fuerte actividad antioxidante frente a la eliminación de radicales DPPH, se notó un aumento de la capacidad antioxidante al aumentar la cantidad de muestra, de esto se obtuvo que porcentajes de actividad antioxidante de 92.5 % y 85.4 % a la dosis de 280 µg (Li *et al.*, 2006).

En el 2011 Xia *et al.*, utilizaron el método DPPH para evaluar la actividad antioxidante de un polisacárido (POP) y de complejo polisacárido-proteína soluble en agua (POPSS-a) obtenidos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* los resultados indicaron que es un buen antioxidante, con un porcentaje de actividad captadora de DPPH de 57.7 y 82.4 %, respectivamente a 8 mg/mL. La viabilidad del mecanismo antioxidante se debió a que el proteoglicano actuó como donador

de electrones y puede reaccionar con radicales libres para convertirlos en productos más estables. El proteoglicano se obtuvo por extracción con agua caliente y precipitación con etanol, el análisis por cromatografía de gases del hidrolizado sugiere la presencia de arabinosa, manosa, galactosa, glucosa y ácido galactourónico.

Cuerpos fructíferos frescos de hongo híbrido somático PCH9FB (obtenido de *Pleurotus florida* and *Calocybe indica* variedad APK2), se lavaron con agua destilada, luego se molieron y se realizó la extracción por ebullición con agua durante 6 h. El extracto acuoso se mantuvo durante la noche a 4 °C y después se filtró. El filtrado se centrifugó para obtener una solución clara, y luego se precipitó el polisacárido con etanol. El precipitado se dializó en una membrana de celulosa y se purificó por cromatografía de filtración en gel. Los polisacáridos se hicieron pasar a través de una columna de sefarosa 6B (90cm x 2.1 cm), con agua como eluyente. La actividad antioxidante se evaluó con la técnica de DPPH. Se demostró que el polisacárido tuvo un máximo de 65% de actividad captadora de DPPH a la concentración de 8 mg/mL de polisacárido. El valor de EC₅₀ fue de 6.2 para los radicales DPPH. La actividad del barrido del polisacárido aumentó de forma constante desde 2 a 8 mg/mL, mientras que para el ácido ascórbico fue de 0.5 a 2 mg/mL, lo que indica que la actividad de eliminación de polisacáridos contra el DPPH fue menor que la del ácido ascórbico (Maity *et al.*, 2011).

2.1.3. Antecedentes de actividad antibacteriana de extractos de polisacáridos de cepas de *Pleurotus* spp.

En ensayos realizados por Trejo (2011) para evaluar la actividad antibacteriana por medio de la técnica de Kirby Bauer, se utilizaron extractos crudos de polisacáridos obtenidos del cultivo líquido de las cepas parentales de *Pleurotus*, indicaron la presencia de halos de inhibición para las bacterias *Staphylococcus aureus* 2 (6.1 mm), *Klebsiella pneumoniae* (6.2 mm), *Staphylococcus aureus* 1 (9.4 mm), *Bacillus subtilis* (9.4 mm), *Enterobacter agglomerans* (6.8 mm), *Shigella dysenteriae* (8.8 mm) con el extracto de la cepa UAP9, mientras que con el

extracto de UBPO los halos de inhibición fueron de 6.2 mm para *K. pneumoniae* y *K. rhinoscleromatis* y de 6.8, 7.6, 9.2, 9.5, 14.0 mm para *E. agglomerans*, *S. aureus* 1, *S. dysenteriae*, *S. aureus* 2 y *B. subtilis*, respectivamente. Se utilizó cloranfenicol (15 µg/ disco) como blanco positivo.

Por otro lado, García (2012) utilizó los extractos crudos de polisacáridos obtenidos de cultivos líquidos de las cepas fúngicas de *Pleurotus* spp. CP253, CP253_R, IE201, IEC1, IEC2 e IEC5 para determinar los halos de inhibición de las bacterias *Escherichia coli*, *B. subtilis*, *E. agglomerans*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* 1, *S. aureus* 2, *Y. enterocolitica* y *S. dysenteriae*. El extracto de la cepa CP253_R mostró halos de inhibición de 7.0 a 8.66 mm de diámetro para casi todas las bacterias utilizadas, a excepción de *S. aureus* 1, mientras que la cepa IE201 y su híbrido IEC5 mostraron halos de inhibición de 7.0 mm y de 7.0 a 7.33 mm de diámetro respectivamente, las bacterias con halos de inhibición para el caso del extracto IE201 fueron *E. agglomerans*, *E. coli*, *S. aureus* 1, *S. aureus* 2 y *S. dysenteriae*, mientras que el extracto de la cepa IEC1 presentó halo de inhibición para las bacterias *B. subtilis*, *E. agglomerans*, *E. coli*, *S. aureus* 2 y *S. dysenteriae*.

III. JUSTIFICACIÓN

Los procesos biotecnológicos de producción de cuerpos fructíferos de hongos del género *Pleurotus*, utilizando residuos agroindustriales se han optimizado debido a la necesidad de tener una alternativa ante la demanda creciente de estos productos ya sea como alimento ó nutraceuticos. Diversos estudios han demostrado la presencia de compuestos bioactivos en cuerpos fructíferos de diversas especies de hongos, siendo especies del género *Pleurotus* de las más estudiadas. Algunos de los compuestos más importantes encontrados en especies caracterizadas de *Pleurotus*, han sido los polisacáridos, se ha demostrado que tienen propiedades para actuar como, antibacterianos, antioxidantes, entre otras. Con la finalidad de aportar conocimientos sobre la actividad biológica de los polisacáridos de hongos del género *Pleurotus*, en este estudio se utilizaron extractos crudos de polisacáridos para lo cual se plantearon los siguientes objetivos.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante y antibacteriana de extractos de polisacáridos de cepas del género *Pleurotus*.

4.2. Objetivos específicos

1. Generar el inóculo-grano o “semilla” y producir cuerpos fructíferos de cepas de *Pleurotus* spp.
2. Obtener extractos crudos de polisacáridos de los cuerpos fructíferos de cepas de *Pleurotus* spp.
3. Caracterizar extractos por cromatografía en capa fina, espectroscopía infrarrojo, cromatografía líquida de alta resolución y resonancia magnética nuclear.
4. Evaluar la actividad antibacteriana: halos de inhibición y CMI de los extractos crudos de polisacáridos obtenidos de *Pleurotus* spp.
5. Evaluar actividad antioxidante de los extractos crudos de polisacáridos obtenidos de *Pleurotus* spp.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Bioconversiones de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI), del Instituto Politécnico Nacional (IPN). La estrategia general para el desarrollo del trabajo de investigación se muestra en la Figura 4.

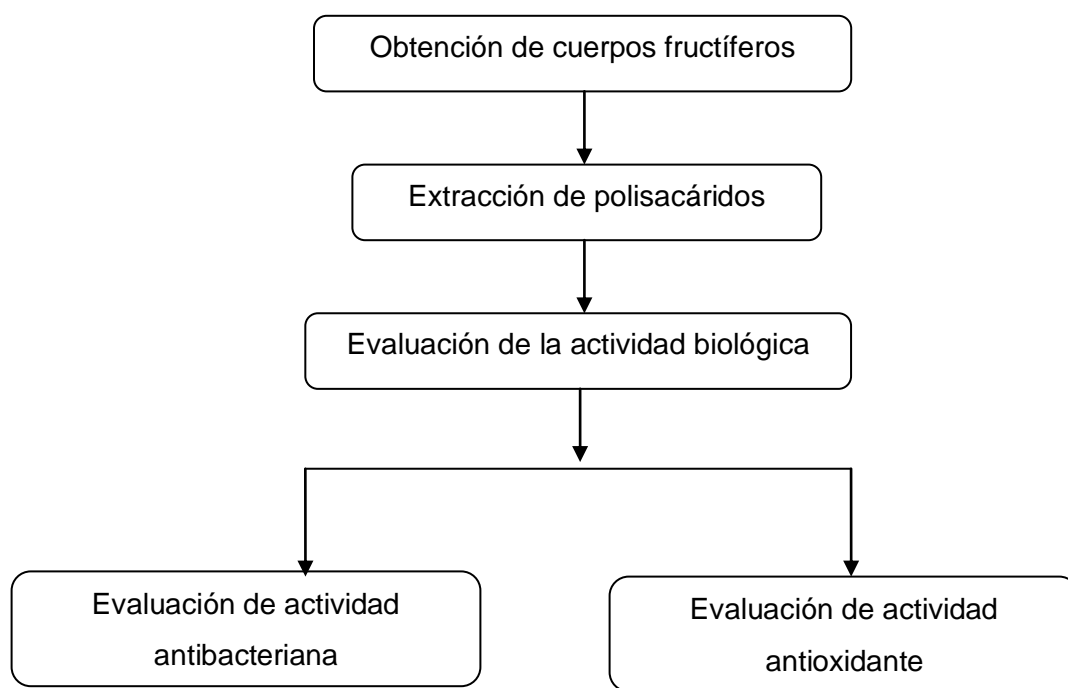


Figura 4. Estrategia experimental de trabajo.

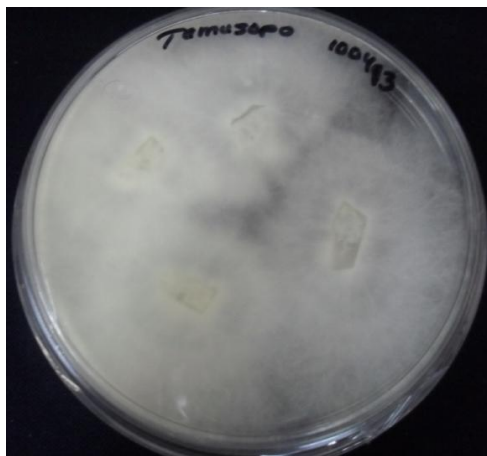
5.1. Obtención de cuerpos fructíferos

Para la obtención de cuerpos fructíferos del género *Pleurotus* se utilizaron las cepas IE200, IE201, Caz Rosa y Tamasopo, tanto el inóculo como el cultivo de carpóforos se obtuvieron de acuerdo a la metodología reportada por Valencia del Toro (2002).

Se preparó extracto de malta-agar (EMA), se agregaron 15 g de medio EMA y 20 g de agar bacteriológico por cada litro de agua destilada, el medio de cultivo se esterilizó (20 min, 121 °C y 15 lb), posteriormente el medio se dosificó en cajas Petri (10 mL por caja), una vez sólido se incubaron a 28 °C durante un día para

prueba de esterilidad. En las cajas con medio estéril se realizó la siembra de las cepas, se rotularon e incubaron a 28 °C de 7-8 días o hasta que el micelio llenara totalmente la caja Petri (Figura 5a).

Para la generación del inóculo grano, se lavaron de 3-4 Kg de trigo para eliminar residuos no deseados, luego se remojaron en agua de la llave, después de 24 h se retiró el exceso de agua. Se colocaron aproximadamente 150 g de trigo en bolsas de polipapel y se esterilizaron (40 min, 121 °C, 15 lb), posteriormente cuando el trigo se enfrió, se inoculó el micelio de media caja Petri (cortado en pequeños cuadros). Las bolsas inoculadas y rotuladas, se incubaron a 28 °C, hasta que el micelio creció en todo el grano (Figura 5b).



a)



b)



c)



d)

Figura 5. Cepa del género *Pleurotus* en medio EMA (a), inóculo grano de cepas de *Pleurotus* spp (b), sustrato paja inoculado con cepas de *Pleurotus* spp. (c), sustrato con cuerpos fructíferos de cepa Caz Rosa (d).

La paja utilizada como sustrato, se picó en trozos de 2-4 cm de longitud, posteriormente se remojó con agua de la llave. Después de 24 h se eliminó el exceso de agua y se pasteurizó con vapor durante 3 h. Después de la pasteurización, se dejó enfriar en medio estéril y se colocó en bolsas de polipapel intercalando está con el inóculo-grano (Figura 5c), hasta alcanzar un peso aproximado de 1 Kg. Las pacas se incubaron a 28 °C, en una cámara oscura, después de 5 días de la siembra las bolsas se perforaron y volvieron a incubarse, se revisaron periódicamente con el fin de checar el crecimiento de primordios, al aparecer estos últimos, las bolsas se cortaron y se pasaron a la cámara de fructificación, una vez obtenidos los cuerpos fructíferos (Figura 5d) y antes de iniciada la esporulación, se cosecharon y se secaron.

A los cuerpos fructíferos cosechados de las cuatro cepas, se les determinaron parámetros de productividad, el análisis de la varianza de los resultados se realizó con el programa estadístico SPSS versión 15 con la prueba post hoc de Duncan de una vía.

El peso promedio se determinó con la Ecuación 1 (Royse *et al.*, 2004):

$$P_m = \frac{\text{Peso total de hongos frescos cosechados(g)}}{\text{Número total de hongos}} \quad \text{Ecuación 1}$$

La eficiencia biológica (%EB) de acuerdo a la Ecuación 2 (Tchierpe y Hartmann, 1977).

$$\%EB = \frac{\text{Peso de los hongos frescos}}{\text{Peso seco del sustrato}} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

La tasa de producción (%TP) de acuerdo a la Ecuación 3 (Royse, 1989).

$$\%TP = \frac{\%EB}{\text{Tiempo total de cultivo}} * 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

El porcentaje de rendimiento (%R) de acuerdo a Ecuación 4 (Zadrazil y Kurtzaman, 1982, citado por Jiménez-Hernández, 2000).

$$\%R = \frac{\text{Peso total de hongos frescos cosechados}}{\text{Peso del sustrato húmedo}} * 100$$

Ecuación 4

5.2. Extracción de polisacáridos

El método de extracción (Figura 6) se realizó de acuerdo con los procedimientos modificados de (Wang *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2011; Synytsya *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010; Tong *et al.*, 2009).

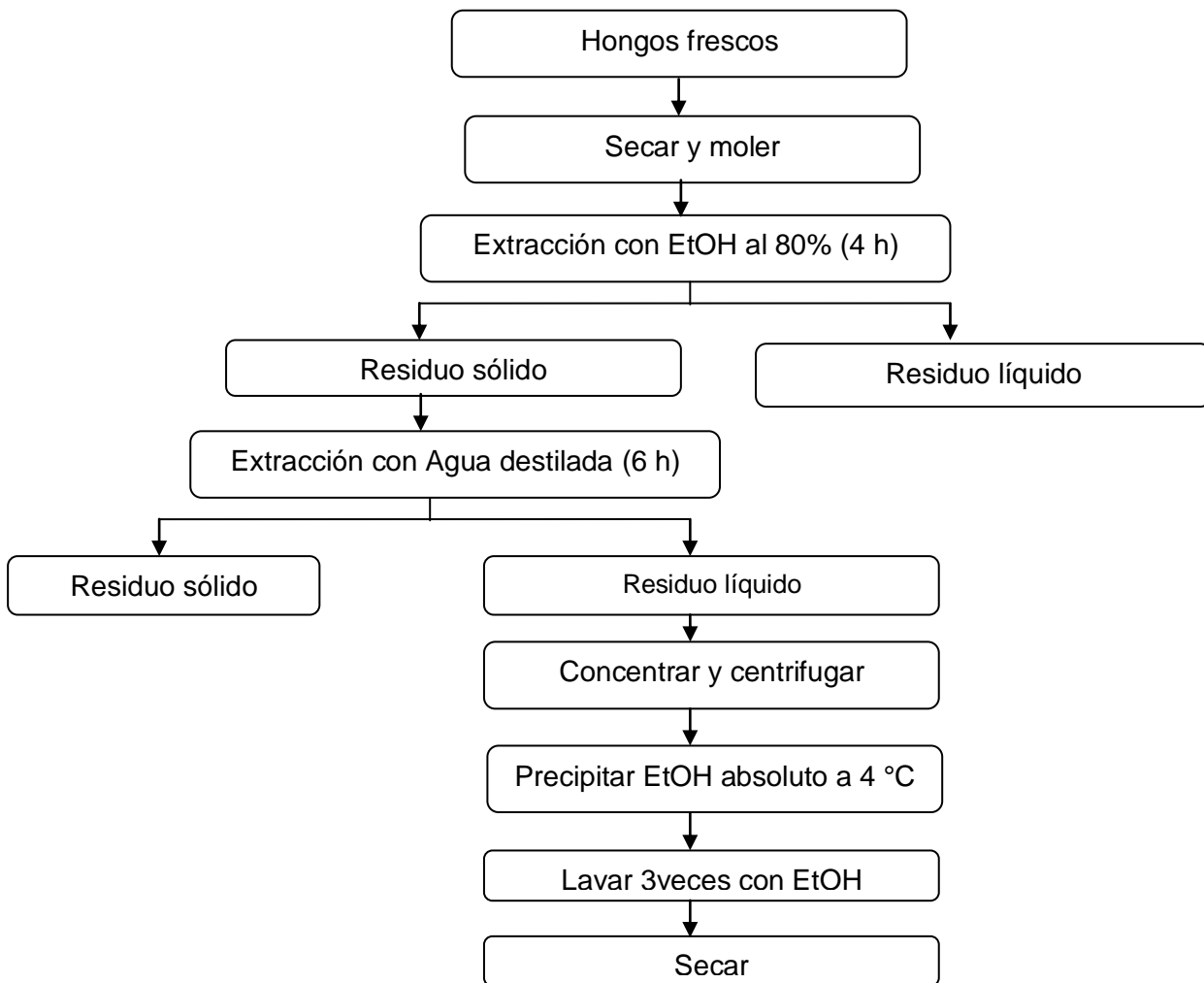


Figura 6. Metodología para extracción de extractos crudos de polisacáridos.

Para la extracción de polisacáridos, los carpóforos secos se molieron en licuadora para obtener un polvo fino, éste se colocó en cartuchos de papel filtro (5 g de muestra por cartucho) para extracción en soxhlet, primero durante 4 h con etanol

al 80 % v/v, para eliminar lípidos y compuestos de bajo peso molecular (Xiao *et al.*, 2011). Los sólidos recuperados se utilizaron en una segunda extracción en soxhlet con agua destilada durante 6 h para recuperar los polisacáridos, el extracto líquido obtenido se concentró por: evaporación a temperatura de ebullición (reducción de volumen diez veces) o por secado por aspersion en un secador Buchi Mini Spray Dryer B-290 (condiciones en el Cuadro 3). El concentrado fue precipitado por la adición de etanol absoluto a 4 °C para tener una concentración final de 80 % v/v, se dejó reposar en refrigeración durante 48 h a 4 °C, posteriormente se centrifugó (10000 rpm, 30 min, 25 °C) en una centrífuga Beckman Coulter J2-MC. Finalmente el precipitado se lavó 3 veces con etanol absoluto y se dejó secar al vacío a 36°C.

Cuadro 3. Parámetros usados en secador por aspersion.

Parámetro	Condiciones
Temperatura programada	100 °C
Temperatura de entrada	100 °C
Temperatura de salida	51 °C
Bomba	10 %
Flujo de aire	30-40
Aspirador	100 %

Nota: Se determinaron los °Brix de la muestra, siendo de 4.9

5.2.1. Cuantificación de azúcares totales

Se utilizó el método de fenol-sulfúrico modificado (Dubois *et al.*, 1956), para la determinación del contenido de azúcares en los extractos crudos de polisacáridos. Brevemente; se adicionaron 10 µL de muestra y posteriormente 200 µL de fenol al 5 %, se dejó reposar durante 15 min; después de este tiempo se adicionaron 1000 µL de H₂SO₄ concentrado, se dejó reposar por 30 min. Por último se adicionaron 1290 µL de agua destilada. Después de agregar cada componente la mezcla se agitó. La muestra se leyó a 490 nm en el espectrofotómetro BOECO S-22 UV/Vis, se utilizó glucosa para la elaboración de la curva estándar en concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50 60, 70, 80, 90, 100 µg/µL. Se determinó la cantidad de azúcares para los extractos concentrados por evaporación y secados por aspersion, el

análisis de la varianza de los resultados se realizó con el programa SPSS versión 15 con la prueba post hoc de Duncan de una vía.

El método se fundamenta en que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes. Bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas toman lugar empezando con una deshidratación simple, si se continúa la catálisis ácida, se producen varios derivados del furano que condensan entre sí y con otros subproductos para producir compuestos coloridos. Producto de la hidrólisis ácida con H_2SO_4 , se producen monosacáridos, pudiendo así determinar todos los azúcares, oligosacáridos y polisacáridos (Dubois *et al.*, 1956).

5.2.2. Cuantificación de proteínas

La determinación del contenido de proteínas es importante debido a que estas interfieren con las determinaciones reductoras y colorimétricas de los azúcares, por lo que se utilizó la técnica de Bradford (1976).

Para la determinación de proteínas, los extractos crudos de polisacáridos concentrados por evaporación y secado por aspersion, se disolvieron en agua destilada a una concentración de $4.6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, se tomaron $100 \mu\text{L}$ de muestra y a cada una se le adicionaron $2000 \mu\text{L}$ de reactivo de Bradford, la mezcla se agitó y dejó reposar durante 5 min; por último las muestras se leyeron a 595 nm en el espectrofotómetro BOECO S-22 UV/Vis. Se utilizó la albumina suero bovino (BSA) para elaborar la curva estándar en concentraciones de: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se determinó la cantidad de proteínas de los extractos concentrados por evaporación y secados por aspersion, el análisis de la varianza de los resultados se realizó con el programa SPSS versión 15 con la prueba post hoc de Duncan de una vía.

La sensibilidad de la técnica es de 1-10 μg de proteína y se basa en la cuantificación de la unión del colorante Azul Brillante de Coomassie a una proteína desconocida y la comparación de esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar. El complejo colorante-proteína presenta un máximo de absorción a 595 nm (Bradford, 1976).

5.3. Caracterización de polisacáridos

En primer lugar los extractos obtenidos de cada una de las cepas se diluyeron en agua Milli Q a una concentración de 10 µg/µL y como primera prueba de hidrólisis se utilizó el extracto de Caz Rosa para lo cual se pesó aproximadamente 0.01 g en ampolletas de vidrio de los extractos de cada una de las cepas, posteriormente se adicionaron 2 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 2 %, cada ampolleta se cerró con ayuda del mechero, para hidrolizar en autoclave durante 50, 60 y 70 min a 121 °C, 15 lb de presión. Una vez terminado el tiempo de hidrólisis el contenido de las ampolletas se colocó en tubos para neutralizar con NaOH 2 N. Se realizó el mismo procedimiento para todos los extractos crudos de polisacáridos hidrolizados con H₂SO₄ durante 60 min. Mientras que para el extracto crudo de polisacárido de la cepa Caz rosa se realizaron tres hidrólisis más, por separado, con ácido clorhídrico (HCl) 2 %, ácido tricloroacético (TCA) 2 N y ácido trifluoroacético (TFA) 2 N, cada una por triplicado.

Todas las muestras hidrolizadas y neutralizadas, se utilizaron en Cromatografía en Capa Fina (CCF) y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) y espectroscopia infrarrojo (IR).

5.3.1. Cromatografía en capa fina (CCF)

La CCF se realizó de acuerdo a la técnica reportada por Kanauchi *et al.* (2011) y Walker *et al.* (1965), con algunas modificaciones. Se prepararon estándares de glucosa, manosa, xilosa, galactosa, maltosa, celobiosa, lactosa, arabinosa, sacarosa y fructosa, a una concentración de 10 µg/µL, se utilizó como eluyente una mezcla de 6 acetato de etilo: 2 metanol: 1.5 ácido acético glacial: 0.5 agua destilada, placas de 6.6 cm x 5 cm de Sílica gel 60 F₂₅₄ de Merck y como revelador la mezcla de etanol, anisaldehído, H₂SO₄ y ácido acético glacial (26:2:2:1). Los estándares así como las muestras se sembraron en la placa con ayuda de tubos capilares, una vez seca la muestra, se introdujo en la cámara que contiene el eluyente hasta que éste alcance la línea marcada en la parte superior de la placa, se retiró y se dejó secar la placa. Con ayuda de un aspersor se agregó la solución

reveladora, se dejó secar la placa, finalmente se calentó durante 5 min. Tanto el eluyente como el revelador utilizados, fueron de reciente preparación.

5.3.2. Espectroscopia infrarrojo (IR)

El equipo utilizado para la espectroscopia infrarrojo fue Perkin-Elmer 16F PC, con una longitud de onda de 560 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} . Se utilizaron estándares de glucosa, manosa, xilosa, galactosa, maltosa, celobiosa, lactosa, arabinosa, sacarosa y fructosa. Los extractos crudos de polisacáridos en polvo de los concentrados por evaporación y secados por aspersion, así como los hidrolizados con H_2SO_4 al 2 %, de los mismos, de todas las cepas.

5.3.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la identificación por cromatografía líquida de alta resolución se utilizaron estándares a una concentración de $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de glucosa, manosa, xilosa, galactosa, maltosa, celobiosa, lactosa, arabinosa, sacarosa y fructosa. El equipo utilizado fue de la marca Perkin Elmer con detector de índice de refracción, la columna utilizada fue Aminex® HPX-87C Carbohydrate column, de $300\text{ mm} \times 7.8\text{ mm}$, con un flujo de $0.6\text{ mL}/\text{min}$, temperatura $85\text{ }^\circ\text{C}$, durante 20 min. Las muestras obtenidas en el punto 5.3, fueron filtradas a través de una membrana millipore de $0.22\text{ }\mu\text{m}$, posteriormente con una dilución de 1:10 se colocó 1 mL en un vial de 2 mL para leer en el HPLC.

5.4. Evaluación biológica

Al finalizar la extracción de los polisacáridos se utilizarán para evaluar su actividad antibacteriana y antioxidante, el procedimiento para estas evaluaciones se describen en los apartados siguientes.

5.4.1. Evaluación de la actividad antibacteriana

5.4.1.1. Determinación de halo de inhibición

Se utilizó el método de difusión de agar en disco Kirby-Bauer, descrito por Bailey *et al.*, (1991) y Koneman *et al.*, (2004), para medir el efecto que presentan los extractos crudos de polisacáridos en bacterias Gram (+) y Gram (-), (Cuadro 4).

Cuadro 4. Bacterias utilizadas en la prueba de actividad antibacteriana

Gram positivas	Gram negativas
	<i>Enterobacter agglomerans</i> ATCC 27155
<i>Bacillus subtilis</i> *	<i>Escherichia coli</i> *
<i>S. aureus</i> 1 (<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12398)	<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 13884
<i>S. aureus</i> 2 (aislamiento clínico)	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i> *
	<i>Yersinia enterocolitica</i> *
	<i>Salmonella thypi</i> *

Todas las cepas se encuentran en el cepario del Laboratorio de Bioconversiones de la UPIBI, IPN. *Cepas obtenidas por aislamiento clínico y donadas por el laboratorio de Microbiología de las FES-Cuautitlán, UNAM.

Se preparó y se esterilizó Agar nutritivo (AN) y Agar Muller-Hinton (MH). El medio MH se dosificó en cajas Petri (4 mm de grosor, 10 cm de diámetro), en condiciones de esterilidad, se dejaron solidificar y se incubaron a 28 °C, durante 72 horas para prueba de esterilidad. Las bacterias se sembraron por estría simple 24 h antes de la prueba en AN para asegurar la viabilidad del cultivo.

Se preparó una suspensión celular cuya turbidez fue igual a la del tubo 0.5 de la escala de McFarland (concentración de 1.5×10^8 UFC/mL), con ayuda de un hisopo se inocularon las bacterias en agar MH hasta cubrir toda la superficie de la caja, posteriormente se procedió a colocar los sensidiscos estériles (6 mm de diámetro), los cuales se impregnaron previamente con 60 µL de extracto crudo de polisacáridos disuelto en solución salina al 0.9% (8 mg de extracto por sensidisco). Se utilizó cloranfenicol (30 µg por sensidisco) como control positivo y como control negativo solución salina al 0.9 %. La prueba se realizó por triplicado con cada una de las bacterias mencionadas en el Cuadro 4, para medir los halos de inhibición de los extractos concentrados por evaporación y secados por aspersión, el análisis

de la varianza de los resultados se realizó con el programa SPSS versión 15 con la prueba post hoc de Duncan de una vía.

5.4.1.2. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para determinar la CMI se prepararon diferentes concentraciones de extractos crudos de polisacáridos (0.75 a 12 mg/mL) de las cepas IE200 CE, Tamasopo CE, IE200 CSA, IE201 CSA, Caz Rosa CSA y Tamasopo CSA, que tuvieron efecto positivos en la prueba del halo de inhibición. Se agregaron 50 µL de los extractos crudos de polisacáridos en placas ELISA de 96 pozos más 50 µL de caldo MH con inóculo bacteriano equivalente a la turbidez del tubo 0.5 de la escala de McFarland. Las placas se incubaron a 36°C, transcurrido el tiempo de incubación (18-24 h), se adiciona a cada pozo 50 µL de violeta de tetrazolio y se volvieron a incubar por 30 minutos. La presencia de crecimiento bacteriano se observó por la formación de un botón morado en el fondo del microtubo (Bailey *et al.*, 1991). Finalmente la CMI se consideró como la concentración de los pozos en los que no presentó crecimiento bacteriano.

5.4.2. Evaluación de la actividad de captación de radicales libres DPPH (1,1-diphenil-2-picrylhidrazil).

La actividad de captación de radicales libres de los extractos crudos de polisacáridos, se determinó de acuerdo al método modificado de Xia *et al.*, (2011). Se partió de una concentración de 40 mg/mL de extracto. Se colocaron 500 µL de muestra en tubos, posteriormente se les agregó 2500 µL de DPPH (0.1 mM) disuelto en metanol al 99% de reciente preparación. La mezcla se agitó vigorosamente y se incubó a 25°C durante 30 minutos en la oscuridad. Cada determinación se realizó por triplicado. Se utilizó como control positivo un stock 0.75 mM de ácido gálico. La absorbancia se midió a 517 nm. El porcentaje de captación de radicales libres y la concentración en equivalentes de ácido gálico, se calcularon con las ecuaciones obtenidas de la curva patrón (Xia *et al.*, 2011 y

Zanwar *et al.*, 2010), el análisis de la varianza de los resultados se realizó con el programa SPSS versión 15 con la prueba post hoc de Duncan de una vía.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Obtención de cuerpos fructíferos

Los resultados de los parámetros de productividad evaluados durante la primera cosecha de los cuerpos fructíferos de las cepas trabajadas se muestran en el Cuadro 5.

Los datos de la primera cosecha se analizaron estadísticamente con ANOVA de una vía y posteriormente se le aplicó la prueba post hoc de Duncan para agruparlos y determinar diferencias significativas entre las cepas. Entre los datos obtenidos para las cepas no hubo diferencias estadísticamente significativas en %EB ($F_{(16,19)} = 0.288$, $p=0.833$), %TP ($F_{(16,19)} = 0.564$, $p=0.646$), %R ($F_{(16,19)} = 0.288$, $p=0.833$), pero si hubo diferencia estadísticamente significativa para el Pm ($F_{(16,19)} = 3.6$, $p=0.04$).

Cuadro 5. Valor promedio de los parámetros de productividad evaluados durante la primera cosecha de las cepas utilizadas.

Parámetro	IE200	IE201	Caz Rosa	Tamasopo
%EB	21.04±6.60	17.63±4.34	22.42±6.50	16.20±3.42
%TP	0.33±0.10	0.29±0.08	0.36±0.12	0.21±0.04
%R	6.18±1.94	5.18±1.28	6.59±1.91	4.76±1.00
Pm (g)	4.33±1.36 ^a	3.51±0.57 ^a	10.65±2.46 ^b	5.19±1.82 ^a

Nota: Valor promedio ± el ESM para n=5. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas por columnas (post hoc Duncan, $p<0.05$).

Para la cepa IE200 crecida en sustrato paja se obtuvo un valor de EB de 21.04 % durante la primera cosecha, en trabajos anteriores se informan EB entre 23.6 % a 37.9 % (Aguilar, 2008; Maldonado, 2007), por lo que la productividad está dentro del intervalo reportado; no así para lo reportado por Téllez (2008), donde la EB fue de 15 % en la primera cosecha. Para la cepa IE201 se obtuvo una EB de 17.63 %, mientras que Téllez (2008) reportó una EB de aproximadamente 15% y Costa (2013) reportó un %EB de 49.10 %, se utilizó el mismo sustrato, en ambos estudios y los datos reportados son para la primera cosecha.

Para las cepas Caz Rosa y Tamasopo en sustrato paja la EB fue de 23.83 % y 27.58 % respectivamente, Costa (2013), reporta para la primera cosecha EB de 69.32 % y 60.69 % para Caz Rosa y Tamasopo, respectivamente. Estos últimos datos son mayores a los reportados para todas las cepas trabajadas en este estudio, pero se encuentran dentro del rango reportado para la primera cosecha, por Garzón y Cuervo (2008), quienes reportan un %EB de 16.3 % hasta 34.1 % para *P. ostreatus*, en su estudio se utilizó pulpa de café como sustrato y la adición de bagazo de caña de azúcar, aserrín y tallo de maíz.

Para la cepa IE200 con TP de 0.33 %, está dentro de los valores obtenidos por Aguilar (2008) quien reporta para la misma cepa %TP de 0.3 a 1.385%, para la primera cosecha. Sin embargo ambos datos reportados, para esta cepa son menores a lo obtenido por Costa (2013), quien reporta %TP de 3.27% para la primera cosecha. Las cepas Caz Rosa, IE201 y Tamasopo tuvieron valores de %TP de 0.36, 0.29 y 0.21 %, respectivamente, estando dentro de los valores numéricos presentados por Aguilar (2008) y Maldonado (2007). Sin embargo también estos %TP son menores a los reportados por Costa (2013), quien obtuvo %TP de 3.85 y 3.25 %, para las cepas Caz Rosa y Tamasopo, todos los datos obtenidos para la primera cosecha.

En cuanto al rendimiento Maldonado (2007) reporta un %R de 8.01 para la cepa IE200, mientras en este estudio se obtuvo un %R de 6.18%. Para las cepas IE201, Caz Rosa y Tamasopo el %R fue de 5.18, 6.59 y 4.76 %, comparando con lo reportado por Huerta *et al.* (2009), donde los valores de %R van desde 1.5 a 10.5 para *P. djamor*, 3.3-7.4 para *P. pulmonaris*, 4.4 para *P. ostreatus* y 1.1 para *P. levis*. Podemos observar que nuestras cepas tienen valores intermedios de %R respecto a las cepas *P. djamor* y *P. pulmonaris*, mientras que para el resto de las cepas mencionadas, nuestros valores de %R son mayores. Y Costa (2013), reporta para Caz Rosa y Tamasopo %R de 20.42 y 16.75 %, respectivamente, todos los datos reportados para la primera cosecha.

Para el Pm hubo diferencias estadísticamente significativas, de ahí que de la prueba post hoc de Duncan para Pm, se formaran dos grupos. En el grupo **a** con

menor Pm se encontraron las cepa IE200, IE201 y Tamasopo, seguido por el grupo **b** con la cepa Caz Rosa.

El Pm indica el tamaño medio de los hongos (Royse *et al.*, 2004), donde se puede caracterizar la variabilidad entre las cepas y las cosechas. El Pm fue mayor para la cepa Caz Rosa (10.65 g), mientras que Costa (2013) reporta un valor de Pm de 5.57 g para esta misma cepa en la primera cosecha y para las cepas IE201 y Tamasopo valores de 7.08 g y 8.21 g; siendo estos últimos datos mayores a los obtenidos en este trabajo para el resto de las cepas trabajadas (IE200: 4.33 g; IE201: 3.51 g y Tamasopo 5.19 g).

6.2. Extractos crudos de polisacáridos

Los porcentajes de rendimiento de los extractos crudos de polisacáridos concentrados por evaporación y por secado por aspersión se muestran en Cuadro 6.

Cuadro 6. Valor promedio de rendimientos de extracción de extractos crudos de polisacáridos de las cepas trabajadas.

		Peso inicial muestra seca (g)	Peso extracto (g)	% Rendimiento (%Re)
<u>Reducción de volumen por precipitación</u>	Tamasopo	5.02±0.00	0.48±0.05	9.44±0.91
	Caz Rosa	5.05±0.00	0.55±0.04	10.89±0.80
	IE200	5.00±0.00	0.49±0.01	9.84±0.20
	IE201	5.04±0.01	0.50±0.04	9.94±0.81

Nota: Valor promedio ± el ESM para n=3.

La cepa Caz Rosa, presentó un mayor %Re, sin embargo para todas las cepas el porcentaje de rendimiento, que va de 9.44 a 10.89 % se consideran mayores a los resultados reportados para cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* por Xia *et al.* (2011), donde los %Re son de 5.3%, cabe mencionar que dichos extractos de polisacáridos fueron obtenidos por un método similar de extracción, pero fueron desproteinizados por el método de Sevag (mezcla cloroformo/butanol).

En otro estudio realizado por Choi *et al.* (2004), se utilizaron cuerpos fructíferos de *P. ferulae*, los %Re fueron de 3-5% y de 12-13% en extracción con etanol al 95% y agua destilada respectivamente. Por otro lado, se reporta un %Re de 6% para extractos acuosos de *Pleurotus pulmonarius*, se hicieron dos extracciones seguidas, la primera con CHCl₃-MeOH (4:1 v/v) y la segunda fue por extracción acuosa (Smiderle *et al.*, 2008).

A los extractos crudos de polisacáridos se les determinó la cantidad de azúcares totales, se utilizó la curva patrón de glucosa por la técnica de fenol sulfúrico (Figura 7) y proteínas totales, por el método de Bradford, se usó como patrón albumina de suero bovina (Figura 8).

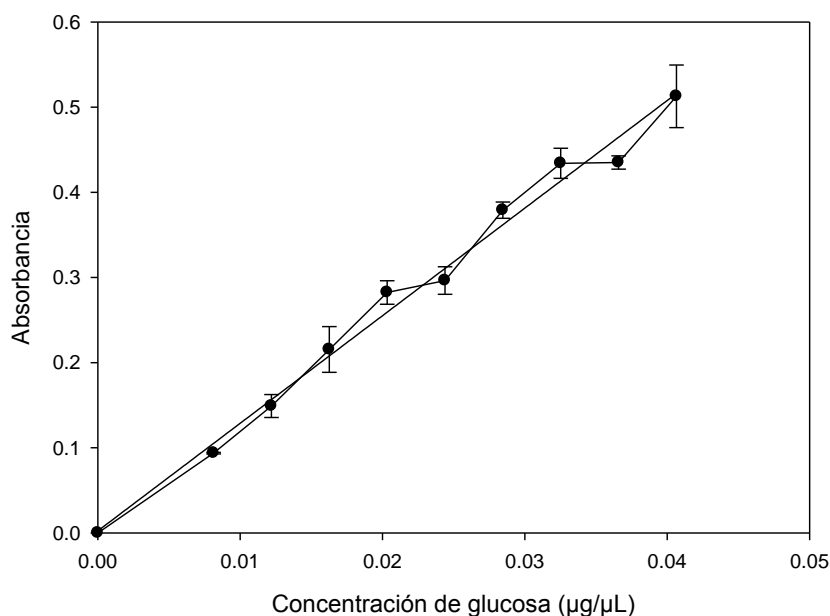


Figura 7. Curva patrón de glucosa obtenida por el método de Fenol sulfúrico.

De la Figura 7, se obtuvo la Ecuación 5, donde: “x” representa la concentración de azúcares totales de las cepas utilizadas, y “y” la absorbancia de la muestra problema, con un valor de R=0.994.

$$x = \frac{y - 0.0023}{12.636}$$

Ecuación 5

En la Figura 8 se muestra la curva patrón para la cuantificación de proteínas totales en los extractos crudos de polisacáridos.

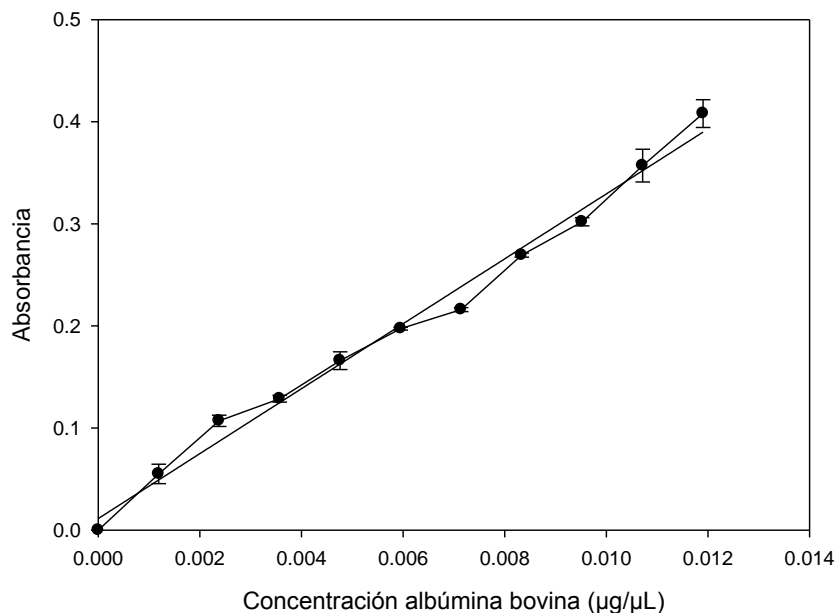


Figura 8. Curva patrón de BSA obtenida por el método de Bradford.

De la Figura 8, se obtuvo la Ecuación 6, donde: “x” representa la concentración de proteínas totales de las cepas utilizadas, y “y” la absorbancia de la muestra problema, con un valor de R=0.994.

$$x = \frac{y - 0.0096}{31.652} \quad \text{Ecuación 6}$$

En la Ecuación 5 y Ecuación 6, se sustituye la absorbancia obtenida para determinar la cantidad de azúcares y proteínas totales, en los extractos crudos de polisacáridos de todas las cepas, en el Cuadro 7, se muestran los porcentajes de cada uno. El ANOVA de una vía indicó diferencia estadísticamente significativa para el porcentaje de azúcares totales ($F_{(16,23)}=8.62$, $p=0.0001$) y para el porcentaje de proteínas totales.

Cuadro 7. Promedio de contenido de azúcares y proteínas en extractos crudos de polisacáridos.

Cepa	Azúcares totales (%)		Proteínas totales (%)	
	Concentrado por evaporación (CE)	Concentrado por secado por aspersión (CSA)	Concentrado por evaporación (CE)	Concentrado por secado por aspersión (CSA)
IE200	15.04±1.55	33.51±4.01	2.74±0.11	4.36±0.06
IE201	22.69±1.33	15.44±2.29	2.32±0.72	4.40±0.13
Caz Rosa	28.10±1.65	24.15±1.62	3.61±0.24	5.44±0.27
Tamasopo	44.46±0.26	27.57±7.41	5.19±0.50	2.37±0.23

Nota: Valor promedio ± el error típico de la media para n=3.

En la Figura 9, se muestra los grupos obtenidos por el análisis post hoc de Duncan, el cual formó cuatro grupos, tanto para el porcentaje de azúcares totales como el de proteínas.

En el caso del porcentaje de azúcares totales en el grupo **a** con el menor porcentaje de azúcares totales se encontraron los extractos de las cepas IE200 CE y IE201 CSA, seguido por el grupo **b** con IE201 CE, Caz Rosa CE, Caz Rosa CSA y Tamasopo CSA, en el grupo **c** IE200 CSA y finalmente en el grupo **d** el extracto de la cepa Tamasopo CE.

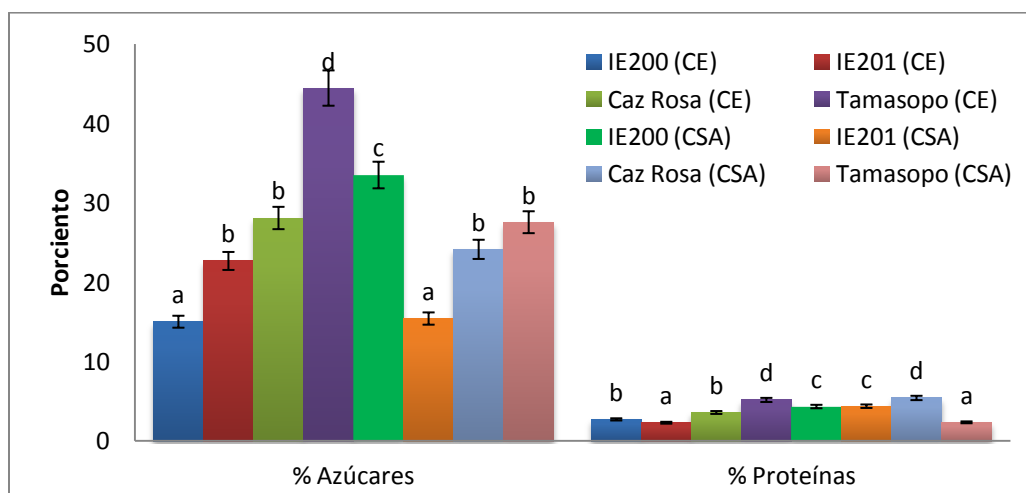


Figura 9. Promedio de contenido de azúcares y proteínas en extractos crudos de polisacáridos. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas por columnas (post hoc Duncan, $p < 0.05$).

Como se observa el contenido de azúcares fue de 15 hasta 44 %, siendo Tamasopo la que tuvo un mayor porcentaje de azúcares totales, y con menos porcentaje IE200 CE e IE201 CSA, mientras que para los extractos de *Pleurotus ostreatus* obtenidos por (Xia *et al.*, 2011), el porcentaje de azúcares totales fue de 74.3 % este valor se obtuvo después de desproteínizar y fraccionar el polisacárido crudo en una columna de celulosa, y su posterior liofilización y fraccionamiento en una columna de Sefarosa CL-6B.

El ANOVA de una vía indicó diferencias estadísticas para el contenido de proteínas en los extractos obtenidos ($F_{(16,23)}=12.11$, $p=0.0001$). Y con la prueba post hoc de Duncan se formaron cuatro grupos, en el grupo **a** con el menor porcentaje de proteínas totales se encontraron los extractos de las cepas IE201 CE y Tamasopo CSA, seguido por el grupo **b** con IE200 CE y Caz Rosa CE, en el grupo **c** IE200 CSA e IE201 CSA y finalmente en el grupo **d** el extracto de la cepa Tamasopo CE y Caz Rosa CSA.

El porcentaje de proteínas presentó un intervalo de 2.3 hasta 5.4 % en los extractos de todas las cepas utilizadas, mientras que Telles *et al.* (2011) no reporta contenido de proteínas en extractos de *Pleurotus sajor-caju*, debido a que antes de la determinación realiza un tratamiento de sulfatación para desproteínizar el extracto, en nuestro caso el porcentaje de proteínas fue determinado del extracto crudo. Sin embargo, Xia *et al.* (2011), reportan un contenido de proteínas del 24.4%, el cual es muy superior al obtenido para las cepas utilizadas en este estudio, cabe mencionar que la cepas utilizadas son de diferentes especies, en el caso de Xia *et al.* (2011), la cepa utilizada pertenece a *P. ostreatus* y en nuestro caso las cepas Caz Rosa y Tamasopo pertenecen a *P. djamor*, además los extractos obtenidos por Xia *et al.* (2011) fueron purificados antes de la determinación, mientras que en nuestro caso las proteínas fueron determinadas directamente de los extractos crudos.

6.3. Caracterización de polisacáridos

6.3.1. Cromatografías en capa fina (CCF)

Los valores de Rf para los estándares y las muestras de los extractos crudos de polisacáridos sin hidrolizar e hidrolizados, se encuentran en el Cuadro 8, para comparar el valor de Rf obtenido en cada muestra.

Cuadro 8. Valores de Rf para estándares y muestras de extractos crudos de polisacáridos, sin hidrolizar e hidrolizados.

Estándares	Rf (cm)	Muestras	Rf (cm)	Muestras	Rf (cm)
Glucosa	0.43	IE200 (CE)-Sh	nm	IE200 (CSA)-Sh	0.52
Manosa	0.46	IE201 (CE)-Sh	nm	IE201 (CSA)-Sh	0.37
Xilosa	0.56	Caz Rosa (CE)-Sh	nm	Caz Rosa (CSA)-Sh	0.50
Galactosa	0.40	Tamasopo (CE)-Sh	nm	Tamasopo (CSA)-Sh	0.60
Maltosa	0.30	IE200 (CE)-h	0.30	IE200 (CSA)-h	0.52
Celobiosa	0.27	IE201 (CE)-h	0.55	IE201 (CSA)-h	0.47
Lactosa	0.20	Caz Rosa (CE)-h	0.57	Caz Rosa (CSA)-h	0.42
Arabinosa	0.48	Tamasopo (CE)-h	0.62	Tamasopo (CSA)-h	0.45
Sacarosa	0.30				
Fructosa	0.46				

Nota: Sh- indica extracto sin hidrolizar, h- extracto hidrolizado y np que la muestra no corrió. no se presentó valor de Rf.

En la Figura 10, se presentan las cromatoplasmas de los extractos crudos de polisacáridos sin hidrolizar (reducción de volumen por evaporación), de las cuatro cepas se observa que no hubo desplazamiento de la muestra inicial, esto probablemente se deba al peso molecular de los polisacáridos contenidos en los extractos, además es necesario considerar que esta prueba es utilizada para azúcares simples (Walker *et al.*,1965). Los valores promedio de Rf para los estándares de azúcares fueron: 0.43, 0.46, 0.56, 0.40, 0.30. 0.27, 0.20, 0.48, 0.30, 0.46 para glucosa, manosa, xilosa, galactosa, maltosa, celobiosa, lactosa, arabinosa, sacarosa y fructosa, respectivamente. Y no se presentan valores de Rf para las muestras de los extractos crudos de polisacáridos concentrados por evaporación.

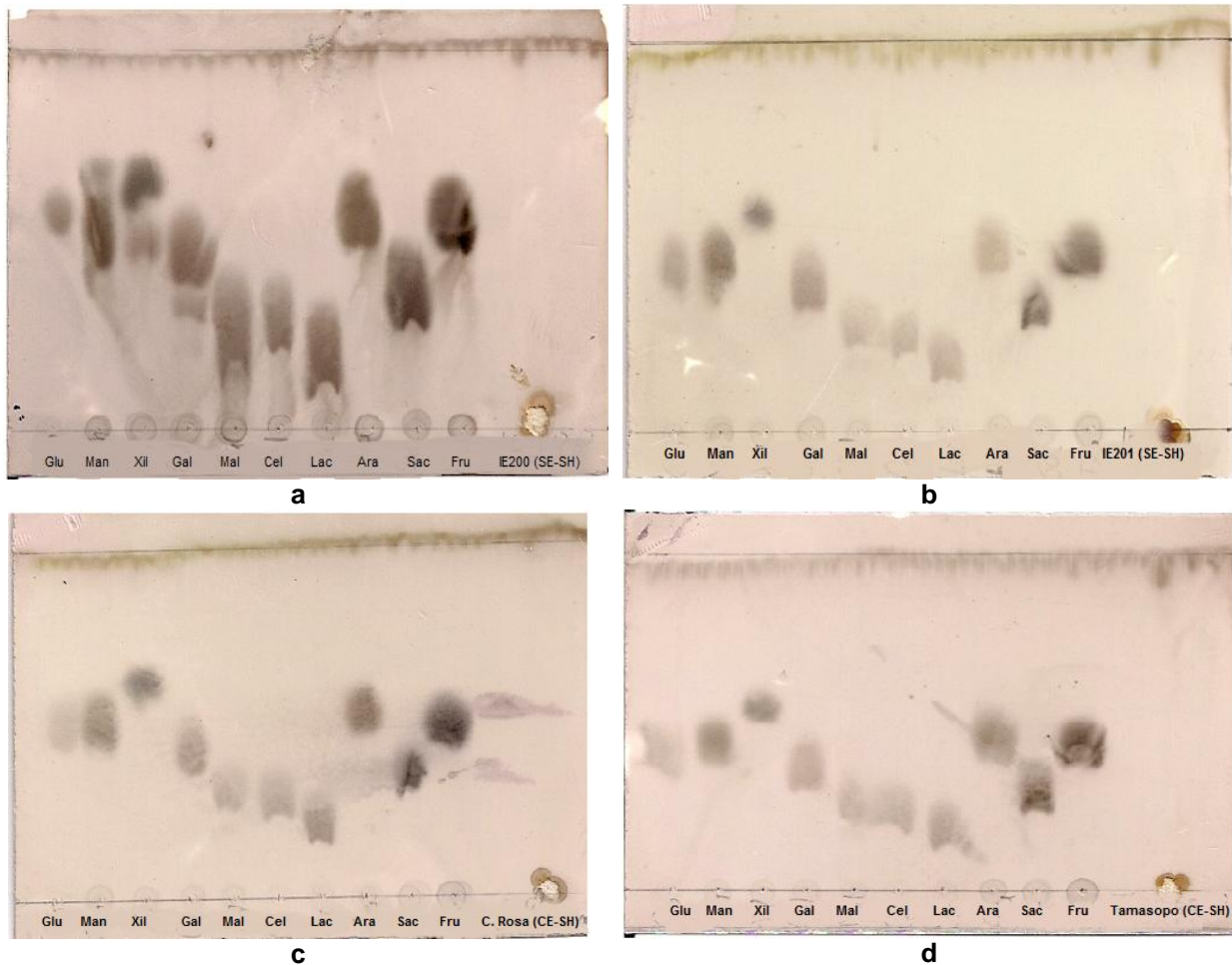


Figura 10. CCF de estándares y muestras de extractos crudos de polisacáridos sin hidrolizar, obtenidos por reducción de volumen por evaporación. Donde (a) IE200, (b) IE201, (c) Tamasopo y (d) Caz Rosa.

Por el contrario para los extractos sin hidrolizar (secado por aspersión), como se muestra en las cromatoplasmas de la Figura 11, se pueden observar algunas manchas en lo que respecta a las muestras. Por lo que al comparar el valor de R_f de los estándares con los R_f de los extractos crudos de polisacáridos están constituidos por manosa, xilosa, arabinosa, maltosa y celobiosa, que de acuerdo con Xia *et al.* (2011), Palacios *et al.* (2011) y Tong *et al.* (2009), estos azúcares se encuentran como componentes de polisacáridos en cuerpos fructíferos del género *Pleurotus*, ejemplo de ello, es el proteoglicano que se obtuvo por extracción con agua caliente y precipitación con etanol, para el cual el análisis por cromatografía de gases del hidrolizado sugiere la presencia de arabinosa, manosa, galactosa,

glucosa y ácido galactourónico (Xia *et al.*, 2011), cabe mencionar que estos extractos fueron purificados antes del análisis, a diferencia de los obtenidos en este proyecto, que son extractos crudos de polisacáridos.

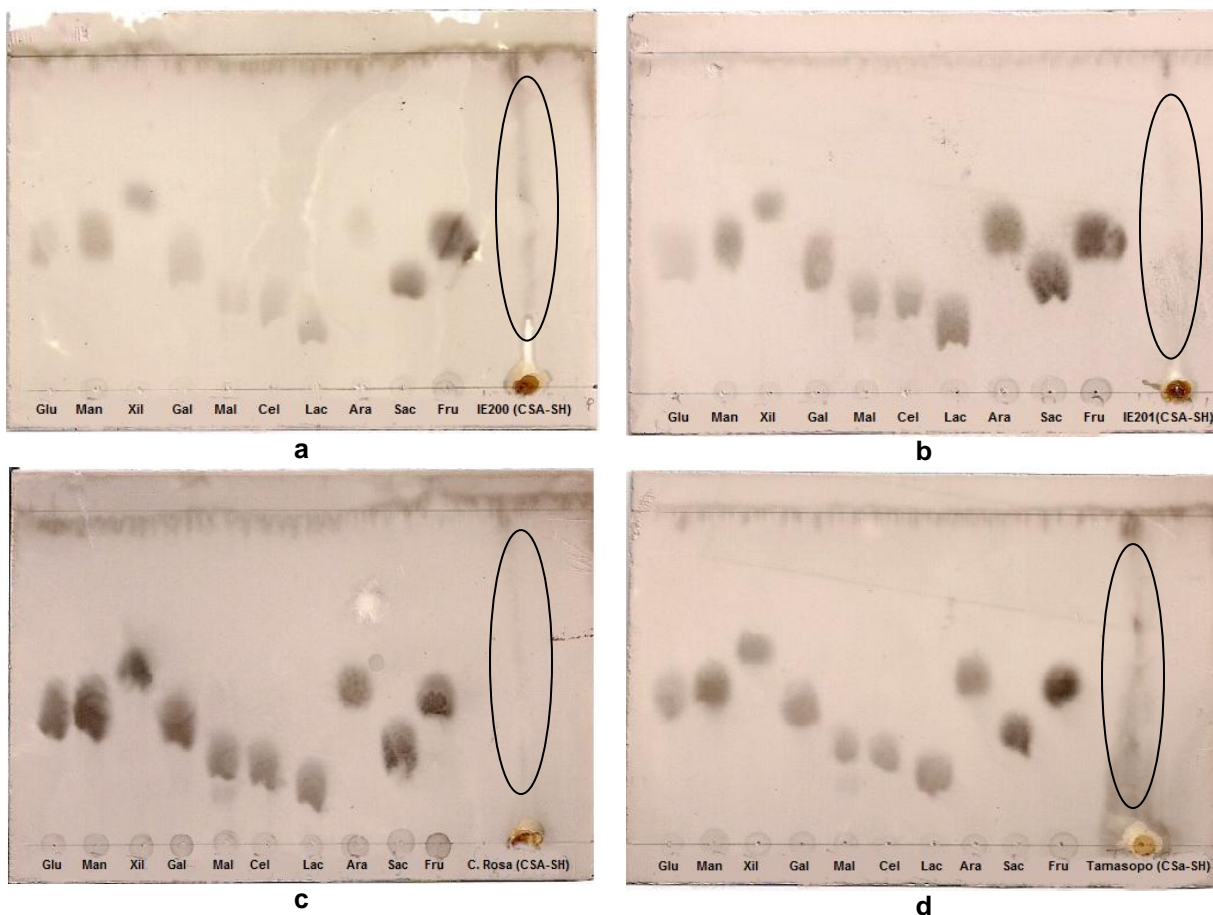


Figura 11. CCF de estándares y muestras de extractos crudos de polisacáridos sin hidrolizar, obtenidos por reducción de volumen por secado por aspersión. Donde (a) IE200, (b) IE201, (c) Caz Rosa y (d) Tamasopo.

En la Figura 12, se muestran los cromatoplasmas de los extractos crudos de polisacáridos CE hidrolizados, se observa que las muestras corridas presentan manchas que coinciden con los estándares maltosa, celobiosa, galactosa, fructosa y sacarosa, que de acuerdo con Xia *et al.* (2011), Palacios *et al.* (2011) y Tong *et al.* (2009) y Telles *et al.* (2011), estos azúcares se encuentran como componentes de polisacáridos en cuerpos fructíferos del género *Pleurotus*, y los autores utilizaron diferentes técnicas y equipos de detección, entre ellas HPLC, Infrarrojo, $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$, Cromatografía de gases, Espectrometría de masas, etc.

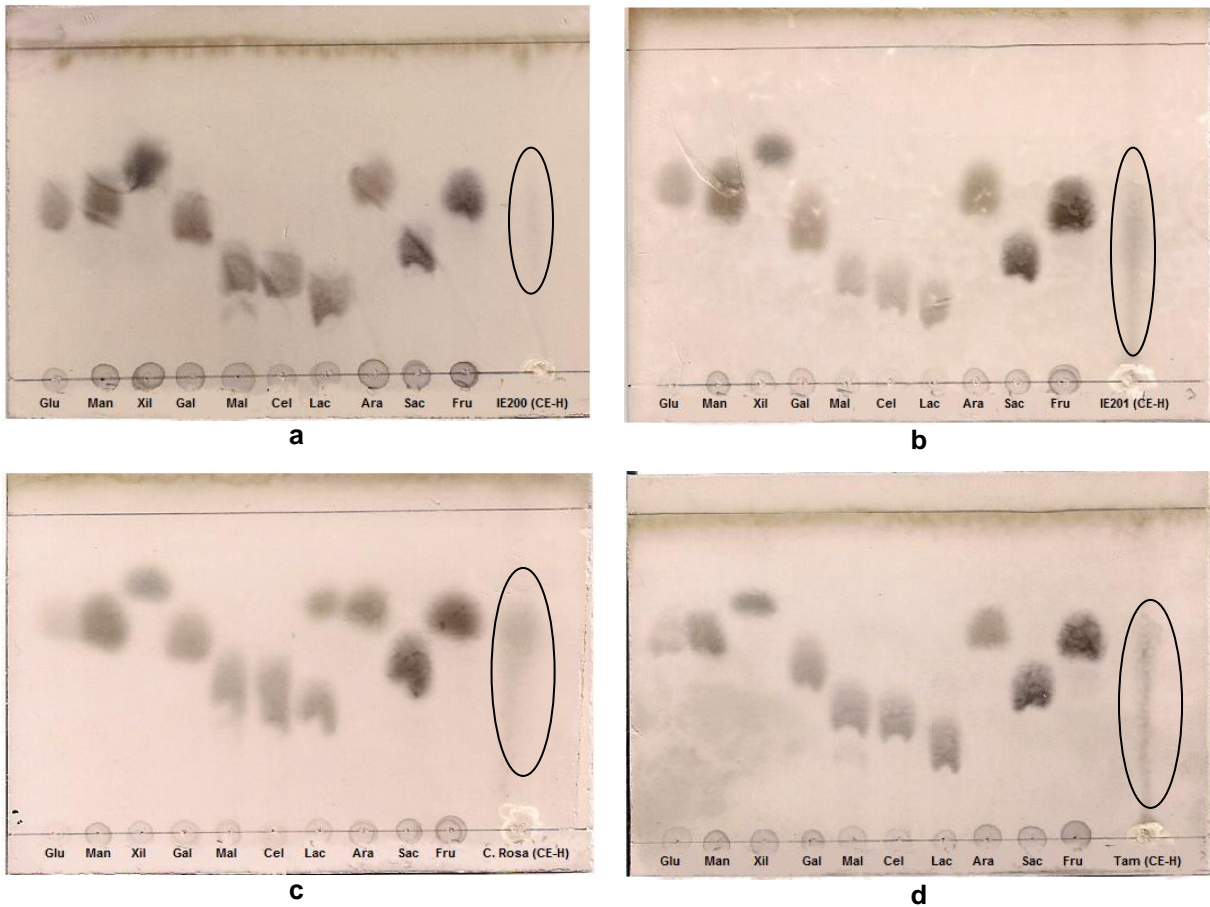


Figura 121. CCF de estándares y muestras de extractos crudos de polisacáridos hidrolizados, obtenidos por reducción de volumen por evaporación. Donde (a) IE200, (b) IE201, (c) Tamasopo y (d) Caz Rosa.

En la Figura 13, se muestran los cromatoplacas de los extractos crudos de polisacáridos CSA hidrolizados, se observa que las muestras corridas presentan manchas que coinciden con los estándares maltosa, celobiosa, galactosa, fructosa y sacarosa, que de acuerdo con Xia *et al.* (2011), Palacios *et al.* (2011), Tong *et al.* (2009) y Telles *et al.* (2011) estos azúcares se encuentran como componentes de polisacáridos en cuerpos fructíferos del género *Pleurotus*.

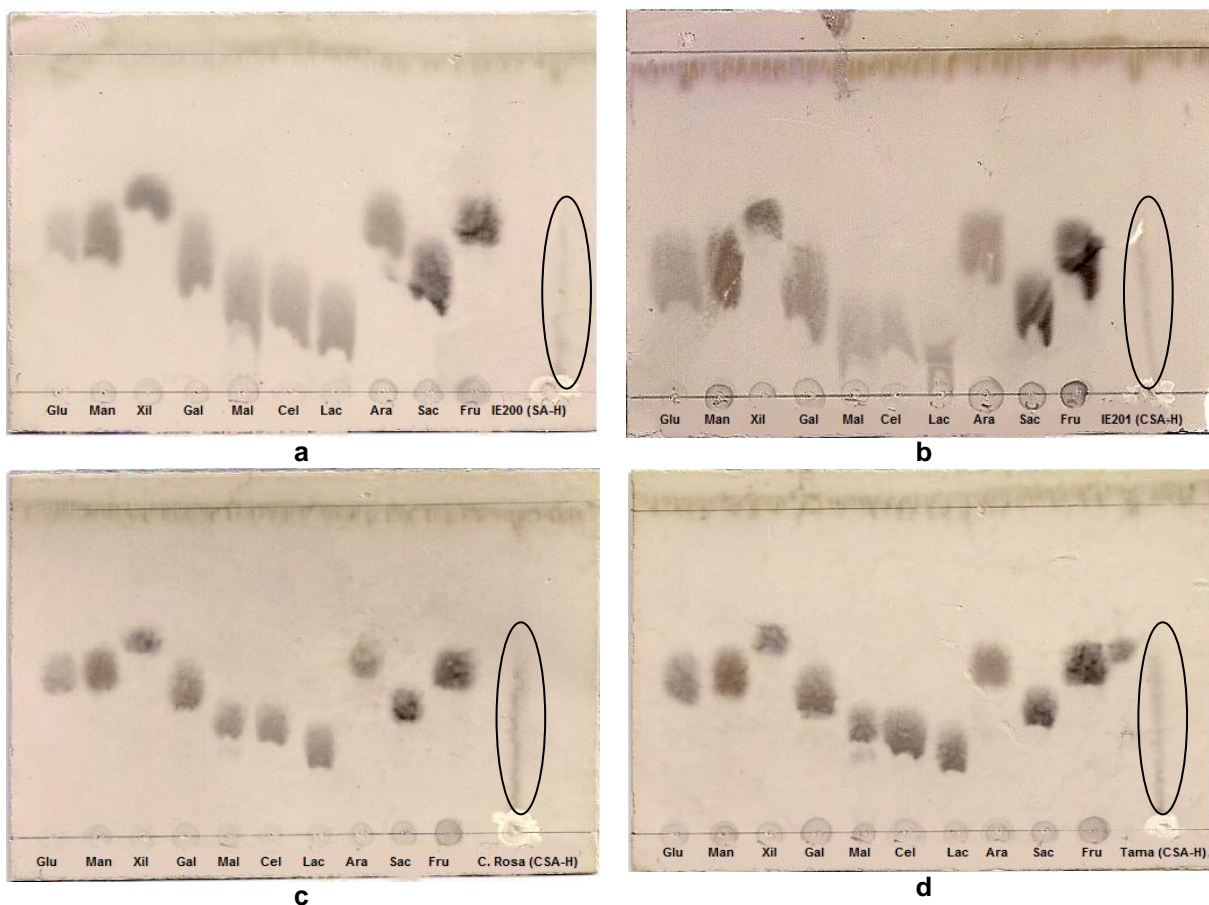


Figura 13. CCF de estándares y muestras de extractos crudos de polisacáridos hidrolizados, obtenidos por reducción de volumen por secado por aspersion. Donde (a) IE200, (b) IE201, (c) Caz Rosa y (d) Tamasopo.

6.3.2. Cromatografía líquida de Alta Resolución (HPLC)

En el Cuadro 9, se muestra el tiempo de retención de los estándares utilizados en el HPLC y de las muestras de los extractos crudos de polisacáridos, con la finalidad de comparar ambos resultados.

Cuadro 9. Tiempo de retención de cromatogramas de estándares.

Estándares	TR (min)	Muestras	TR (min)
Glucosa	9.74	IE200 (CE)-Sh	6.44
Fructosa	12.70	IE201 (CE)-Sh	6.05
Galactosa	10.95	Caz Rosa (CE)-Sh	636
<u>Maltosa</u>	<u>8.14</u>	Tamasopo (CE)-Sh	6.21
Manosa	11.30	IE200 (CE)-h	7.95
Xilosa	10.81	IE201 (CE)-h	7.90
<u>Celobiosa</u>	<u>7.85</u>	Caz Rosa (CE)-h	7.95
Arabinosa	12.76	Tamasopo (CE)-h	7.59
Lactosa	8.40		
<u>Sacarosa</u>	<u>7.85</u>		

Nota: Sh- indica extracto sin hidrolizar, h- extracto hidrolizado.

En la Figura 14 se muestran los cromatogramas de extractos sin hidrolizar, para los cuales los tiempos de retención fueron de 6.44, 6.05, 636 y 6.21 min de las cepas IE200, IE201, Caz Rosa y Tamasopo, respectivamente.

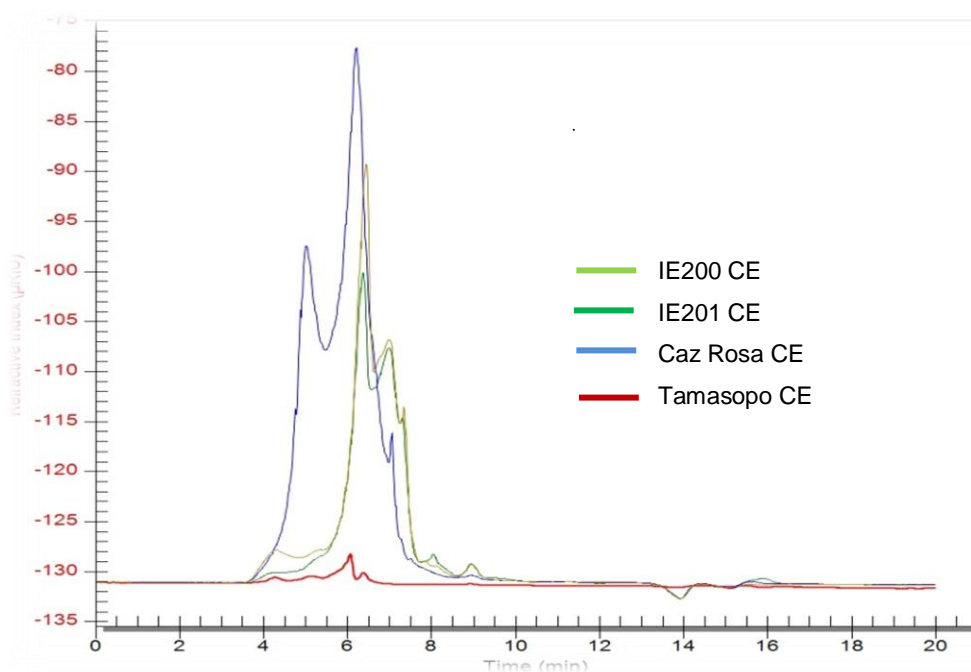


Figura 14. Cromatogramas de extractos de polisacáridos sin hidrolizar.

En la Figura 15, se muestran cromatogramas de extractos hidrolizados con H_2SO_4 , los cuales muestran un comportamiento similar para todas las cepas IE200, IE201, Caz Rosa y Tamasopo, con tiempo de retención de 7.95, 7.90, 7.95 y 7.59 min, respectivamente. De acuerdo con estos tiempos de retención, los extractos tienen entre sus componentes celobiosa, sacarosa y maltosa, todos disacáridos.

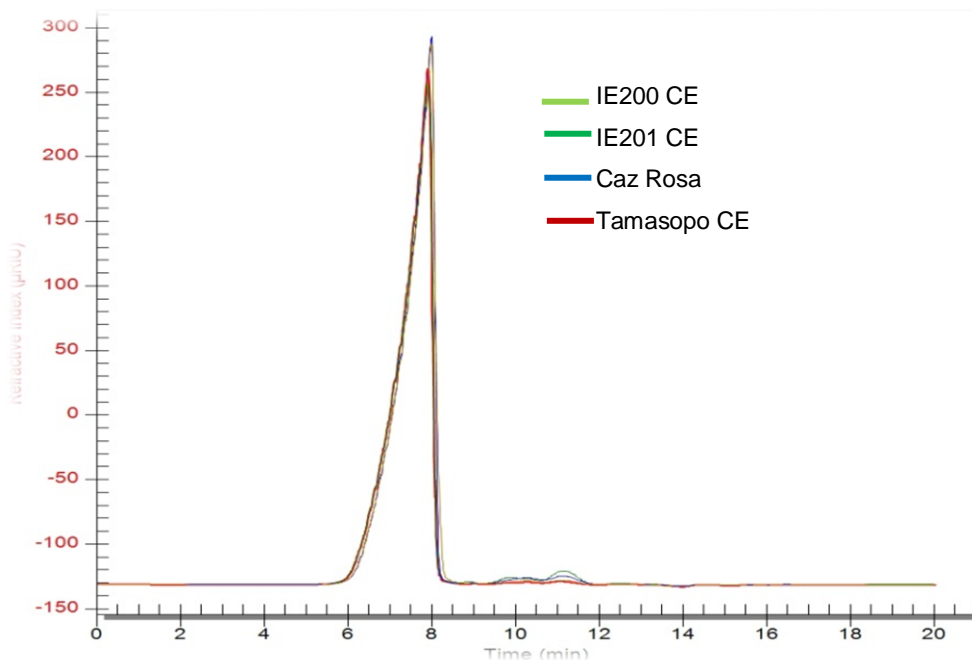


Figura 15. Cromatogramas de extractos de polisacáridos hidrolizados con H_2SO_4 .

En la Figura 16 se muestran cromatogramas de extractos crudos de polisacáridos de la cepa Caz Rosa hidrolizados por separado con HCl, TCA y TFA, muestran un comportamiento similar en el tiempo de retención de 7.07, 6.58 y 7.46, respectivamente que al igual que los hidrolizados anteriores y de acuerdo con estos tiempos de retención, los extractos tienen entre sus componentes celobiosa, sacarosa y maltosa, todos disacáridos.

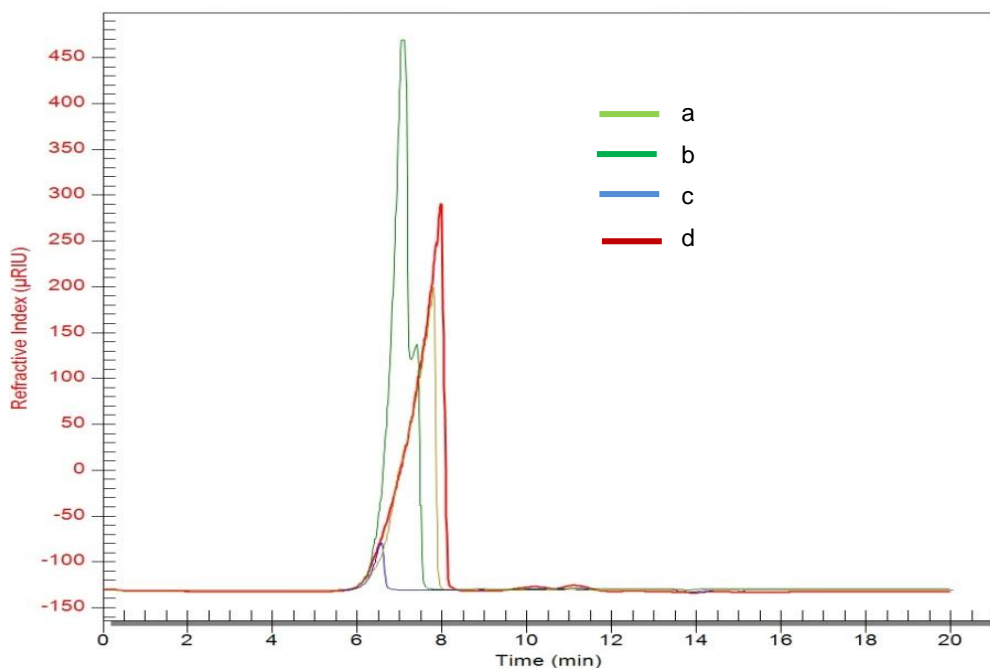


Figura 16. Cromatogramas de extracto de Caz Rosa hidrolizados con diferentes ácidos. a): H₂SO₄, b) HCl, c) TCA y d) TFA.

6.3.3. Espectroscopía de Infrarrojo (IR)

Por otro lado, la identificación de grupos funcionales presentes en los extractos crudos de polisacáridos por medio de espectroscopia infrarrojo se ha reportado en diferentes fuentes bibliográficas, ya que es considerada como una herramienta útil para la detección de la interacción entre grupos funcionales en mezclas de polímeros. Por lo que en el presente trabajo, se hace un análisis comparativo de espectros obtenidos de bibliografía con los de extractos crudos de polisacáridos concentrados por evaporación y secado por aspersión, hidrolizados y sin hidrolizar.

En la Figura 17 se muestran los IR de los extractos crudos de polisacáridos concentrados por evaporación de las cepas IE200, IE201, Caz Rosa y Tamasopo. Se puede observar la presencia de un pico amplio alrededor de 3300 cm⁻¹ característico del grupo OH, al igual que los estiramientos -CH₂ que son alrededor de 2974 cm⁻¹, los picos de absorción fuerte cerca de 1625 cm⁻¹ y uno débil alrededor de 1400 cm⁻¹ indican la presencia de grupos carboxilo; además la

presencia de bandas entre 1049 y 1274 cm^{-1} son características de piranósidos y representan los enlaces éter que unen a los monosacáridos (Feng *et al.*, 2007; Dalonso *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2011).

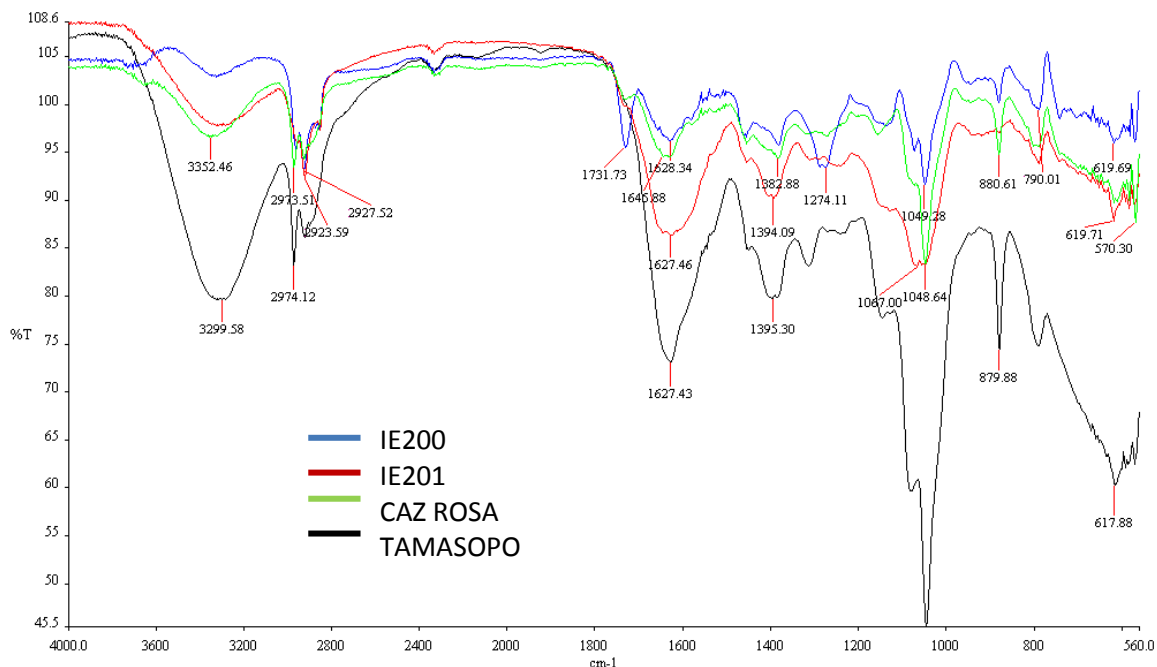


Figura 17. Espectro infrarrojo de extractos crudos de polisacáridos concentrados por evaporación sin hidrolizar.

En la Figura 18 se muestran los IR de los extractos crudos de polisacáridos secado por aspersión sin hidrolizar, de las cepas IE200, IE201, Caz Rosa y Tamasopo se puede observar la presencia del grupo OH, al igual que los estiramientos $-\text{CH}_2$ que son alrededor de 2900 cm^{-1} , los picos de absorción fuerte cerca de 1619 cm^{-1} y uno débil alrededor de 1433 cm^{-1} indican la presencia de grupos carboxilo y la presencia de bandas entre 900 y 1200 cm^{-1} , que son características de los polisacáridos y que representan los enlaces éter que unen a los monosacáridos (Dalonso *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2011).

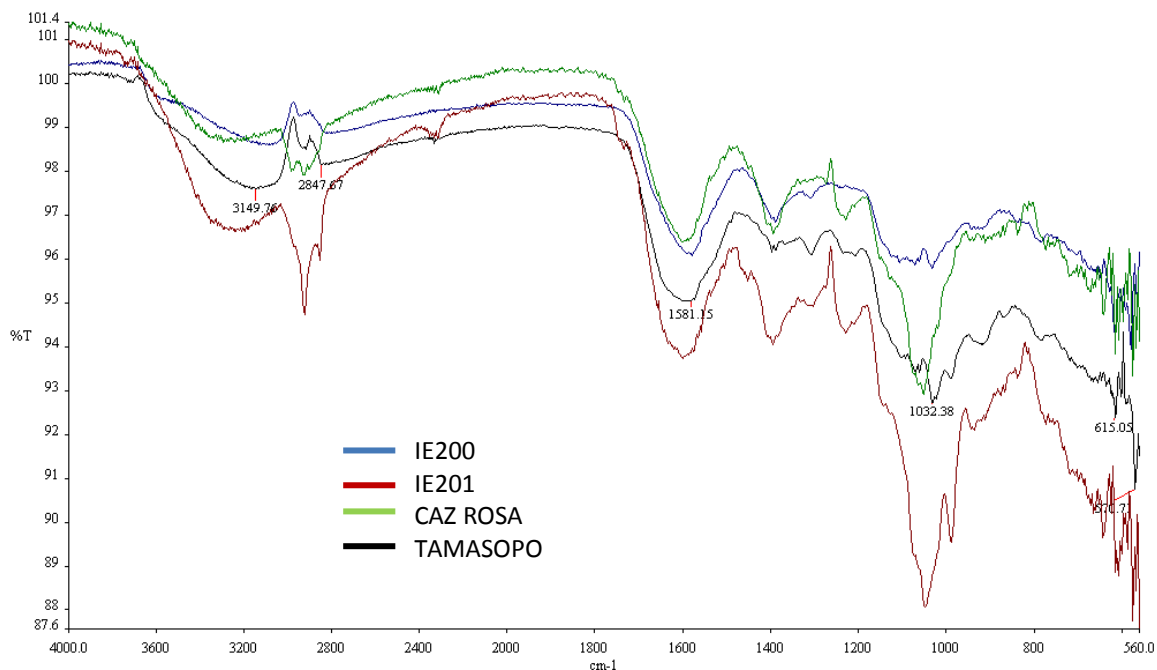


Figura 18. Espectro infrarrojo de extractos crudos de polisacáridos concentrados por secado por aspersión sin hidrolizar.

En la Figura 19 se muestran los IR de los extractos crudos de polisacáridos concentrados por secado por aspersión hidrolizados, de las cepas IE200, IE201, Caz Rosa y Tamasopo se puede observar la presencia del grupo OH alrededor de 3300 cm^{-1} , los picos de absorción fuerte cerca de 1619 cm^{-1} y uno débil alrededor de 1433 cm^{-1} indican la presencia de grupos carboxilo (Dalonso *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2011).

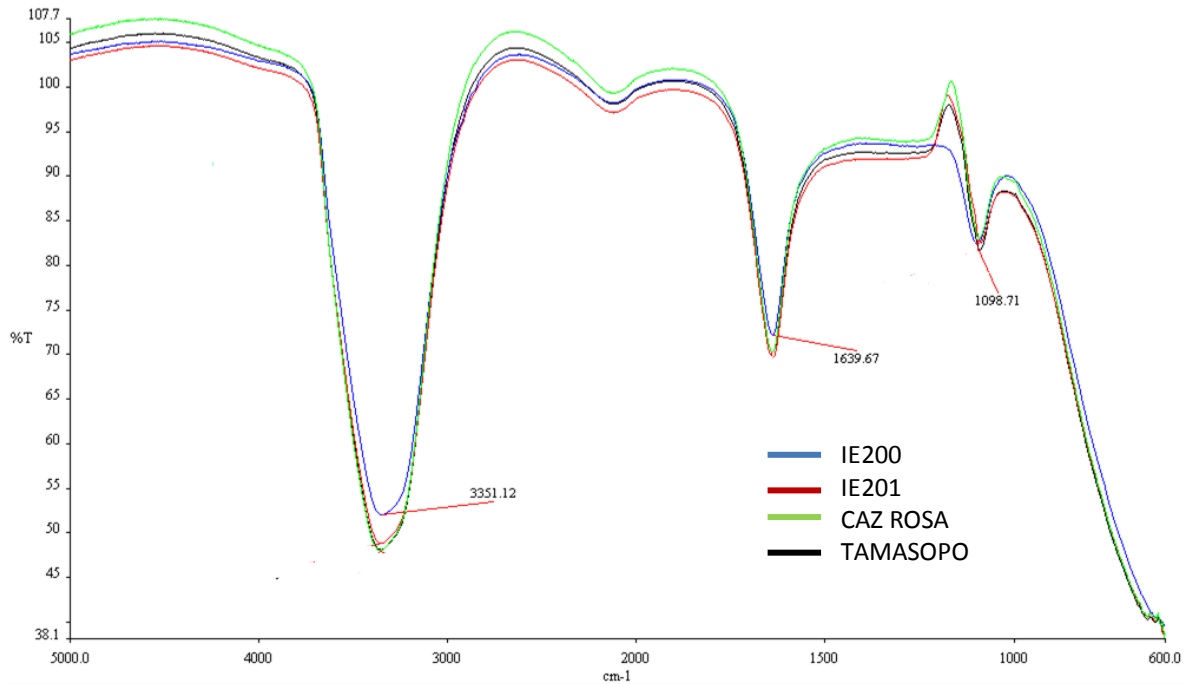


Figura 19. Espectro infrarrojo de extractos crudos de polisacáridos concentrados por evaporación hidrolizados.

En la Figura 20 se muestran los IR de los extractos crudos de polisacáridos concentrados por secado por aspersión hidrolizados, de las cepas IE200, IE201, Caz Rosa y Tamasopo se puede observar la presencia del grupo OH alrededor de 3500 cm^{-1} , los picos de absorción fuerte cerca de 1619 cm^{-1} y uno débil alrededor de 1433 cm^{-1} indican la presencia de grupos carboxilo (Dalonso *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2011).

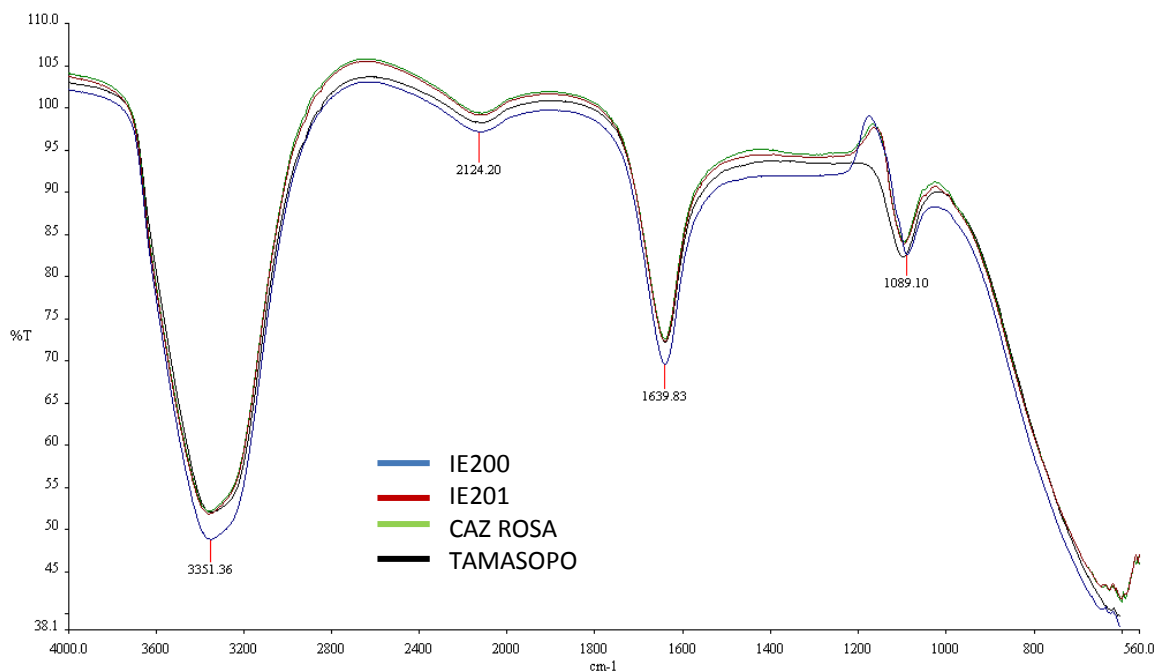


Figura 20. Espectro infrarrojo de extractos crudos de polisacáridos concentrados por secado por aspersión hidrolizados.

Por lo que al comparar los cromatogramas obtenidos con los reportados en bibliografía (ver Figura 21 de Xia *et al.*, 2011), éstos últimos también muestran la presencia de grupos hidroxilo, una banda débil cerca de 2920 cm^{-1} que muestra la vibración de enlace C-H, además los picos de absorción fuerte cerca de 1619 cm^{-1} y uno débil alrededor de 1433 cm^{-1} indican la presencia de grupos carboxilo, que son bandas características de absorción de los ácidos urónicos y la banda a 885 cm^{-1} se atribuye a las β -piranosas en polisacáridos (Xia *et al.*, 2011), con lo que se concluye que este compuesto está formado por polisacáridos, proteínas y ácidos urónicos. Además según (Sun y Liu, 2009) las bandas en la región at 846.36 cm^{-1} y 887.26 cm^{-1} indican la presencia simultánea de α - y β -configuraciones. En otro estudios se reporta que las bandas entre 1300 y 1000 se deben a vibraciones estrechas de anillos de piranosa (Cai *et al.*, 2008). La presencia de las dos bandas $848.6\text{--}849.02$ y $822.99\text{--}823.38\text{ cm}^{-1}$, sugieren la presencia de enlaces α -(1 \rightarrow 3), lo que según indica la presencia de α -(1 \rightarrow 3)-D-glucanos (Wiater *et al.*, 2011). Y las vibraciones de 1200 a 900 cm^{-1} muestran enlaces característicos de los polisacáridos (Dalonso *et al.*, 2010).

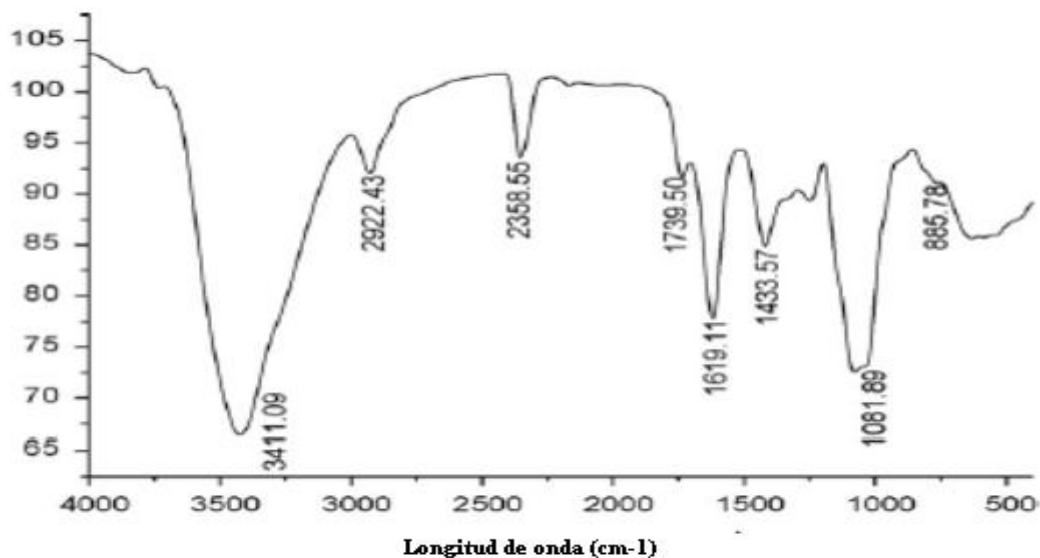


Figura 21. IR de polisacárido soluble en agua unido a proteína, obtenido de cuerpos fructíferos de *Pleurotus sajor saju* (Tomado de Xia *et al.*, 2011).

6.3.4. $^1\text{HRMN}$

Para realizar el $^1\text{HRMN}$, se utilizó el extracto en polvo concentrado por evaporación, sin hidrolizar de la cepa Caz Rosa, el espectro obtenido se muestra en la Figura 22.

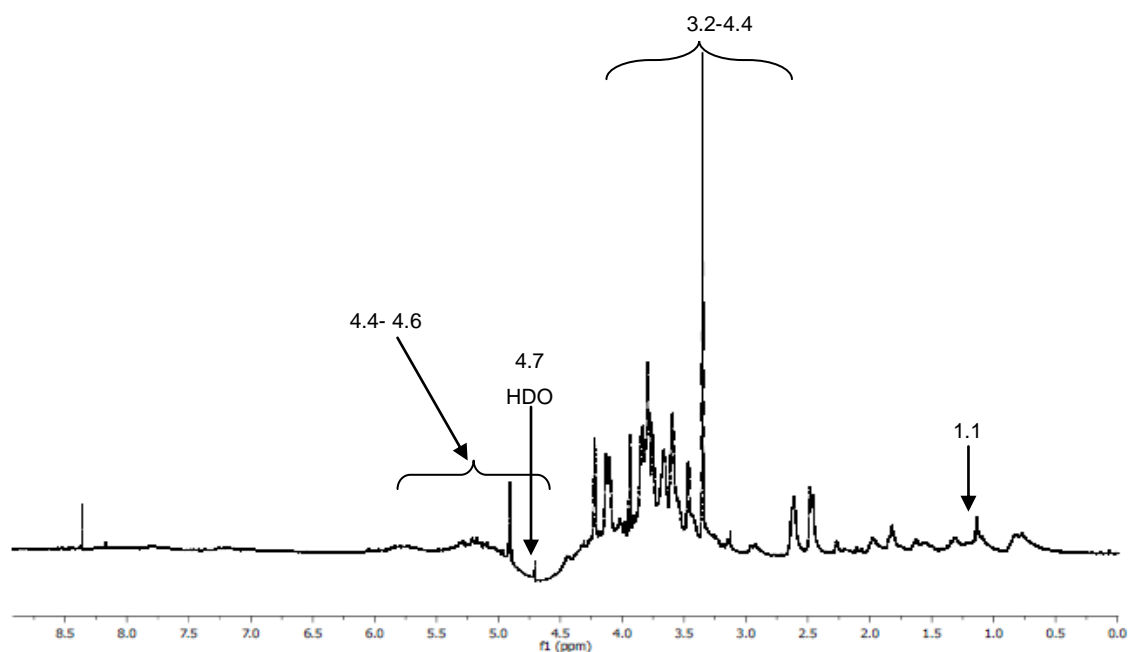


Figura 222. $^1\text{HRMN}$ de extracto crudo de polisacárido de la cepa Caz Rosa.

En la Figura 22 se observa similitud con los espectros presentados por Palacios *et al.*, (2012), para tres fracciones de polisacáridos cuyos espectros se muestran en la Figura 23. En el espectro obtenido en este trabajo, se obtuvieron picos alrededor de 1.1 ppm el cual se atribuye al grupo CH₃ (Pan *et al.*, 2012). Otros picos mostrados en el espectro están en el intervalo de 3.2 a 3.4 ppm relacionados con señales comunes para anillo glucosídico y señales de 4.4 a 5.6 ppm se atribuyen a glucósidos y la señal presente en 4.7 ppm en todos los espectros se debe al agua mono-deuterada HDO (Palacios *et al.*, 2012). Mientras que la señal presente a 5.145 ppm sugirió la presencia de una α configuración, para el caso de la fracción PC de Palacios *et al.*, 2012, y en nuestro espectro se pueden observar señales en ese espacio. Mientras que los picos a 4.96 ppm y 5.10 ppm se asignan a grupos OH y las señales correspondientes a H2 y H6 de monosacáridos las cuales probablemente estarían superpuestas con las α -galactopiranosas (Palacios *et al.*, 2012).

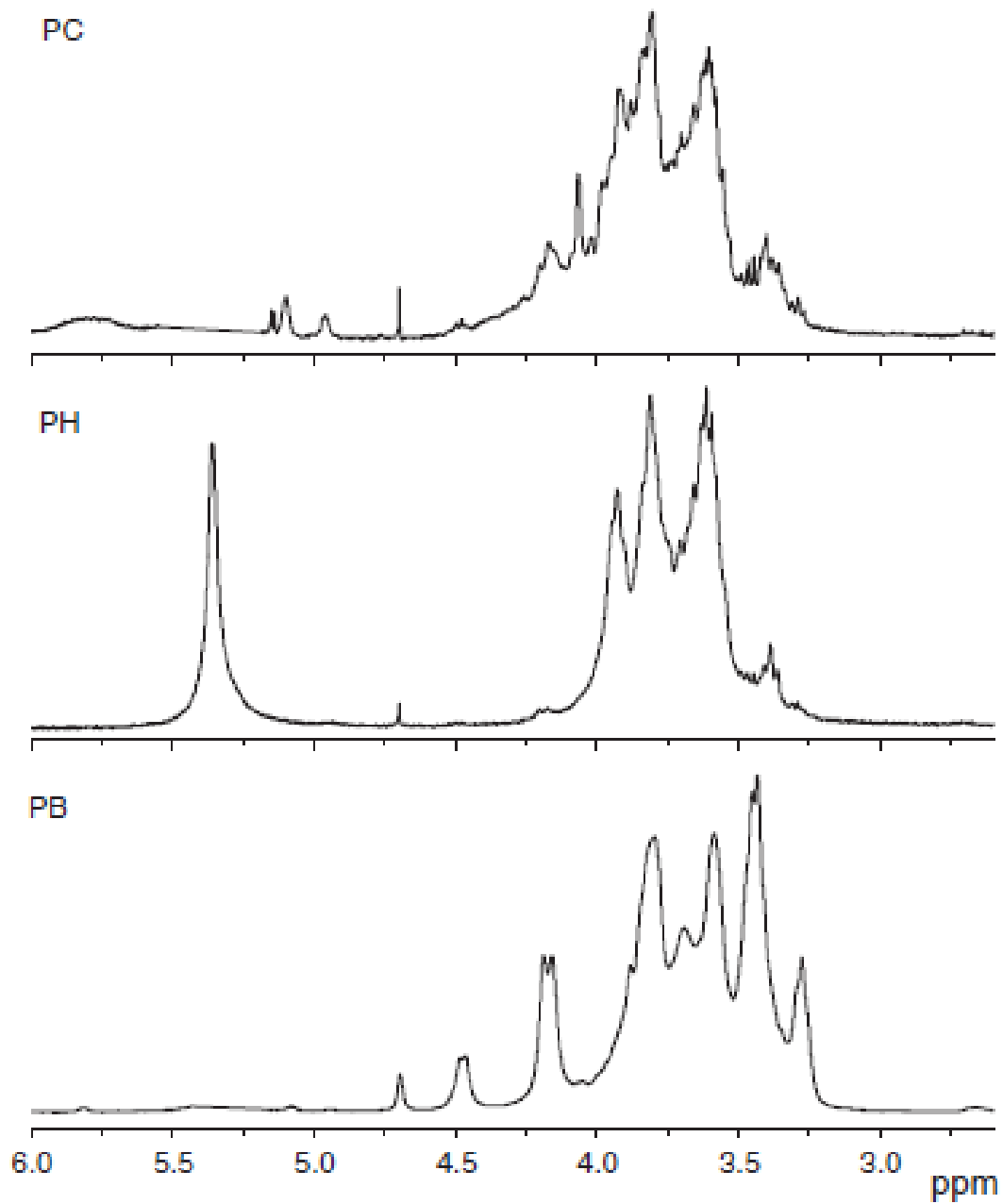


Figura 23. Espectro de ¹HRMN a 400 Hz de polisacáridos aislados de tres fracciones (PC, PH y PB) de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* (Palacios *et al.*, 2012).

Todas las descripciones de los picos de los cromatogramas de HRMN se encuentran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Propuesta de asignación de ^1H RMN para los residuos de tres fracciones de polisacáridos aislados de *Pleurotus ostreatus* con desplazamientos químicos aislados.

Fracción	Residuo	H1 (ppm)	H2 (ppm)	H3 (ppm)	H4 (ppm)	H6 (ppm)	H6a/H6b (ppm)
PC	α -Galp	5.145	3.405	4.171	3.601	3.80	3.921/3.703
PH	α -GlcP	5.359	3.386	3.928	3.615	3.839	3.812
PB	α -GlcP	4.474	3.277	4.175	3.446	3.586	3.800/3.689
Extracto Caz Rosa		1.1	3.2-4.4	4.4-4.6			

(Modificado de Palacios *et al.*, 2012).

Además en la Figura 22 del extracto crudo de la cepa Caz Rosa, se sugiere la presencia de grupo CH_3 (1.1-1.3 ppm), esto de acuerdo a los observado en el espectro de la Figura 24, siendo también similar para el del extracto de *G lucidum*.

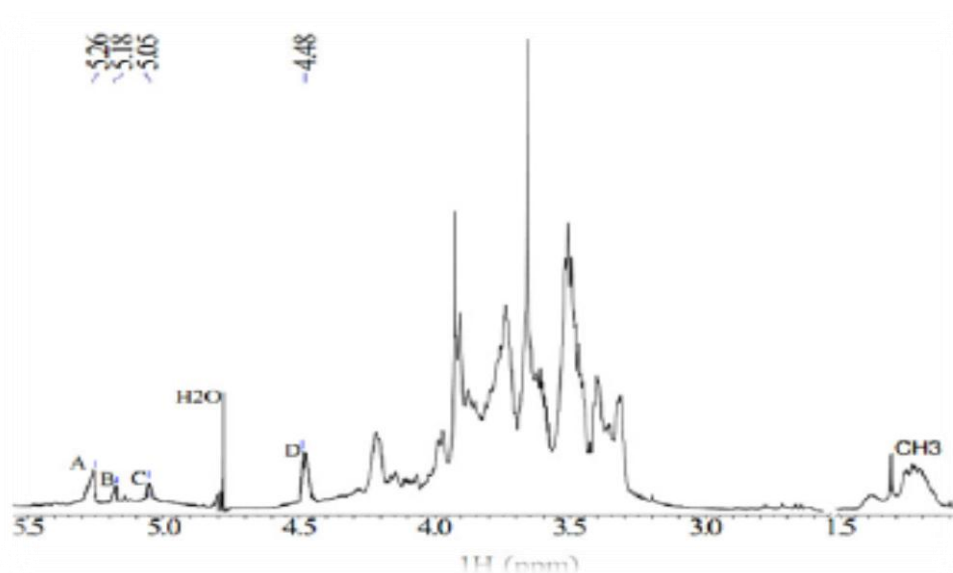


Figura 24. ^1H RMN de un hetero-polisacárido aislado de cuerpos fructíferos de *Ganoderma lucidum* (Tomado de Pan *et al.*, 2012).

6.4. Evaluación de actividad biológica

6.4.1. Evaluación de la actividad antibacteriana

En el Cuadro 11, la mayoría de los extractos crudos de polisacáridos formaron halos de inhibición sobre la bacteria *S. typhi*, a excepción de los extractos crudos de polisacáridos concentrados por evaporación (CE) de las cepas IE201 y Caz Rosa. El ANOVA de una vía indicó diferencia estadísticamente significativa ($F_{(12,17)}=13.63$, $p=0.0001$).

Cuadro 11. Promedio de halos de inhibición de los extractos crudos de polisacáridos sobre la bacteria *S. typhi*.

Cepa	Halo de inhibición (mm)	
	Concentrado por evaporación (8 mg/sensidisco)	Concentrado por secado por aspersión (8 mg/sensidisco)
IE200	8.29±0.17 ^c	7.54±0.04 ^b
IE201	Np	7.73±0.45 ^b
Caz Rosa	Np	6.79±0.07 ^a
Tamasopo	8.98±0.00 ^d	7.26±0.14 ^b

Nota: Valor promedio ± ESM, para n=3. np: indica que el extracto no presentó inhibición.

La prueba post hoc de Duncan formó cuatro grupos. En el grupo **a** con menor halo de inhibición se encontró la cepa Caz Rosa secado por aspersión (CSA), seguido por el grupo **b** con las cepas Tamasopo CSA, IE200 CSA e IE201 CSA, le siguen el grupo **c** y **d**, con las cepas IE200 CE y Tamasopo CE, respectivamente.

En la Figura 25 se muestran los halos de inhibición para extractos crudos de polisacáridos obtenidos por reducción de volumen por evaporación y reducción de volumen por secado por aspersión, sobre *S. typhi*.

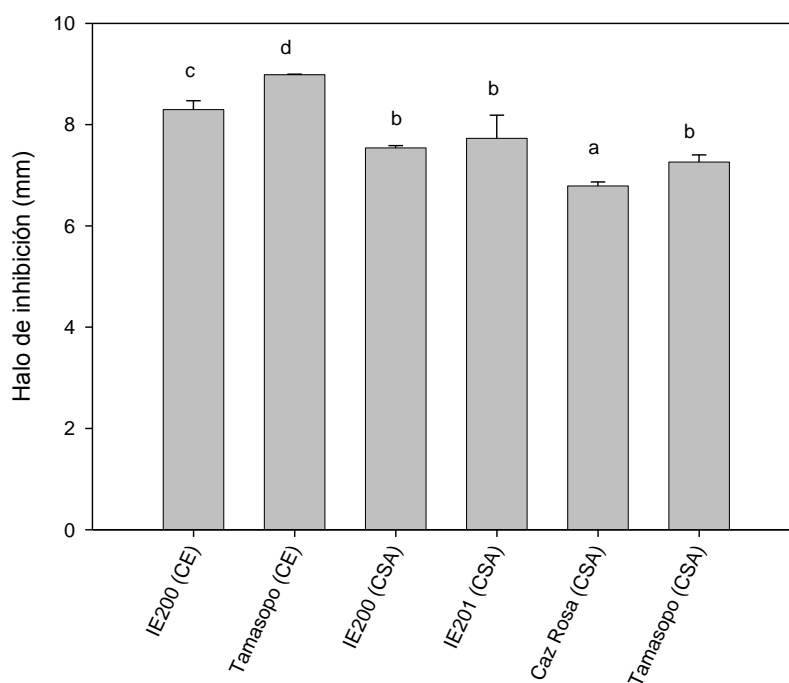


Figura 25. Halo de inhibición de los extractos crudos de polisacáridos sobre *S. typhi*. CE: extracto concentrado por evaporación, CSA: extracto concentrado por secado por aspersión. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas por columnas (post hoc Duncan, $p < 0.05$).

Los extractos crudos de polisacáridos que presentaron mayor halo de inhibición sobre *S. typhi* fueron los concentrados por evaporación de Tamasopo e IE200, con valores de 8.97 y 8.29 mm, respectivamente. Mientras que los extractos crudos de polisacáridos concentrados por secado por aspersión de las cepas IE201, IE200, Tamasopo y Caz Rosa, tuvieron halos de inhibición de 7.73, 7.54, 7.26 y 6.79 mm, respectivamente. El efecto positivo sobre *S. typhi* de todos los concentrados por aspersión, probablemente se deba a que este tipo de técnica conserva las propiedades funcionales de los metabolitos (Suihko, *et al.*, 2005), mientras que durante la evaporación los extractos estuvieron expuestos al ambiente, además el tiempo de evaporación fue mucho mayor, por lo que el extracto estuvo más tiempo expuesto a altas temperaturas. De acuerdo con la clasificación de susceptibilidad realizada por Prescott y Harley (2002), la bacteria *S. typhi* es **resistente** a los extractos crudos de polisacáridos, ya que el halo de inhibición es menor a 12 mm;

y de acuerdo con la clasificación las bacterias son **resistentes** si el halo de inhibición es ≤ 12 mm, de **susceptibilidad Intermedia** cuando el halo de inhibición es de 13–17 mm; y **susceptibles** si el halo de inhibición es ≥ 18 mm.

En estudios anteriores de inhibición se utilizaron cultivos líquidos para obtener extractos de polisacáridos del género *Pleurotus*, Trejo (2011) reporta efectos de inhibición para la mayoría de las bacterias que utilizó, entre ellas *B. subtilis*, *S. aureus* 1, *E. agglomerans*, *S. dysenteriae*, *K. rhinoescleromatis*, *Y. enterocolitica*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* 2, pero no se presentó efectos sobre *S. typhi*.

Por otro lado García (2012), reportó halos de inhibición para las mismas bacterias reportadas por Trejo (2011), incluyendo *E. coli* pero no hubo inhibición para *K. rhinoescleromatis*. En el estudio realizado por García (2012), se reportó efecto de inhibición de los extractos crudos de polisacáridos obtenidos del cultivo líquido de la cepa IE201, las bacterias con halos de inhibición para este extracto fueron *E. agglomerans*, *E. coli*, *S. aureus* 1, *S. aureus* 2 y *S. dysenteriae*. Y por último en otro estudio con extracto de polisacárido purificado de *Lygodium japonicum* (helecho), se obtuvieron halos de inhibición de 12, 13 y 23 mm sobre *E. coli*, *S. typhi*, y *N. asteroides* a una concentración de 20 mg/mL (Li *et al.*, 2006).

La CMI de los extractos crudos de polisacáridos evaluados, que provocaron halos de inhibición es mayor a 12 mg/mL. No se ha reportado CMI, para extractos crudos de polisacáridos obtenidos de hongos, sin embargo Zhu *et al.*, (2012), utilizó polisacáridos obtenidos del sustrato usado en la producción de setas, de lo cual obtuvo que la CMI fue de 12.5, 25 y 100 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli*, *S. aureus* y *Sarcina lutea*, respectivamente. Por otro lado, al evaluar la CMI de un polisacárido aislado a partir de caldo de *Streptomyces virginia* H03 mostró fuerte actividad antibacteriana, de ahí que se sugiera el uso de polisacáridos como antimicrobianos para el deterioro y contaminación de alimentos. La CMI para las bacterias *S. aureus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Z. bailii* y *C. utilis* fue de 15.6, 31.3, 31.3, 31.3, 125 y 125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. De este estudio se indica que los posibles objetivos de acción del polisacárido en bacterias es la pared celular (filtración de proteínas), la membrana citoplásmica (permeabilidad de

la membrana citoplasmática) y el ADN (unión a ADN), esto de acuerdo con fotos tomadas por microscopía electrónica (He *et al.*, 2010). Este efecto positivo sobre las bacteria utilizadas, probablemente se puede deber a que los polisacáridos en ambos estudios fueron purificados.

6.4.2. Evaluación de la actividad de captación de radicales libres DPPH (1,1-diphenil-2-picrylhidrazil)

Para la determinación de la actividad de captación de radicales libres DPPH de los extractos crudos de polisacáridos se obtuvieron las siguientes gráficas, la Figura 26a para determinar la EC₅₀ y la Figura 26b para determinar el porcentaje de captación de radicales libres, de cada uno de los extractos crudos de polisacáridos.

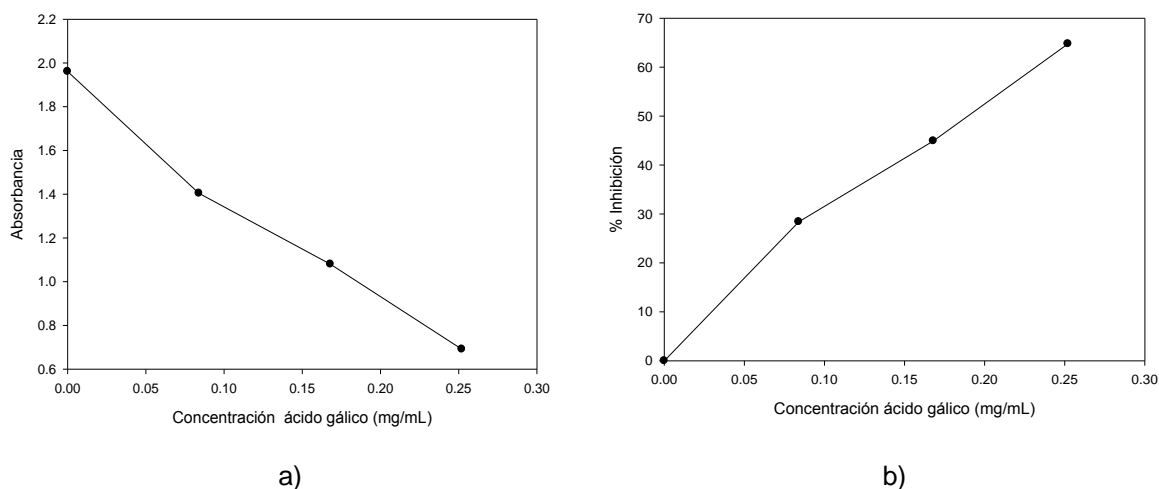


Figura 26. Curvas patrón de ácido gálico por el método DPPH a) para concentración en equivalentes de ácido gálico; b) para porcentaje de inhibición.

De la Figura 26a, se obtuvo la Ecuación 7, que se utilizó para calcular la concentración en equivalentes de ácido gálico de los extractos crudos de polisacáridos respecto a la concentración de ácido gálico utilizado como patrón, con un valor de R=0.947.

$$x = \frac{y - 1.9041}{-4.9214}$$

Ecuación 7

De la Figura 26b, se obtuvo la Ecuación 8, que se utilizó para calcular el porcentaje de captación de radicales libres, de los extractos crudos de polisacáridos respecto a la concentración de ácido gálico utilizado como patrón, con un valor de R=0.947.

$$x = \frac{y - 2.9016}{250.97} \quad \text{Ecuación 8}$$

La concentración en equivalentes de ácido gálico y el porcentaje de captación de radicales libres de los extractos crudos de polisacáridos se muestran en el Cuadro 12. El ANOVA de una vía indicó que existen diferencia estadísticamente significativa ($F_{(16,23)}=25.4$, $p=0.0001$), para ambos resultados. El ensayo está basado en la reducción de DPPH en presencia de un antioxidante que dona un hidrógeno, obteniéndose un complejo no radical DPPH-H. El antioxidante es capaz de reducir el radical DPPH de color púrpura a diphenylpicrylhydrazina de color amarillo.

Cuadro 12. Promedio de porcentaje de inhibición y concentración de ácido gálico en extractos crudos de polisacáridos.

Cepa	Porcentaje de captación de radicales libres		Concentración de ácido gálico (mg/mL)	
	Concentrado por evaporación	Concentrado por secado por aspersión	Concentrado por evaporación	Concentrado por secado por aspersión
IE200	84.76±0.67	75.86±1.08	0.32±0.00	0.29±0.00
IE201	63.66±3.35	77.26±0.80	0.24±0.01	0.29±0.00
Caz Rosa	73.90±0.72	80.90±0.20	0.28±0.00	0.31±0.00
Tamasopo	82.83±0.40	81.83±0.17	0.31±0.00	0.31±0.00

Nota: Valor promedio ± ESM, para n=3.

Con la prueba post hoc de Duncan se formaron cuatro grupos, en el grupo **a** con menos porcentaje de captación de radicales libres encontró la cepa IE201 CE, seguido del grupo **b** con las cepas Caz rosa CE, IE200 CSA e IE201 CSA, luego el grupo **c** con las cepa Caz Rosa CSA y por último en el grupo **d** los extractos de las cepas con mayor porcentaje de captación de radicales libres fueron Tamasopo CSA, IE200 CE y Tamasopo CE.

En la Figura 27 se muestran los porcentajes de captación de radicales libres de los extractos crudos de polisacáridos concentrados por evaporación y por secado por aspersión. Se puede observar que los extractos que tienen mayor porcentaje de captación de radicales libres son IE200 CE (84.76 %), Tamasopo CE (82.83%) y Tamasopo CSA (81.83%).

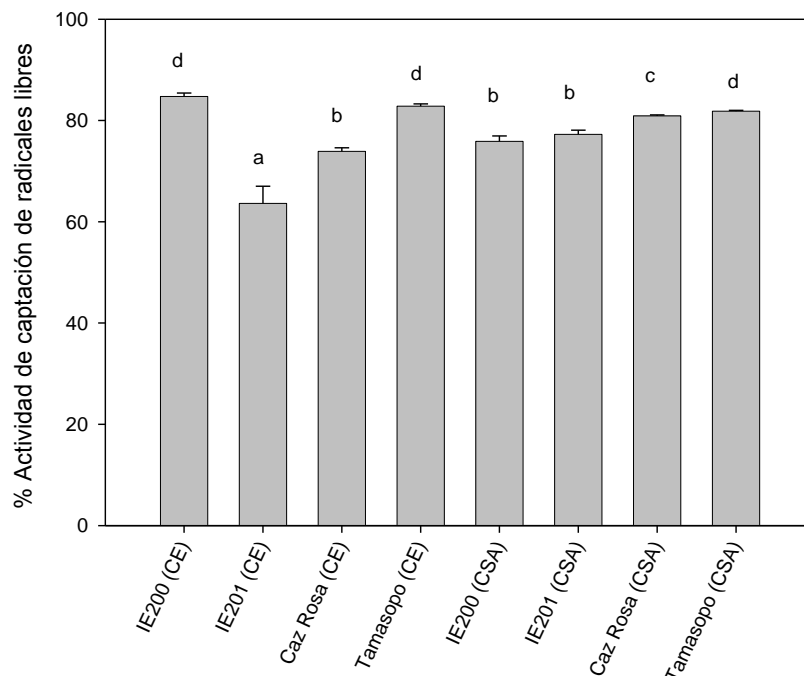


Figura 27. Porcentaje de actividad antioxidante de los extractos crudos de polisacáridos. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas por columnas (post hoc Duncan, $p < 0.05$).

Todos los extractos crudos de polisacáridos obtenidos en este trabajo, tienen efecto antioxidante desde 63 % hasta 84 % y una concentraciones en equivalentes de ácido gálico que van de 0.24 a 0.34 mg/mL , mientras que Maity *et al.*, (2011) reportaron por el mismo método, un porcentaje máximo de captación de radicales libres de 65 % a una concentración de 8 mg/mL y un valor de EC_{50} de 6.2 mg/mL se evaluaron los extractos polisacáridos purificados de un hongo híbrido de *Pleurotus florida* y *Calocybe indica* variedad APK2. En otro estudio se utilizó un polisacárido y un complejo polisacárido-proteína soluble en agua obtenidos de

cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* los resultados mostraron un porcentaje de actividad captadora de DPPH de 57.7 y 82.4 %, respectivamente a 8 mg/mL. La viabilidad del mecanismo antioxidante se debió a que el proteoglicano actuó como donador de electrones y puede reaccionar con radicales libres para convertirlos en productos más estables (Xia *et al.*, 2011). Cabe mencionar que los extractos de polisacáridos, de los cuales se reporta actividad antioxidante en otras referencias, fueron purificados.

VII. CONCLUSIONES

1. No hubo diferencias estadísticamente significativas en las cuatro cepas durante la primera cosecha para la Eficiencia Biológica (%EB), Tasa de Producción (%TP) y Rendimiento (%R). Pero si para el Peso Medio, siendo Caz Rosa la que tuvo el mayor valor de Pm (10.65).
2. Con la caracterización la CCF indica que los extractos crudos de polisacáridos, tienen entre sus componentes manosa, xilosa, arabinosa, maltosa y celobiosa, por HPLC se tiene que los componentes pueden ser celobiosa, sacarosa y maltosa.
3. Los extractos con mayor porcentaje de azúcares totales son Tamasopo CE e IE200 CSA con 44.46 y 35.41 %, respectivamente.
4. Los IR obtenidos de los extractos crudos de polisacáridos sin hidrolizar, muestran bandas características de los polisacáridos entre 900 y 1200 cm^{-1} , al igual que la $^1\text{HRMN}$ presenta señales características de los polisacáridos reportados para *Ganoderma lucidum* y *P. ostreatus*.
5. Los extractos crudos de polisacáridos, mostraron halos de inhibición sobre *Salmonella typhi*. Los extractos que provocaron mayores halos de inhibición fueron los concentrados por evaporación (CE), Tamasopo CE (8.98 mm), IE200 CE. La concentración mínima inhibitoria (CMI) para todos los extractos se consideró mayor a 12 mg/mL.
6. Todos los extractos crudos de polisacáridos obtenidos en este trabajo, tienen efecto antioxidante que va desde 63 % hasta 84 %, y una concentración en equivalentes de ácido gálico de 0.24 a 0.34 mg/mL.
7. La RMN presenta señales características de los polisacáridos reportados para *Ganoderma lucidum* y *P. ostreatus*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, D. L. (2008). Producción de inóculo líquido para el cultivo de *Pleurotus* spp. Tesis de Maestría, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. 78 p.
- Alexopolus, C. y Mins, C. (1985). Introducción a la Micología. Ediciones Omega A. A. (1 ed). Barcelona, España. pp 470.
- Andrews, J. H. y Harris, R. F. (2007). Environmental and Microbial Relationships. Capítulo 1. In *The Mycota IV*. C. P. Kubicek, y I. S. Druzhinina. Ed. Springer, Berlin, España. pp. 3-14.
- Bailey, S., Finegold, S. y Baron, E. (1991). Diagnóstico Microbiológico. Médica Panamericana (7 ed.). Buenos Aires, Argentina:
- BeMiller, J. N. (2008). Polysaccharides: Occurrence, Significance, and Properties. Capítulo 6. In: *Glycoscience*. Fraser-Reid, B.; Tatsuta, K.; Thiem, J (ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 1414-1432.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, (72), 248-254.
- Cai, W., Gu, X. y Tang, J. (2008). Extraction, purification, and characterization of the polysaccharides from *Opuntia milpa alta*. *Carbohydrate Polimers*, (71): 403-410.
- Carbonero, E., Gracher, P. A., Smiderle, R. y Rosado, F. (2006). A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. *Carbohydrate Polymers*, (66), 252-257.
- Carlile, J. M., Watkinson, C. S. y Gooday, W. G. (2001). *The Fungy* (2a ed.). Academic Press. San Diego, California. p.1-7, 11-65.
- Chen, S., Wang, J., Xue, C., Li, H., Sun, B., Xue, Y. y Chai, W. (2010). Sulfation of a squid in polysaccharide and its inhibitory effect on tumor cell Metástasis. *Carbohydrate Polymers*, (81): 560-566.

- Choi, D., Cha, W., Kang, S. y Lee, B. (2004). Effect of *Pleurotus ferulae* extracts on viability of human lung cancer and cervical cancer cell lines. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9 (5): 356-361.
- Costa, M. R. (2013). Determinación de los parámetros de producción y las características morfológicas de cepas nativas de *Pleurotus* spp. Tesis. Universidad Interserrana del Estado de Puebla-Ahuacatlán. Puebla, México, 75 p.
- Dalonso, N., Souza, R., Silveira, M.L., Ruzza, A.A., Marce, W.T., Wisbeck E. y Aparecida, F. (2010). Characterization and Antineoplastic Effect of Extracts Obtained from *Pleurotus sajor-caju* Fruiting Bodies. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, (160): 2265-2274.
- 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 (3): 350-356.
- Feofilova, E. P. (2004). Mycology at the Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences: History and Prospects for the Future. *Microbiology*, 73 (5): 578-589.
- Fux, A. C., Stoodley, P., Shirliff, M. y Costerton, J. (2009). The Functional Resistance of Bacterial Biofilms Chapter 11. In *Antimicrobial Drug Resistance, Volumen 1*. D. Mayers (Ed). Humana Press, a part of Springer Science+Business Media. Los Angeles, CA. pp. 121-131
- García, C. F. (2012). Determinación de la actividad biológica de extractos polisacáridos en micelio de *Pleurotus* spp. Proyecto de Investigación. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. 66 p.
- Garzón, G. J. y Cuervo, A. J. (2008). Producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia. *Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 6 (10): 126-140.

- He, F., Yang, Y., Yang, G. y Yu, L. (2010). Studies on antibacterial activity and antibacterial mechanism of a novel polysaccharide from *Streptomyces virginia* H03. *Food Control*, (21): 1257–1262.
- Huerta, G., Martínez-Carrera, D., Sánchez, J. y Leal-Lara, H. (2009). Grupos de interesterilidad y productividad de cepas de *Pleurotus* de regiones tropicales y subtropicales de México. *Revista Mexicana de Micología*, 30: 31-42.
- Iwalokun, B., Usen, U., Otunba, A. y Olunkoya, D. (2007). Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. *African Journal of Biotechnology*, 6 (15): 1732-1739.
- Jayakumar, T., Thomas, P., Sheu, J. y Geraldine, P. (2011). In-vitro and in-vivo antioxidant effects of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Food Research International*, (44): 851–861.
- Jiménez-Hernández, J. (2000). Evaluación de la productividad y coloración de esporóforos de diferentes cepas de *Pleurotus* spp. Tesis Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Kanauchi, M., Ishikura, I., y Bamforth, C.W. (2011). β -Glucans and Pentosans and their degradation products in commercial beers. *Journal of the institute of brewing*, 117(1): 120–124.
- Kirk, P., Cannon, P., David, J. y Stalpers, J. (2001). *Dictionary of the fungus*. CABI Publishing. (9 ed.). New York.
- Koneman, E., Winn, W., Allen, S., Janda, W., Procop, G. y Srecekberger, P. (2004). *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Medica-Panamericana. (5 ed.). Argentina, Buenos Aires.
- Li, L., Ng, T. B., Song, M., Yuan, F., Liu, Z. K., Wang, C. L., Jiang, Y., Fu, M. y Liu, F. (2007). A polysaccharide–peptide complex from abalone mushroom (*Pleurotus abalonus*) fruiting bodies increases activities and gene expression of antioxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in senescence-accelerated mice. *Appl Microbiol Biotechnol.*, (75): 863-869.

- Li, X., Zhou, A. y Han, Y. (2006). Anti-oxidation and anti-microorganism activities of purification polysaccharide from *Lygodium japonicum* in vitro. *Carbohydrate Polymers*, (66): 34–42.
- Maity, K., Kar (Mandal), E., Maity, S., K. Gantait, S., Das, D., Maiti, S., Maitu, T.K., Sikdarc, S.R. y Islama, S.S. (2011). Structural characterization and study of immunoenhancing and antioxidant property of a novel polysaccharide isolated from the aqueous extract of a somatic hybrid mushroom of *Pleurotus florida* and *Calocybe indica* variety APK2. *International Journal of Biological Macromolecules*, (48): 304-310.
- Maldonado, A. Y. (2007). Obtención de cepas híbridas de *Pleurotus* spp. por apareamiento de neohaplontes compatibles. Tesis de Maestría. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. 125 p.
- Marquez-López, J. L., Nevárez- Moorillón, G., Dávila- Sánchez, A., Rivera-Chavira, B. E. y González- Rangel, O. (2008). Efecto de la formación de biopelículas en la resistencia de bacterias aisladas de especímenes clínicos. Síntesis 48, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua.
- Martínez-Carrera, D. (1998). Oyster mushrooms. McGraw-Hill Yearbook of Science & Technology (1999). McGrawHill, Inc., Nueva York. 242-245. [<http://www.hongoscomestibles-latinoamerica.com/Mexico/COLPOS/A/9.pdf>].
- 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 comestibles. Capítulo 20. En *El Cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata, y H. Leal (Ed). ECOSUR CONACYT. México, D.F. (pp 20).
- Neira, A. Y. (2004). El valor nutritivo de la Fruta. *Boletín Técnico. POMACEAS. Universidad de Talca. 4* (4): 1-4.

- Palacios, I., García-Lafuente, A., Guillamón, E. y A., V. (2012). Novel isolation of water-soluble polysaccharides from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Carbohydrate Research*, (358): 72–77.
- Pan, D., Wang, L., Chen, C., Teng, B., Wang, C., Xu, Z., Hu, B. y Zhou, P. (2012). Structure characterization of a novel neutral polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *Food Chemistry*, (135):1097–1103
- Patra, S., Patra, P., K. Maity, K., Mandal, S. K., Bhunia, S., Dey, B., P. Devi, K. S., Khatua, S., Acharya, K., K. Maiti, T. y Islam, S. (2013.). A heteroglycan from the mycelia of *Pleurotus ostreatus*: structure determination and study of antioxidant propert. *Carbohydrate Research*, (368):16-21.
- Pham-Huy, L., He, H. y Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and healt. *Int J Biomedic Sci.*, (4): 89-96.
- Prescott, L. y Harley, J. 2002. Microbiología. Mc-Graw-Hill Interamericana, 5a. edición, España.
- Ragunathan, R. y Swaminathan, K. (2003). Nutritional status of *Pleurotus* spp. growm on various agro-wastes. *Food Chemistry* (80), 371-378.
- Ramos, L. E., Castañeda, C. B. y Ibáñez, V. L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *REV ACAD PERU SALUD*, 1 (15), 42-46.
- Royse, D. (1989). Factors influencing the production rate of *Shiitake*. *Mushroom J. Tropics* (9), 27-138.
- 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.
- Salmon, B.A., Richardson, A. y Pérez, I.A. (2010). Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? *Free Radical Biology & Medicine* (48), 642–655.

- Sanchéz, C. (2004). Modern aspects of mushroom culture technology. *Appl Microbiol Biotechnol* (64), 756–762.
- Shah, Z., Ashraf, M. y Ch, I. (2004). Comparative Study on Cultivation and Yield Performance of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on different Substrates (Wheat Straw, Leaves, Saw Dust). *Pakistan Journal of Nutrition* , 3 (3), 158-160.
- Suihko, E. J., Forbes, R. T. y Apperley, D.C. (2005). A solid-state NMR study of molecular mobility and phase separation in co-spray-dried protein–sugar particles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (25), 105–112
- Smiderle, F.R., Olsen, L.M., Carbonero, E.R., Marcon, R., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Santos, A.R.S., Torri, G., Gorin, P.A.J. y Lacomini, M. (2008). A 3-O-methylated mannogalactan from *Pleurotus pulmonarius*: Structure and antinociceptive effect. *Phytochemistry* , (9), 2731-2736.
- Sun, Y. y Liu, J. (2009). Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology*, (100), 983–986.
- Sun, Y., Li, T., Yan, J. y Liu, J. (2010). Technology optimization for polysaccharides (POP) extraction from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* by Box–Behnken statistical design. *Carbohydrate Polymers*, (80), 242–247.
- Synytsya, A., Mic̣kova, K., Synytsya, A., Jablonsky´, I., Spẹvac̣ek, J., Erban, V., Kovaṛikova, E. y C̣opikova, J. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, (76), 548-556.
- Tchierpe, M. J. y Hartmann, K. (1977). A comparison of diferent growing methods. *Mush. J.* (60), 404-416.
- Telles, B.S C., Sabry, A. D., Almeida-Lima, J., Costa, S.S.P.M., Melo-Silveira, R.F., Trindade, S.E., Sasaki, L.G., Wisbeck, E., Furlan, A.S., Leite, L.E. y Rocha, A.O.H. (2011). Sulfation of the extracellular polysaccharide produced by the

edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* alters its antioxidant, anticoagulant and antiproliferative properties in vitro. *Carbohydrate Polymers* , (85), 514-521.

Téllez, J. (2008). Obtención de metabolitos secundarios con interés farmacológico a partir de carpóforos de hongos del género *Pleurotus*. México, Proyecto de Investigación. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. 50 p.

Tong, H., Xia, F., Feng, K., Sun, G., Gao, X., Sun, L., Jiang, R. y Sun, X. (2009). Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology*, (100), 1682-1686.

Trejo, R. E. (2011). Obtención y evaluación biológica de polisacáridos a partir del cultivo líquido de micelio de *Pleurotus* spp. Proyecto de Investigación. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. 37 p.

U.S. Congress, Office of Technology Assessment, Impacts of Antibiotic-Resistant Bacteria, OTA-H-629 (Washington, DC: U.S. Government Printing Office, September 1995.

Valencia del Toro, G. (2002). Estudios sobre la expresión del color de los esporóforos de *Pleurotus* spp. por apareamiento de neohaplontes compatibles y progenies monospóricas. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Walker, H. G., Ricci, J. B. y Goodwin, J. C. (1965). Thin-Layer Chromatography of Sugar Beet Carbohydrates. *Journal of the A. S. S. B. T* , 13 (6), 503-508.

Wang, C., Sun, Z., Liu, Y., Zheng, D., Liu, X. y Li, S. (2007). Earthworm polysaccharide and its antibacterial function on plant-pathogen microbes in vitro. *European Journal of Soil Biology* (43), S135-S142.

Wang, Q., Li, H., Chen, T. y Han, J. (2012). Yield, polysaccharides content and antioxidant properties of *Pleurotus abalones* and *Pleurotus geesteranus*

- produced on asparagus straw as substrate. *Scientia Horticulturae* (134), 222–226.
- Wiater, A., Paduch, R., Pleszczyńska, M., Prochniak, K., Choma, A., Kandfer-Szerszeń, M. y Szczodrak, J. (2011). α -(1→3)-D-Glucans from fruiting bodies of selected macromycetes fungi and the biological activity of their carboxymethylated products. *Biotechnol Lett* (33), 787-795.
- Xia, F., Fan, J., Zhu, M. y Tong, H. (2011). Antioxidant effects of a water-soluble proteoglycan isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, (42), 402–407.
- Xiao, J., Huo, J., Jiang, H. y Yamamoto, K. (2011). Composition and characterization of an acidic polysaccharide from out-of-date tea leaves. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1-5.
- Xu, L.C. y Siedlecki, C. A. (2012). Submicron-textured biomaterial surface reduces staphylococcal bacterial adhesion and biofilm formation. *Acta Biomaterialia* (8), 72–81.
- Xu, X., Yan, H., Chen, J. y Zhang, X. (2011). Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances* (29), 667–674.
- Zadrazil, F. y Kurtzman, R. H. 1982. The biology of *Pleurotus* cultivation in the tropics. In: Chang, S.T. y Quio, T.H. (Ed). Tropical mushrooms. Biological nature and cultivation methods. The Chinese University Press, Hong Kong. 21-45 pp.
- Zanwar, A., Hegde, M. y Bodhankar, S. (2010). In vitro Antioxidant activity of ethanolic extract of *Linum usitatissimum*. *Pharmacology online*, (1), 683-696.
- Zhang, M., Cui, S., Cheung, P. y Wang, Q. (2007). Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology* (18), 4-19.
- Zhang, M., Zhang, L., Keung, P. y Choon, V. (2004). Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble polysaccharides isolated by hot water and

ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium*.
Carbohydrate Polymers (56), 123-128.

Zhu, H., Sheng, K., Yan, E., Qiao, J. y Lv, F. (2012.). Extraction, purification and antibacterial activities of a polysaccharide from spent mushroom substrate. *International Journal of Biological Macromolecules*, (50), 840– 843.-