

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



TESIS

Presentada para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

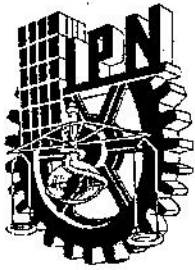
Por

**LETICIA AGUILAR DOROTEO
BIÓLOGA**

Producción de inóculo líquido para el cultivo de *Pleurotus* spp.

DIRECTOR DE TESIS: DR. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO.

México, D. F. Agosto del 2007.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

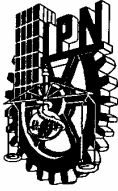
CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de México D. F. el día 24 del mes de Agosto del año 2007, la que suscribe Leticia Aguilar Doroteo alumna del Programa de Maestría en Bioprocesos con número de registro A050199, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Gustavo Valencia del Toro manifiesta que no tiene inconveniente en que el Instituto Politécnico Nacional difunda el trabajo intitulado "Producción de inóculo líquido para el cultivo de *Pleurotus* spp.", 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 la siguiente dirección gvalencia@acei.upibi.ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Leticia', is written over a horizontal line.

Leticia Aguilar Doroteo
Nombre y firma



SIP-14

**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 16:30 horas del día 21 del mes de Junio del 2007 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis de grado titulada:

PRODUCCIÓN DE INÓCULO LÍQUIDO PARA EL CULTIVO DE *Pleurotus* spp.

Presentada por la alumna:

<u>Aguilar</u> Apellido paterno	<u>Doroteo</u> materno	<u>Leticia</u> nombre(s)
Con registro:		
A	0	5
0	1	9
9		

aspirante al grado de: **Maestro en Ciencias en Bioprocesos**

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

LA COMISION REVISORA

Director de tesis

DR. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO

DR. ENRIQUE DURÁN PÁRAMO

DR. RAMÓN VILLANUEVA ARCE

DR. FABIAN ROBLES MARTÍNEZ

M. en C. JOSÉ MANUEL MUÑOZ AGUILAR

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. EDGAR SALGADO MANJARREZ
UNIDAD PROFESIONAL

INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGIA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE CULTIVOS CELULARES DE LA SECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN DE LA UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO Y CON EL APOYO DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE FORMACIÓN DE INVESTIGADORES (PIFI) Y DE LOS PROYECTOS 20050819, 20060653 DE LA SECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACION (SIP).

*El hombre nunca sabe de lo que es capaz hasta que lo intenta.
Charles Dickens.*



*La ciencia se compone de errores, que a su vez son los pasos hacia la verdad.
Julio Verne.*

AGRADECIMIENTOS



Mis sinceros agradecimientos a mi Director de tesis Dr. Gustavo Valencia del Toro. Por todo su apoyo, paciencia y comprensión. Gracias por su amistad.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Enrique Durán Páramo, M en C. José Manuel Muñoz Aguilar y Dr. Gustavo Valencia del Toro.



Agradezco también a los revisores de tesis: Dr. Enrique Durán Páramo, M. en C. José Manuel Muñoz Aguilar, Dr. Fabián Robles Martínez, Dr. Ramón Villanueva Arce por su tiempo dedicado en la revisión de la misma y por sus valiosas observaciones.



A mis Padres Abad y Rafaela
que aún estando tan lejos, siempre han estado conmigo.

A mis hermanos Edith y Jesús Abad,
a mi sobrino Randall Azary
por la motivación a continuar, los quiero mucho.



A mis abuelitas: Elvira y Efigenia,
gracias por sus bendiciones.

A la familia Ortega Montoya en especial
a Angel Ortega Montoya
*por todo el apoyo que me brinda y por todo su amor.
Gracias.*



A mis amigas (os): Karina, Yanik, Cesar y Mariana.
*Por compartir agradables momentos. Gracias por su
amistad.*

ÍNDICE

	Contenido	Pág.
1.	Resumen.....	1
2.	Summary.....	2
3.	Introducción.....	3
4.	Antecedentes.....	4
4.1	Biotecnología del cultivo de los hongos comestibles.....	4
4.2	Ubicación taxonómica del género <i>Pleurotus</i>	9
4.3	Cinética de crecimiento micelial de los hongos.....	12
5.	Justificación.....	20
6.	Objetivos.....	21
7.	Materiales y Métodos.....	22
7.1	Material biológico (<i>Pleurotus</i> spp.).....	22
7.2	Medios de cultivo.....	22
7.3	Activación de cepas de <i>Pleurotus</i> spp.....	24
7.4	Cinéticas de crecimiento micelial.....	24
7.5	Condiciones para la producción de carpóforos.....	27
7.6	Parámetros de productividad.....	28
7.7	Parámetros cinéticos.....	29
7.8	Análisis estadísticos.....	30
8.	Resultados y Discusión.....	31
8.1	Recuperación de cepas.....	31
8.2	Crecimiento micelial en medio sólido.....	32
8.3	Cinética de crecimiento.....	35
8.3.1	Producción de biomasa.....	36
8.3.2	Cuantificación de carbohidratos solubles.....	44
8.3.3	Cuantificación de proteínas solubles.....	50
8.4	Obtención de inóculo-grano.....	56
8.5	Fructificación y cosecha.....	58
8.5.1	Parámetro de productividad.....	58
8.5.1.1	Precocidad.....	58

8.5.1.2	Tasa de Producción y eficiencia biológica.....	59
8.5.2	Tamaño de carpóforos.....	61
8.6	Parámetros cinéticos.....	64
8.7	Simulación.....	65
9.	Conclusiones.....	69
10.	Referencias Bibliográficas.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

	Contenido	Pág.
Figura 1.	Evolución histórica y tendencias de la producción comercial de hongos comestibles.....	6
Figura 2.	Ciclo biológico de <i>Pleurotus</i> spp.	11
Figura 3.	Curva de crecimiento micelial	14
Figura 4.	Tipo y abundancia que presentan las cepas evaluadas	32
Figura 5.	Curvas de crecimiento micelial de las cepas empleadas en medio sólido	33
Figura 6.	Producción de biomasa para la cepa ECS127R crecidos en distintos medios.....	36
Figura 7.	Porcentaje de biomasa de la cepa ECS127R en diferentes medios de cultivo líquido.....	37
Figura 8.	Producción de biomasa para la cepa IE200 crecidos en distintos medios de cultivo líquido.....	38
Figura 9.	Porcentaje de biomasa de la cepa IE200 en diferentes medios de cultivo líquido.....	39
Figura 10.	Producción de biomasa para la cepa PCM crecidos en distintos medios.....	40
Figura 11.	Porcentaje de biomasa de la cepa PCM en diferentes medios de cultivo líquido.....	40
Figura 12.	Producción de biomasa de la cepa PCM con y sin adición de sacarosa en EMD.....	41
Figura 13.	Porcentaje de biomasa de la cepa PCM en distintos medios de cultivo líquido.....	42
Figura 14.	Producción de biomasa para la cepa IE200, PCM, RP, ECS127R en medio de cultivo EMD.....	43
Figura 15.	Porcentaje de biomasa para las cepas IE200, ECS127R, RP y PCM en medio de cultivo EMD.....	44
Figura 16.	Curva estándar de sacarosa.....	45
Figura 17.	Contenido de carbohidratos solubles para la cepa ECS127R crecidos en distintos medios	46
Figura 18.	Porcentaje del contenido de carbohidratos solubles de la cepa ECS127R en diferentes medios de cultivo líquido.....	46
Figura 19.	Contenido de carbohidratos solubles para la cepa IE200 crecidos en distintos medios...	47
Figura 20.	Porcentaje del contenido de carbohidratos solubles de la cepa IE200 en diferentes medios de cultivo líquido.....	48
Figura 21.	Contenido de carbohidratos solubles para la cepa PCM crecidos en distintos medios.....	49

Figura 22.	Porcentaje del contenido de carbohidratos solubles de la cepa PCM en diferentes medios de cultivo líquido.....	49
Figura 23.	Curva estándar de albúmina de suero bovino.....	50
Figura 24.	Contenido de proteínas solubles para la cepa ECS127R crecidos en distintos medios...	51
Figura 25.	Porcentaje del contenido de proteínas solubles de la cepa ECS127R en diferentes medios de cultivo líquido.....	52
Figura 26.	Contenido de proteínas solubles de la cepa IE200 en diferentes medios de cultivo líquido.....	52
Figura 27.	Porcentaje del contenido de proteínas solubles de la cepa IE200 en diferentes medios de cultivo líquido.....	53
Figura 28.	Contenido de proteínas solubles de la cepa PCM en diferentes medios de cultivo líquido.....	54
Figura 29.	Porcentaje del contenido de proteínas solubles de la cepa PCM en diferentes medios de cultivo líquido.....	54
Figura 30.	Porcentaje del contenido de proteínas solubles en EMD con todas las cepas.....	55
Figura 31.	Trigo inoculado con micelio crecido en medio sólido y medio líquido de la cepa IE200...	56
Figura 32.	Trigo inoculado con micelio crecido en medio sólido y medio líquido con la cepa PCM...	57
Figura 33.	Invasión de trigo inoculado con micelio crecido en medio sólido y micelio crecido en medio líquido para las cepas IE200,PCM.....	58
Figura 34.	Precocidad presentados por la cepa IE200.....	60
Figura 35.	Tasa de producción presentada por la cepa IE200.....	60
Figura 36.	Eficiencia biológica presentada por la cepa IE200.....	60
Figura 37.	Tamaño de cuerpos fructíferos desarrollados por ambos inóculo-grano de la cepa IE200.....	61
Figura 38.	Peso medio de cuerpos fructíferos de la cepa IE200.....	62
Figura 39.	Valores de G1 y G2 obtenidos del tamaño de cuerpos fructíferos.....	62
Figura 40.	Tamaño de carpóforo desarrollado de la cepa IE200 al utilizar ambos inóculo-grano....	63
Figura 41.	Simulación de la cepa IE200.....	66
Figura 42.	Simulación de la cepa ECS-0110.....	67

ÍNDICE DE CUADROS

	Contenido	Pág.
Cuadro 1.	Etapas históricas de la biotecnología de los hongos comestibles en México....	5
Cuadro 2.	Producción anual de hongos comestibles cultivados comercialmente en México.....	7
Cuadro 3.	Constituyentes químicos de <i>Pleurotus</i> spp.....	7
Cuadro 4.	Contenido vitamínico de los esporóforos de <i>Pleurotus</i> spp.....	8
Cuadro 5.	Clasificación taxonómica del género <i>Pleurotus</i>	9
Cuadro 6.	Clasificación de tamaño de píleo alcanzado por los carpóforos	29
Cuadro 7.	Cepas activadas en medio sólido (EMA).....	31
Cuadro 8.	Crecimiento micelial de las cepas de <i>Pleurotus</i>	34
Cuadro 9.	Parámetro de crecimiento para las cepas de <i>Pleurotus</i> cultivadas en cajas Petri	35
Cuadro 10.	Curva estándar de fenol-sulfúrico.....	44
Cuadro 11.	Curva estándar de Lowry.....	50
Cuadro 12.	Parámetros cinéticos de la cepa IE200 en EMS.....	64

1. RESUMEN.

En nuestro país el cultivo comercial del hongo comestible *Pleurotus* spp. inició hace más de 20 años y se ha consolidado paulatinamente como una alternativa económica para la producción de un alimento nutritivo, así mismo, la importancia de este organismo también radica en la diversidad de sustratos sobre los cuales puede crecer.

Para el año 2004, la producción nacional de hongos comestibles cultivados fue de 47,468 toneladas de hongos frescos, correspondiendo a *Pleurotus* spp. el 14.3%. Entre 1997 y 2004 los hongos cultivados del género *Pleurotus* tuvieron un incremento del 120%, con un volumen de producción de 2,190 toneladas anuales.

Una de las etapas primordiales en la producción comercial de setas es la generación de inóculo-grano ("semilla"), es por ello que en este trabajo se evaluó la obtención de "semilla" a partir de micelio crecido tanto en medio sólido como en medio líquido. Se determinaron los parámetros de crecimiento en medio líquido para las cepas ECS127R, IE200, RP, IE202, PCM, utilizando diferentes medios de cultivo, a partir de los resultados obtenidos, se seleccionó la cepa con mayores rendimientos (IE200) para la determinación de los parámetros cinéticos. La mayor producción de biomasa se obtuvo entre los 9 y 15 días de crecimiento, con una producción máxima de 4.39 g/L, la velocidad específica de crecimiento (μ) fue de 0.023 h⁻¹, la velocidad de consumo de sustrato (qs) 0.0184 y el rendimiento de 1.39 g/L.

Para la fructificación de la cepa IE200, se llevó a cabo la generación de inóculo-grano, la invasión micelial en trigo utilizando micelio crecido en medio sólido fue de 10.5 días, mientras que con micelio crecido en medio líquido tardó 7.6 días en invadir totalmente el trigo. La disminución de 3 días en la producción de semilla representa un ahorro de tiempo importante para la producción comercial de los hongos del género *Pleurotus*. Los tiempos de cultivo para la fructificación de la cepa en sustrato no presentaron diferencias estadísticas entre ambas formas de producción de semilla, así mismo, tampoco hubo diferencias en la productividad, tamaño y peso de los carpóforos obtenidos.

2. SUMMARY.

In Mexico the commercial cultivation of edible mushroom *Pleurotus* spp. started more than 20 years ago and it has been gradually consolidated as an economic alternative for the production of a nutritive food. Also, the importance of this organism is that it can grow over a diversity of lignocellulosic residues.

During 2004 the national production of edible cultivation mushrooms was 47, 468 tons. corresponding 14.3% to *Pleurotus* spp. Between 1997 and 2004 the *Pleurotus* cultivation production increased 120% (2,190 tons/year).

The principal stage of the commercial production of mushrooms is the generation of spawn, which is why this work evaluated the spawn production from mycelium growth over liquid and solid medium. The growth parameters in the liquid medium for strains: ECS127R, IE200, RP, IE202 and PCM were determined using different liquid mediums. Strain IE200 was the most productive and it was selected for the determination of kinetic parameters. The maximum production of biomass (4.39 g/L) was obtained between growth days 9 and 15 with a specific growth rate (μ) of 0.023 h⁻¹, a substrate consumption rate (q_s) of 0.0184 and a yield factor ($Y_{x/s}$) of 1.39 g/L.

The mycelium that grown over solid medium invaded the seed in 10.5 days, meanwhile mycelium that grown over liquid medium did it in 7.6 days. The reduction of 3 days in the spawn production represents an important saving time on the commercial mushroom cultivation. There were no differences in fruiting time among both forms of spawn production, neither in productivity, size and weight of fruit bodies.

3. INTRODUCCIÓN.

Actualmente la producción mundial de hongos comestibles supera los 7 millones de toneladas de hongos frescos cultivados por año, con un valor económico aproximado de 30 billones de dólares. La tasa promedio de incremento anual en la producción de hongos es superior al 11%. También se han descubierto notables propiedades medicinales en estos hongos (anticancerígenos, antibióticos, reducción de niveles de colesterol e hipertensión, antitrombóticos, antidiabéticos, etc.), lo cual brinda un impulso adicional al desarrollo de esta industria (Martínez–Carrera *et al.*, 2006).

El cultivo de hongos comestibles es una actividad que se ha implementado desde hace más de 200 años en Europa con la producción de champiñón (*Agaricus bisporus*), en Asia con el cultivo de especies como *Lentinula edodes* y *Auricularia* spp. El desarrollo de hongos del género *Pleurotus*, a pesar de ser relativamente reciente, ha tenido un incremento significativo, de tal manera que en la actualidad se cultiva en casi todas las latitudes del mundo. Su caso merece una atención especial, más que cualquier otro de los géneros cultivados hasta ahora, debido a la diversidad de sustratos sobre los que es capaz de crecer, permitiendo apreciar de manera directa el impacto benéfico de cultivar hongos para el aprovechamiento de desechos agropecuarios (Royse y Sánchez-Vásquez, 2001).

La obtención del inóculo-grano para la producción comercial de *Pleurotus* spp. es un aspecto medular que requiere atención debido a que representa un cuello de botella en el proceso de obtención de cuerpos fructíferos, es por ello que se necesita la implementación de tecnologías que permitan la generación de “semilla” de buena calidad.

4. ANTECEDENTES.

4.1 Biotecnología del cultivo de hongos comestibles.

4.1.1 Producción mundial y nacional.

La producción de hongos comestibles inició como una tecnología de cultivo artesanal, basada en técnicas sencillas de propagación, hace aproximadamente 1,000-1,400 años en China, con el cultivo empírico de *Auricularia* spp. (“orejas de ratón”) y de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (“shiitake”). De la misma forma, aunque como proceso independiente, también comenzó en Francia hace aproximadamente 350 años con el cultivo de *Agaricus* spp. (“champiñón”) y recientemente *Pleurotus* spp. (“setas”). A través del tiempo, fue posible la incorporación y desarrollo de tecnologías que han mejorado sustancialmente la producción comercial a gran escala, no sólo de los hongos comestibles mencionados, sino también de otras especies potencialmente cultivables (Chang y Miles, 2004; Martínez-Carrera, 2002a). La importancia ecológica de esta actividad radica en la utilización y reciclaje acelerado de millones de toneladas (t) de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales utilizados como sustrato de cultivo (Chang, 1999; Kues y Liu, 2000; Chang y Miles, 2004).

A nivel mundial pueden distinguirse, dos grandes tendencias en la biotecnología de hongos comestibles que son la Biotecnología aplicada y la Biotecnología moderna (Martínez-Carrera *et al.*, 2006). La biotecnología aplicada en hongos comestibles se ha derivado de las técnicas tradicionales, enriquecidas con innovaciones biológicas, mecánicas, y experiencias locales derivadas de un contexto social, económico y ecológico. En cambio, la biotecnología moderna se ha desarrollado y visto fortalecida con poderosas tecnologías que permiten el estudio y manipulación directa del material genético de los hongos comestibles, concretamente del ácido desoxiribonucleico (ADN).

Actualmente, aunque con mucho menor grado de desarrollo, pueden identificarse en México estas tendencias predominantes a nivel mundial (Martínez-Carrera *et al.*, 2006). Así, en nuestro país la biotecnología aplicada cuenta con mayor desarrollo y ha dado lugar a la producción comercial de hongos comestibles, a pequeña o gran escala, por parte de los sectores privado y social. El sector privado lo ha hecho en mayor medida durante los últimos 70 años, mientras que el sector social inició recientemente apoyándose en el sector público, tanto académico como de programas de desarrollo gubernamentales. Se tienen experiencias exitosas en los estados de Puebla, México, Hidalgo, Tlaxcala, Morelos, Veracruz,

Jalisco, Yucatán, Guerrero, Oaxaca, Querétaro y Chiapas (Sánchez, 2005). La biotecnología moderna, ha iniciado recientemente en el sector académico, aunque su impacto potencial en el largo plazo es también bastante prometedor ya que se dispone de sistemas de transformación genética para champiñón (Mikosch *et al.*, 2000), setas (Honda *et al.*, 2000) y *shiitake* (Sato *et al.*, 1998).

En el Cuadro 1, se aprecian los eventos históricos más relevantes de la biotecnología de producción de hongos comestibles en el país, así como aquellos sectores de la sociedad que los han impulsado.

Cuadro 1. Etapas históricas fundamentales de la biotecnología aplicada y moderna de los hongos comestibles en México.

Biotecnología	Proceso	Año	Lugar	Sectores involucrados	R	
Aplicada	Producción de inóculo semilla	1954	Primer laboratorio, Cuajimalpa, D.F.	Privado: "Hongos de México, S.A.	1	
		1974	Segundo laboratorio, Guadalupe Victoria, México	Privado: "Hongos Leben, S.A."	1	
		1992	Primer laboratorio rural, Cuetzalan, Puebla	Académico – Social: CP - Cooperativa indígena ^a	2,3	
		1994	Desarrollo de microempresas en la Región central del país	Privado y Social		
		1994	Establecimiento de la industria transnacional	Privado: Industria transnacional (<i>Amycel, Sylvan</i>)	4,5	
	Producción de hongos	1933	Primeros ensayos, Texcoco, México.	Privado	1	
		1939	Primeras plantas productoras, D. F.	Privado	1	
		1949	Establecimiento de la empresa "Hongos de México, S. A." Cuajimalpa, D. F.	Privado	1	
		1975	Establecimiento de la empresa "Hongos Leben, S. A." Guadalupe Victoria, México.	Privado	1	
		1989	Establecimiento de la producción rural de hongos, Cuetzalan Puebla.	Académico – Social: CP - Cooperativa indígena ^a	2,3,6	
		Procesamiento de hongos	1947	Salmuera doméstica de hongos, Azcapotzalco, D.F.	Privado	1
			1955	Primeros enlatados de hongos, Cuajimalpa, D.F.	Privado: "Monteblanco, S.A."	1
			1972	Enlatado comercial de hongos a gran escala, Cuajimalpa, D.F.	Privado: "Monteblanco, S.A."	1
			1996	Envasado rural de hongos, Cuetzalan, Puebla	Académico – Social: CP-Cooperativa indígena ^a	5,7,8
Productos de hongos	2005	Elaboración de capsulas, extractos, suplementos alimenticios, jarabes, licores, y cremas. Veracruz y Michoacán	Privado: "Laboratorios Fungi Cap, S.A" y "Garcifer, S.A."			
	Moderna	2003	Establecimiento del Centro sobre Recursos Genéticos de Hongos Comestibles	Académico: CP – Campus Puebla ^b	5,9	
2003		Diversidad genética y mejoramiento genético mediante el uso de marcadores moleculares y caracterización de genes	Académico: CP – Campus Puebla ^b	10,11		

(Tomado de Martínez-Carrera *et al.*, 2006)

CP= Colegio de Postgraduados.

R= Referencias. 1: Martínez-Carrera *et al.*, 1991b. 2: Martínez-Carrera *et al.*, 1991a, 1993. 3: Martínez-Carrera *et al.*, 1998a. 4: Martínez-Carrera, 2000. 5: Martínez-Carrera, 2002b. 6: Martínez-Carrera y Larqué-Saavedra, 1990. 7: Martínez-Carrera *et al.*, 1996. 8: Martínez-Carrera *et al.*, 1998b. 9: Martínez-Carrera *et al.*, 1999. 10: Morales y Thurston, 2003. 11: González, 2005.

^a CP, Campus Puebla, en colaboración con la Sociedad Cooperativa Agropecuaria "Tosepan Titataniske".

b Financiamiento del CONACYT, a través de los proyectos: 1) 28985-B (1999-2000); 2) 0062 (1999); 3) 36085-B (2001-2004); y 4) I 39163-B (2001-2003). También los siguientes apoyos complementarios: 1) *International Foundation for Science* (IFS E/1743-1, 1989-1990); y 2) Ingresos propios del Área de Investigación sobre Biotecnología de Hongos Comestibles, CP, Campus Puebla (1996-2005).

A nivel nacional los volúmenes de producción ascienden a 47,468 toneladas anuales de hongos frescos (Fig. 1). Nuestro país es el mayor productor de Latinoamérica, ya que genera alrededor del 58.9% de la producción total de esa región y se ubica como el 16° productor a nivel mundial. El monto anual de las operaciones comerciales supera los 200 millones de dólares, generando alrededor de 25 mil empleos directos e indirectos. La importancia ecológica de esta actividad económica radica en la utilización y reciclaje de más de 474,000 toneladas anuales de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales (Martínez-Carrera *et al.*, 2006).

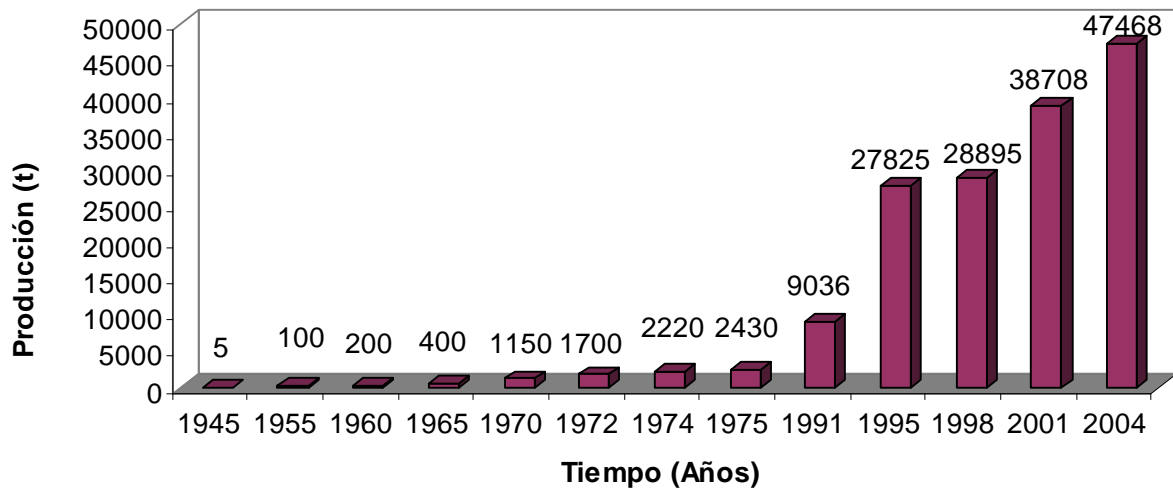


Figura 1. Evolución histórica y tendencias de la producción comercial estimada de hongos comestibles cultivados en México, durante el período 1945-2004. (Tomado de Martínez-Carrera *et al.*, 2006).

En el Cuadro 2 se muestra la producción anual estimada de hongos comestibles cultivados comercialmente en México hasta el año 2005 para los géneros *Agaricus*, *Pleurotus* y *Lentinula*, la mayor proporción (95.3%) corresponde a los champiñones (champiñón blanco: 44,931.5 t/año; champiñón café: 328.5 t/año), seguido por las setas con 4.6% (blanca, gris, café: 2,190 t/año) y en tercer lugar se encuentra el shiitake con 0.03% (18.2 ton/año) (Martínez-Carrera *et al.*, 2006).

Cuadro 2. Producción anual estimada de hongos comestibles cultivados comercialmente en México, incluyendo volúmenes y proporciones de producción para el 2005.

Nombre científico	Nombre comercial	Producción nacional	
		Volumen (t)	Proporción (%)
<i>Agaricus bisporus</i> (J.E.Lange) Pilat	Champiñon	45260	95.35
	Blanco	44913.5	99.27
	Café	328.5	0.73
<i>Pleurotus</i> spp.	Setas (blanca, gris, café)	2190	4.62
<i>Lentinula edodes</i> (Berk) Pegler	Shiitake	18.2	0.04
Total		47468.2	100.00

(Modificado de Martínez-Carrera *et al.*, 2006).

4.1.2 Propiedades alimenticias de *Pleurotus* spp.

Los hongos comestibles son una fuente potencial de alimentación para el hombre, su contenido en aminoácidos esenciales, vitaminas, fibras y minerales, así como, su bajo contenido en grasas, los colocan en un lugar importante en la dieta diaria por arriba de la mayoría de los vegetales. Su contenido proteico es del 20 al 40% de su peso seco (Cuadro 3) y se consideran un alimento de alta calidad debido a la cantidad de aminoácidos que contienen.

Cuadro 3. Constituyentes químicos de *Pleurotus* spp.

Referencia	Constituyentes				
	Humedad	Proteína	Grasa	Ceniza	Fibra cruda
Cristan y Sands (1978)	73.1 – 91.0	10.0 - 30.4	1.6 - 7.2	6.1 - 10.7	7.5 - 11.9
Bano y Rajarathnam (1982)	73.30	10.50	1.60	6.10	7.50
Chang y Miles (1989)	73.0 – 90.8	10.3 - 30.4	1.6 - 2.2	6.1 - 9.8	7.5 - 8.7
Valencia del Toro <i>et al.</i> (1995)	87.3 – 89.8	26.2 - 32.1	3.9 - 6.5	3.9 - 6.5	6.9 - 10.15
Valencia del Toro <i>et al.</i> (1997)	91.7 – 94.2	21.0 - 31.5	3.0 - 7.1	3.7 - 8.7	7.7 - 14.2

(Modificado de Valencia del Toro-Garín, 2000).

Por otra parte, los hongos son una fuente significativa de vitaminas como la B₁, B₁₂, ácido ascórbico y vitamina D, entre otras (Cuadro 4).

Cuadro 4. Contenido vitamínico de los esporóforos de *Pleurotus* spp.

Componente	Contenido (mg/100g)
Ac. Ascórbico (Vitamina C)	8.6
Tiamina (Vitamina B1)	0.12
Riboflavina (Vitamina B2)	0.52
Ac. Nicotínico (Complejo B)	5.82
Ac. Pantoténico (Vitamina B3)	2.83
Biotina	0.018

(Tomado de Valencia del Toro-Garín, 2000).

Los minerales indispensables en nuestra dieta diaria como el calcio y el fósforo se encuentran en cantidades significativas mientras que el contenido en grasas y carbohidratos es bajo. Por lo tanto, los hongos son un alimento nutritivo y bajo en calorías constituyendo una excelente opción alimentaria. Por sus propiedades nutritivas, los hongos no deben ser considerados como un condimento más que proporciona mejor sabor a nuestros alimentos, sino como una comida con un contenido considerable de nutrientes que debería tomarse en cuenta como fuente potencial de alimentación humana.

4.1.3 Importancia Medicinal.

Los hongos del género *Pleurotus* producen un número importantes de moléculas entre las que se encuentran lecitinas, polisacáridos y glucopéptidos que presentan actividades biológicas como antiproliferativas y anticancerígenas (Ng y Wang, 2004). *Pleurotus ostreatus* se encuentra en una lista de 37 especies de hongos descritas por Guzmán (1994), utilizadas en la medicina tradicional de Mesoamérica y México. Se describe como uno de los hongos que producen retardo en el crecimiento de tumores, posiblemente por la acción de un compuesto polisacárido que actúa como potenciador de la defensa del huésped, su ventaja sobre las fármacos que eliminan las células cancerosas radica en que no presenta efectos colaterales; los compuestos quimioterapéuticos usados contra el cáncer suprimen las defensas del huésped contra las células cancerosas y contra algunos agentes infecciosos (Miles y Shu-Ting, 1997). Okuda *et al.* (1972), afirman que se han aislado polisacáridos antitumorales tanto en *Flammulina velutipes* como de *P. ostreatus*; este último, el componente antitumoral activo de un extracto hidrosoluble consiste en

un esqueleto formado por un polímero 1,3 β -glucano, probablemente con ramificaciones de residuos de galactosa y manosa.

4.2 Ubicación taxonómica del género *Pleurotus*.

Se ha estimado la existencia de aproximadamente 250,000 especies diferentes de hongos en la naturaleza (Herrera y Ulloa, 1990). Gastón Guzmán en 1995, estimó que la biodiversidad de los hongos en el país es alrededor de 120,000 especies (micro y macroscópicas) de las cuales 10,000 producen cuerpos fructíferos macroscópicos, entre los cuales se encuentra al género *Pleurotus*. Dicho género pertenece a la clase basidiomicetos, comprende a los hongos superiores, cuya principal característica es la presencia de basidios o protuberancias sobre los cuales se producen las basidiosporas. La familia Tricolomatacea esta constituida por especies que producen esporas y que presentan coloración entre hialino a rosa (Kirk *et al.*, 2001). En el Cuadro 5, se muestra la ubicación taxonómica del género *Pleurotus*.

Cuadro 5. Clasificación taxonómica del género *Pleurotus* .

Reino	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Basidiomycete</i>
Clase	<i>Homobasidiomycete</i>
Orden	<i>Agaricales</i>
Familia	<i>Tricholomataceae</i>
Género	<i>Pleurotus</i>
Especie	<i>spp</i>

(Tomado de Kirk *et al.*, 2001).

La taxonomía del género es muy compleja debido a un alto grado de variabilidad morfológica de los basidiocarpos o cuerpos fructíferos, la cual es atribuida principalmente a factores ambientales. Debido a esto, una misma especie puede ser identificada bajo diferentes nombres. Otros factores que hacen compleja la taxonomía del género son la plasticidad fenotípica y la variabilidad genética. Un entendimiento de su taxonomía y la relación que guardan entre las diferentes especies de acuerdo con su distribución geográfica, son aspectos principales en futuros programas de mejoramiento genético y particularmente de preservación de germoplasma nativo. Se han hecho enormes esfuerzos para clasificar las especies del

género *Pleurotus* por medio de criterios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y genéticos (Romgnesi, 1969; Anderson *et al.*, 1973; Han *et al.*, 1974; Maning, 1977; Eger *et al.*, 1979; Hilber, 1982; Kulkarni *et al.*, 1987; May y Royse, 1988; Zervakis *et al.*, 1994; Iraçabal *et al.*, 1995), por lo que se ha generado valiosa información sobre la distribución taxonómica dentro del género.

Estudios de incompatibilidad en el género, con especies de *P. ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kumm, *P. pulmonarius* (Fr.) Quéf, *P. columbinus* (Quéf. Apud Bres.) Quéf, *P. sapidus* (Schulzer and Kalchbr.) Sacc., han demostrado la existencia de complejos de especies que conforman grupos de interesterilidad, que aunque morfológicamente están localizados en diferente taxa, pueden pertenecer a una misma especie biológica (Terakawa, 1960; Eugenio y Anderson, 1968; Anderson *et al.*, 1973; Manning, 1977; Eger, 1978; Eger y Leal-Lara, 1979; Anderson *et al.*, 1991; Zervakis y Balis, 1995).

Hoy en día, los estudios moleculares han servido de guía para un mayor entendimiento de la relación que guardan las especies de hongos, los complejos de especies y sus estructuras en la población (Egger, 1992), mediante el uso de ADN mitocondrial (Jahnke *et al.*, 1987; Smith y Anderson, 1989; Smith *et al.*, 1990) y la homología en sus secuencias (Horgen *et al.*, 1984). De particular interés es una región del ADN ribosomal (rADN) denominada en inglés como Internal Transcribed Spacer region (ITS). Ésta es altamente polimórfica y ha sido usada ampliamente en estudios taxonómicos y filogenéticos en hongos con el fin de determinar relaciones entre especies (White *et al.*, 1990; Hibbett, 1992; Bridge y Arora, 1998).

4.2.1 Ciclo de vida de *Pleurotus* spp.

En la Figura 2 se muestra el ciclo biológico del género *Pleurotus*, se observa que la germinación de una basidiospora produce el desarrollo de hifas filamentosas monocarióticas y haploides quienes al ramificarse conforman al micelio, mismo que continúa creciendo de forma monocariótica hasta que se une con otro micelio contiguo que sea sexualmente compatible (plasmogamia). Después de que ambas células se fusionan, el septo o doliporo (que permanecía cerrado para evitar el intercambio intracelular) se abre para que pueda ocurrir la migración nuclear y posteriormente la formación del micelio secundario dicariótico, mediante la división conjugada simultánea de los dos núcleos iniciales y la distribución de los pares de núcleos hermanos compatibles o dicariones en las células hijas. Una vez formado el cuerpo fructífero, a partir del micelio indiferenciado generado por crecimiento vegetativo, se llevan a cabo los procesos de cariogamia y meiosis. Como producto de ésta última, se obtienen núcleos haploides quienes poseen de

manera aislada un factor de incompatibilidad, mismos que emigran a una tétrada de esporas formadas en la parte externa del basidio y una vez allí, son liberados durante el proceso de esporulación del basidiocarpo maduro. Si encuentran condiciones ambientales apropiadas, estas basidiosporas germinan produciendo micelio monocariótico y comienzan nuevamente el ciclo (Koltin *et al.*, 1972; Larraya *et al.*, 1999; Ramírez *et al.*, 2000; Valencia-del Toro, 2002).

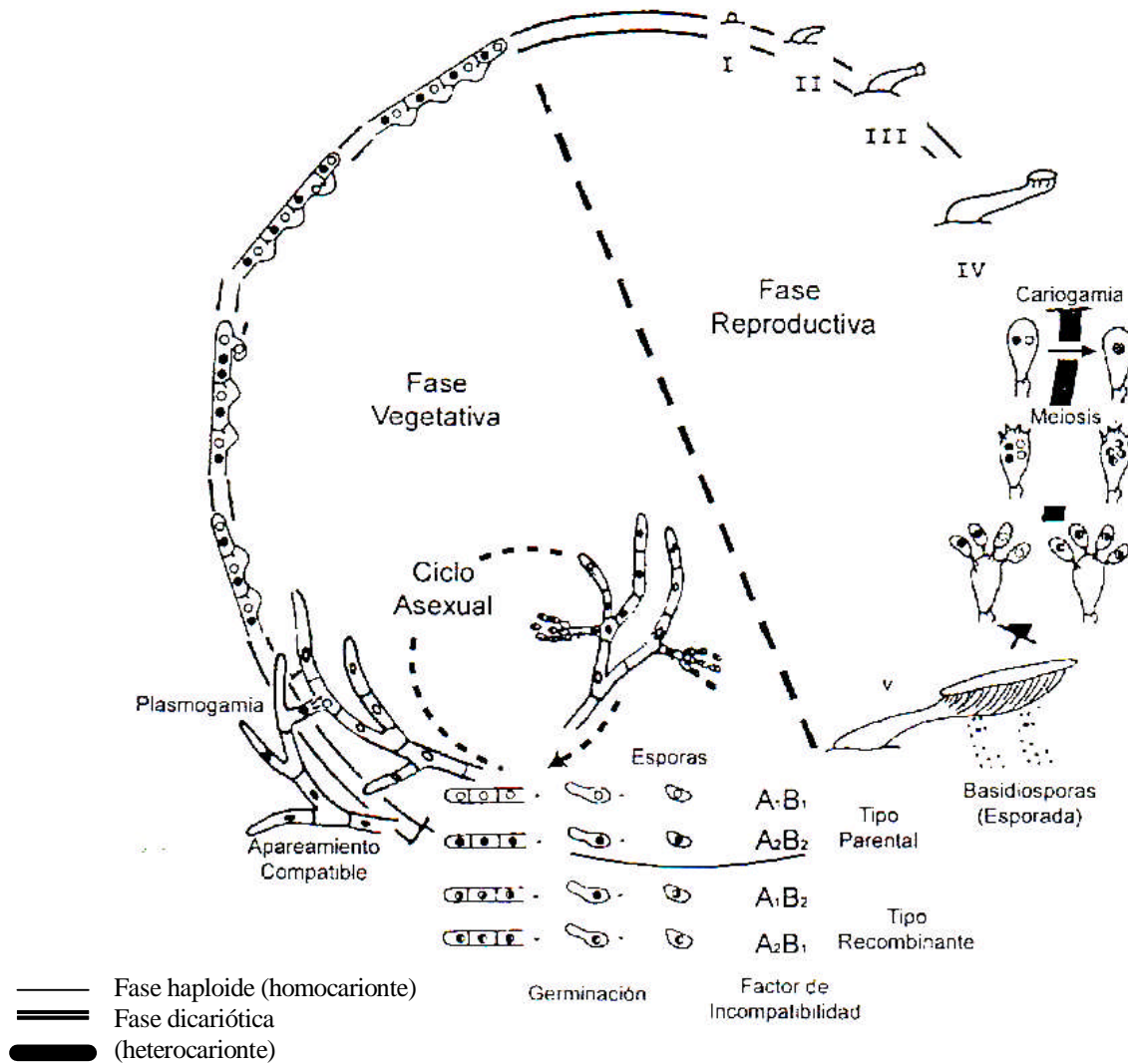


Figura 2. Ciclo biológico de *Pleurotus* spp. (Tomada de Valencia-del Toro, 2002).

4.2.2 Forma de nutrición.

Los macromicetos del género *Pleurotus* son hongos saprofitos, la capacidad de penetración de sus hifas además les permite degradar incluso materias estructuralmente complejas, como madera, cutículas de insectos, Estos hongos producen enzimas que intervienen en la degradación de celulosa y lignina, obteniendo así su fuente de carbono y los nutrientes minerales necesarios para su crecimiento.

En estudios realizados con macromicetos se ha podido observar que los requerimientos de estos organismos pueden variar según los nutrientes presentes en el medio, por lo tanto la utilización de sustratos adecuados es conveniente para el crecimiento óptimo de los hongos, si el medio de cultivo contiene todos los requerimientos nutritivos en cantidad suficiente para que el organismo sintetice sus metabolitos y tome la energía que requiere, el hongo crecerá adecuadamente (Sánchez-Vásquez, 2001).

El carbono es necesario para los hongos porque es la fuente directa de energía para su metabolismo; así mismo, es necesario para la formación de las diferentes partes y estructuras celulares. Dada la importancia que tiene para la vida de las células, éste elemento es el que se requiere en mayores cantidades, el carbono puede ser utilizado por el hongo a partir de diferentes fuentes como polímeros (celulosa y lignina), carbohidratos, lípidos, etc. Los carbohidratos se encuentran entre las fuentes de carbono preferidas por las especies de *Pleurotus*, según Raypeck (1977), la glucosa, la manosa y la galactosa son buenos sustratos para este hongo. Por otra parte el género *Pleurotus* tienen la capacidad de crecer sobre fuentes inorgánicas de nitrógeno, como el nitrato de potasio o la urea, aunque se observa que prefieren las fuentes orgánicas para un crecimiento óptimo. Así, Hong en 1978, indicó que la peptona es una fuente de nitrógeno que da un rápido crecimiento micelial y formación de cuerpos fructíferos, mientras que los aminoácidos alanina, ácido aspártico, glicina y serina, dan rendimientos pobres (Sánchez-Vásquez y Royse, 2001).

4.3 Cinética de crecimiento micelial de los hongos.

Los estudios sobre cinética del crecimiento de microorganismos se han realizado fundamentalmente con bacterias y levaduras, las cuales difieren enormemente con los hongos filamentosos. El crecimiento de una colonia de organismos unicelulares se lleva a cabo por el incremento de individuos dentro de dicha colonia, mientras que en los hongos se efectúa por la elongación y ramificación de las hifas.

Se sabe que la síntesis de componentes celulares, la absorción de agua por la hifa y la presión de turgencia juegan un papel importante en la elongación del ápice; sin embargo, poco se sabe sobre el fenómeno de ramificación.

El crecimiento de un hongo puede iniciarse a partir de una espora o de una fracción viable de la hifa. Dicho crecimiento se da en forma apical porque la elongación de la superficie se presenta en un punto y no en toda la célula. Esta característica ocasiona que las células de los hongos (exceptuando las levaduras) tengan una estructura cilíndrica, la hifa, delimitada por una pared que se extienden de manera ramificada para formar un sistema hifal conocido como micelio (Sánchez-Vásquez y Royse, 2001).

4.3.1 Crecimiento micelial.

El crecimiento del micelio del hongo varía según si se realiza en un medio líquido o en un medio sólido. En el primero crece sólo sobre la superficie cuando el líquido está en reposo; pero si el medio es permanentemente agitado, pueden crecer en todo el volumen. Según las condiciones, el hongo puede o no formar pequeñas esferas de micelio denominadas “pellets”. En medio líquido, los hongos suelen presentar un desarrollo típico, similar al de otros organismos y que consta de las siguientes fases: de adaptación o Lag, exponencial o Log, estacionaria, declinación y muerte. Este desarrollo se puede representar de manera gráfica (Figura 3). Mediante una curva del peso celular seco o biomasa (X) en gramos por litro (g/L) contra el tiempo de incubación (T). Cuando el crecimiento de un hongo se da en un medio sólido en lugar de fase exponencial se presenta una fase de crecimiento más o menos lineal (Lilly y Barnett, 1951 citado por Sánchez-Vásquez y Royse, 2001).

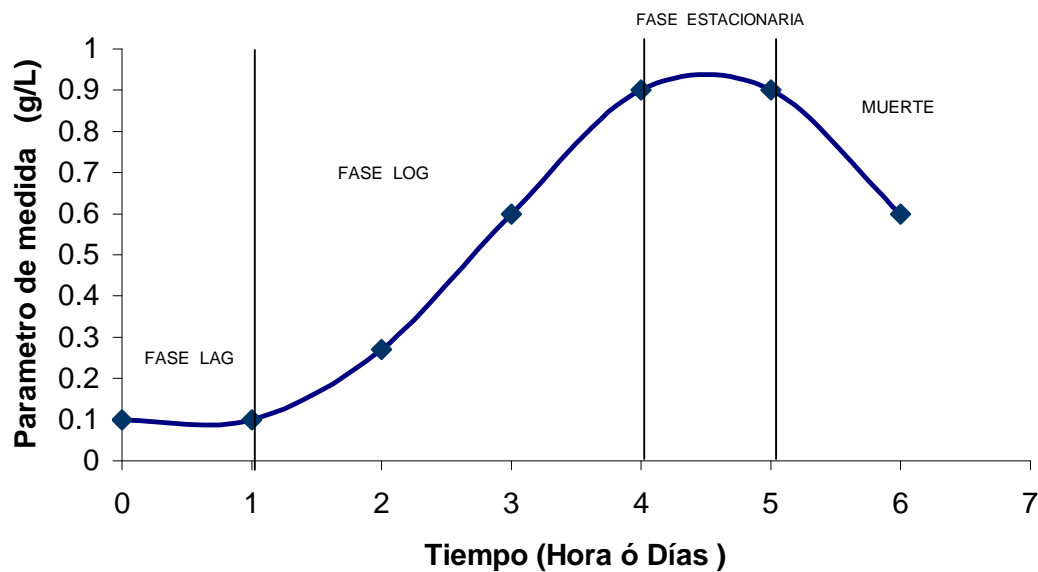


Figura 3. Curva de crecimiento micelial.

4.3.2 Fase de adaptación o Lag.

En esta fase los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (de abundancia de nutrientes) para poder iniciar el crecimiento exponencial, se presenta inmediatamente después de que el hongo ha sido inoculado en un medio apropiado para su crecimiento. Es una etapa de adaptación en la que no hay crecimiento aparente, sino más bien síntesis de los componentes necesarios para iniciar la elongación celular. Si el hongo fue dañado durante la siembra, en esta etapa de latencia sintetizará pared celular y preparará puntos de crecimiento. La duración de la fase de latencia es muy variable y depende del tipo y del estado fisiológico del hongo, así como del tipo de sustrato y de las condiciones de cultivo. La fase de latencia se minimiza, o aún puede ser suprimida si un hongo es reinoculado, a partir de una colonia que crece en fase exponencial, a otro medio de características similares (composición, pH, temperatura). La fase de latencia puede, sin embargo, presentarse aún en estas condiciones si el hongo es maltratado durante la siembra (Sánchez-Vásquez y Royse, 2001).

4.3.3 Fase exponencial o logarítmica (Log).

Frecuentemente se habla de esta fase como la de crecimiento equilibrado, donde la síntesis de todos los constituyentes celulares aumenta a una rapidez constante de modo que la población de células se duplica a intervalos regulares. Sin embargo, esta no es una verdadera fase de crecimiento equilibrado o estado estacionario, ya que los nutrientes son consumidos continuamente y los productos finales del metabolismo se acumulan, en consecuencia la composición del medio de cultivo cambia. Esta fase es alcanzada cuando un hongo crece en medio líquido, después de que se ha adaptado al medio de cultivo y está en capacidad de aprovechar al máximo las condiciones que el medio le ofrece.

4.3.4 Fase estacionaria.

Se caracteriza porque no presenta ningún crecimiento neto, el crecimiento puede ocurrir, pero esta equilibrado por la rapidez de muerte o lisis celular. Las células pueden permanecer viables por periodos largos en esta fase, con existencia de metabolismo endógeno, oxidación y almacenamiento de polímeros, proteínas, etc. Es común que la población llegue a la fase estacionaria como resultado de la disminución de algún nutriente esencial, por la formación de productos tóxicos o por otro cambio en el medio físico. Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial, produciéndose una acumulación y liberación de metabolitos secundarios. La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en muchos ambientes naturales. (Sánchez-Vásquez y Royse, 2001).

La fase estacionaria es el punto en el cual el crecimiento cesa, aunque todavía prevalece un metabolismo celular de mantenimiento. Durante esta etapa aún hay consumo de glucosa y otros nutrientes. El hongo en esta fase es aún capaz de reiniciar su crecimiento si es resembrado en un medio propicio, aunque tendrá un período de latencia más o menos largo según las nuevas condiciones de crecimiento. Durante la fase estacionaria se producen diversos tipos de enzimas autolíticas que conducen a la muerte del hongo (Sánchez-Vásquez y Royse, 2001).

4.3.5 Fase de declinación y muerte micelial.

Esta fase se presenta cuando la acumulación de los desechos del metabolismo del hongo alcanzan niveles que se vuelven limitantes para el crecimiento o porque alguno de los nutrientes escasea o se termina. En estas condiciones la tasa de crecimiento máxima no puede ser mantenida y empieza generalmente a disminuir de manera paulatina. La importancia de esta disminución depende de los factores o nutrientes agotados o sustancias tóxicas acumuladas.

La declinación es una fase propicia para que aparezcan mutaciones celulares porque, sobretodo en cultivos puros, se disminuye la presión de selección. Dadas las condiciones adversas del medio durante la declinación, es relativamente frecuente que un organismo pierda algunas capacidades o modifique otras por mutación. Esto explica por qué la resiembra continua o sistemática de un organismo en un medio de cultivo, sobre todo sintético, puede conducir rápidamente al agotamiento de la cepa o a la pérdida de la misma (Sánchez-Vásquez y Royse, 2001).

Es importante considerar los siguientes aspectos para el crecimiento del hongo: por un lado el *estequiométrico*, debido a que la biomasa final dependerá de la concentración y composición del medio de cultivo, y por el otro, el *cinético*, que tiene que ver con la velocidad de crecimiento para llevar a cabo el proceso.

4.3.6 Estequiometría del crecimiento micelial.

El aspecto estequiométrico requiere conocer los rendimientos, es decir, la relación entre el producto obtenido y el sustrato consumido, (usualmente la fuente de carbono y energía).

La ecuación matemática que representa el rendimiento en biomasa $Y_{x/s}$ es la siguiente:

$$Y_{x/s} = -\left(\frac{dx}{ds}\right) \dots (1)$$

En donde x y s representan la concentración de biomasa y sustrato respectivamente y d indica la diferencial de dichos parámetros.

En la práctica, para el cálculo del $Y_{x/s}$ se emplea la expresión:

$$Y_{x/s} = - \left(\frac{\Delta x}{\Delta s} \right) \dots\dots(2)$$

En donde el símbolo Δ indica incremento.

Si además de biomasa se forma algún producto en particular, el rendimiento en $Y_{p/s}$ estará dado por la ecuación:

$$Y_{p/s} = - \left(\frac{dp}{ds} \right) \dots\dots(3)$$

Los parámetros $Y_{x/s}$ e $Y_{p/s}$ tienen una importancia fundamental dentro de la cinética de crecimiento, ya que dan una medida de la eficiencia del proceso de producción. De éste modo en un cultivo destinado a la producción de biomasa, el objetivo será maximizar $Y_{x/s}$ y minimizar $Y_{p/s}$, y viceversa, en un cultivo para la obtención de algún producto.

4.3.7 Velocidad de crecimiento micelial.

Se puede representar la velocidad de crecimiento considerando el incremento en el número de células o biomasa (dx) en un intervalo corto de tiempo (dt). A partir de la ecuación siguiente:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \dots\dots(4)$$

En donde el incremento del número de células (dx) por unidad de tiempo (dt) es proporcional al número de células presentes en el cultivo (x) multiplicando por la velocidad de crecimiento micelial (μ). Si se considera constante la velocidad de crecimiento a lo largo del tiempo e integrando la ecuación (4) con respecto al mismo, se obtiene una función exponencial, representada en la ecuación 5.

$$x = x_0 e^{\mu t} \dots(5)$$

Y obteniendo logaritmos en ambos lados de la misma ecuación 5 se obtiene la transformación de esta ecuación en una recta de la forma siguiente:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \dots(6)$$

Por lo que el logaritmo del número de células aumenta linealmente con el tiempo siendo la constante de proporcionalidad (μ). Es importante considerar que si la velocidad de crecimiento varía con respecto al tiempo se deberán obtener los parámetros cinéticos gráficamente o analíticamente.

4.3.8 Importancia del cultivo líquido del micelio para la producción de setas.

El cultivo en medio sólido de micelio del hongo *Pleurotus* sp, es el método común de propagación del micelio para su posterior utilización en la producción de “semilla” y consiste en el crecimiento de micelio en granos de cereales (trigo, sorgo, arroz, etc.), una vez obtenido el inóculo-grano se mantiene en condiciones óptimas para su conservación, hasta su utilización para ser inoculado sobre el sustrato que se empleará para la producción de cuerpos fructíferos (Guillen-Navarro *et al.*, 1998). Una alternativa para la obtención de “semilla” es la utilización de micelio crecido en medio líquido ya que permitirá producir mayor cantidad de biomasa de mejor calidad en menor tiempo, favorecerá la adaptación y dispersión del hongo en el trigo y facilitará su manipulación durante la siembra.

En los trabajos de Hadar y Cohen (1986), se llevó a cabo el cultivo de micelio en medio líquido de una cepa de *Pleurotus ostreatus* denominada como Florida F6, utilizaron como sustrato, glucosa (15 g/L) adicionada con melaza de caña (25 g/L), obteniendo que a un pH óptimo de 5 se generó la mayor cantidad de crecimiento micelial, de tal forma que se generó una biomasa de 11.7 g/L a las 72 h del cultivo. Mientras

que, al agregar azúcar de remolacha (25 g/L) como sustrato único, se obtuvo un crecimiento de 7.5 g/L de biomasa. Mukhopadhyay *et al.* (2002) cultivaron micelio en medio líquido de una cepa de *Pleurotus sajor-caju* en suero de leche suplementado con 0.8 % de fosfato ácido de amonio, 0.2 % de extracto de levadura y 2 ppm de ácido indol acético, obteniendo a las 24 horas del cultivo una producción de biomasa de 0.5 g/L (fase lag), la fase logarítmica fue alcanzada a las 120 horas generando una biomasa de 1.8 g/L y el máximo crecimiento fue a las 240 horas con una producción de 8.0 g/L de biomasa.

En estudios sobre el crecimiento de micelio en medio líquido utilizando *Pleurotus tuber-regium*, Wu *et al.* (2004) realizaron pruebas sobre el efecto de la relación carbono-nitrógeno (C/N) de los sustratos utilizados, obteniendo una relación óptima de 24:1 a partir de la mezcla de sustratos en la siguiente proporción: 30 g de glucosa y 4 gramos de extracto de levadura por litro de medio de cultivo. Estos investigadores obtuvieron una biomasa de 9.4 g/L, que comparada con estudios previos realizados por Fasidi y Olorunmaiye (1994), obtuvieron un rendimiento de biomasa micelial de 2 g/L en la fermentación de micelio con *P. tuber-regium* con una relación de C/N (4:1), usando una sola fuente de carbono y nitrógeno, esto sugiere que la relación C/N es uno de los factores importantes que se necesita optimizar para el crecimiento micelial de los hongos, así mismo, estos autores indican que la proporción de las fuentes de carbono y nitrógeno en un medio líquido pueden afectar la biosíntesis de la célula (Wu *et al.*, 2004). Guillen-Navarro *et al.* (1998) analizaron además de las condiciones óptimas de pH, las condiciones para la producción de biomasa y enzimas ligninolíticas de micelio de *Pleurotus ostreatus* en medio sintético con extracto de levadura y con diferentes concentraciones de glucosa de 5 g/L hasta 20 g/L y a diferentes temperaturas de incubación, obteniéndose una producción máxima de biomasa de 8.6 g/L con 20 g/L de sustrato y un rendimiento de 1,47 g de biomasa /g de sustrato, una μ de 0.018 h^{-1} y una K_s de 1.75 g/L, así mismo, una q_s de $0.012 \text{ g/g de peso seco h}^{-1}$, con pH en intervalo de 5.6 a 6.5, y a una temperatura de 26–29 °C. Rogério *et al.* (2003) realizaron estudios utilizando dos cepas de *Pleurotus* (*P. ostreatoroseus* y *P. ostreatus*), los hongos fueron cultivados en medio líquido con papa- dextrosa con una concentración de 60 g de glucosa, 1 g de peptona, 2 g de extracto de levadura, 1 g de K_2HPO_4 , 0.2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se obtuvo un tiempo óptimo de crecimiento de 9 días para la producción de biomasa, *P. ostreatus* presentó una alta producción de 22.8 g/L de peso seco mientras que en *P. ostreatoroseus* se obtuvo 16.8 g/L de peso seco. Se detectó que a los 7 días de incubación se presentó el tiempo óptimo de producción de exopolisacáridos, cuyas cantidades fueron; para *P. ostreatoroseus* 5.8 g/L mientras que para *P. ostreatus* únicamente 1.4 g/L.

5. JUSTIFICACIÓN.

En la producción de hongos comestibles del género *Pleurotus*, la preparación de la “semilla” es un factor crítico en la producción comercial por lo que es indispensable buscar alternativas para poder estandarizar el proceso de generación del inóculo-grano, tratando de reducir los tiempos de invasión del micelio en el grano de trigo y preparando una “semilla” de alta calidad.

Debido a que el cultivo líquido de micelio de *Pleurotus* spp. ha demostrado ser una opción viable para la producción de biomasa resulta importante la determinación de los parámetros cinéticos de cepas con potencial comercial con la finalidad de establecer las condiciones óptimas del cultivo líquido para la producción de “semilla”.

6. OBJETIVOS.

General:

- 1.- Evaluar la utilización de micelio de *Pleurotus* spp. cultivado en medio líquido para la producción de inóculo-grano.

Específicos:

- 1.- Determinar las velocidades de crecimiento micelial de las cepas de *Pleurotus* spp. en medio sólido.
- 2.- Determinar los parámetros cinéticos de crecimiento micelial de cepas de *Pleurotus* spp. en medio líquido.
- 3.- Comparar el tiempo de producción de inóculo-grano a partir del micelio de *Pleurotus* spp. cultivado en medio líquido y en medio sólido.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Material biológico.

En este trabajo se utilizaron cinco cepas de hongos del género *Pleurotus* (RP, IE200, IE202, ECS127R y PCM) las cuales se encuentran depositadas en el laboratorio de Cultivos Celulares de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional. Las cepas fueron cultivadas en medio sólido conteniendo extracto de malta-agar (EMA) e incubadas a 28 °C para su crecimiento micelial.

7.2 Medios de cultivo.

Para el crecimiento de las cepas de *Pleurotus* spp. se utilizaron los siguientes medios de cultivo; extracto de malta-agar (EMA), peptona con sacarosa (PCS), extracto de malta con sacarosa (EMS), extracto de malta desproteinizado (EMD) y extracto de malta desproteinizado con sacarosa (EMDS) a continuación se indican la preparación de los mismos.

7.2.1 Extracto de malta-agar (EMA).

Para preparar 1 litro de EMA, se agregaron 15 g de extracto de malta y 20 g de agar a un matraz Erlenmeyer de 2 litros. Se adicionaron 1000 mL de agua destilada gradualmente para disolver los componentes, se colocó la tapa del matraz y se agitó, se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 30 minutos. El medio de cultivo se colocó en cajas Petri de 9 cm de diámetro, al solidificar el medio, las cajas Petri se incubaron a 28 °C durante 24 horas para realizar la prueba de esterilidad, las que no presentaron problemas de contaminación se guardaron en bolsas de polietileno y se refrigeraron para su uso posterior.

7.2.2 Peptona-sacarosa (PCS).

En un matraz Erlenmeyer de 2 litros, se agregó un litro de agua destilada, se adicionaron 20 g de sacarosa y 20 g de peptona de caseína, se agitó el matraz y se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 30 minutos. Posteriormente se incubó a 28 °C durante 24 horas para la prueba de esterilidad. Los matraces que no presentaron problemas de contaminación se refrigeraron para su uso posterior.

7.2.3 Extracto de malta-sacarosa (EMS).

En un matraz Erlenmeyer se agregó un litro de agua destilada, se adicionaron 20 g de sacarosa y 20 g de extracto de malta, se agitó para disolver los componentes, se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 30 minutos. Posteriormente se incubó a 28 °C durante 24 horas para la prueba de esterilidad. Los matraces que no presentaron problemas de contaminación se refrigeraron para su uso posterior.

7.2.4 Extracto de malta desproteinizado (EMD).

En un matraz Erlenmeyer de 1 litro, se adicionaron 250 mL de agua destilada, se agregaron 20 g de extracto de malta, se agitó, se determinó el pH y se llevó a 1.5 unidades por arriba del valor de la solución de extracto de malta original, ajustándolo con hidróxido de sodio 1N, a la solución obtenida se le agregaron 1.4 g de cloruro de calcio, posteriormente se esterilizó en la autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 20 minutos, se filtró en caliente y se colocaron 225 mL de este filtrado en un matraz de 2 litros, a éste se le agregaron 1450 mL de agua destilada, se colocó la tapa del matraz y se agitó, de esta solución se tomaron 30 mL que se colocaron en matraces de 100 mL, los cuales se esterizaron en la autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 30 minutos. Posteriormente se incubaron a 28 °C durante 24 horas para la prueba de esterilidad. Los matraces que no presentaron problemas de contaminación se refrigeraron para su uso posterior.

7.2.5 Extracto de malta desproteinizado-sacarosa (EMDS).

Se siguió el mismo procedimiento que el medio EMD agregando al matraz de 2 L, 1450 ml de agua y 20 g de sacarosa se colocó la tapa del matraz y se agitó, de esta solución se tomaron 30 mL que se colocaron en matraces de 100 mL, los cuales se esterilizaron en la autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 30 minutos. Posteriormente se incubaron a 28 °C durante 24 horas para la prueba de esterilidad. Los matraces que no presentaron problemas de contaminación se refrigeraron para su uso posterior.

7.3 Activación de cepas de *Pleurotus* spp.

Se sembraron trozos de micelio en medio sólido EMA. Se utilizaron 10 cajas Petri por cada cepa. Las cajas sembradas se incubaron a 28° C durante 5-8 días. Se observó el desarrollo de la colonia cada 24 horas.

7.4. Cinéticas de crecimiento micelial.

El crecimiento del micelio se puede estudiar siguiendo la evolución del número de células viables por unidad de superficie o por unidad de masa. Para determinar la cinética de crecimiento del micelio es necesario determinar la biomasa, el consumo de sustrato y la formación de productos del cultivo para el caso del cultivo de *Pleurotus*, a continuación se describen los métodos utilizados para la determinación de biomasa, carbohidratos y proteínas, parámetros necesarios para obtener la cinética de crecimiento.

7.4.1 Establecimiento del cultivo líquido de micelio de *Pleurotus* spp.

En un homogeneizador que contenía 50 ml de agua estéril se colocaron 2/3 partes del micelio con agar de una caja Petri, posteriormente se homogenizó por 1 minuto, se adicionaron 3 mL del homogeneizado para inocular los matraces que contenían solución (peptona-sacarosa o extracto de malta-sacarosa o extracto de malta desproteinizado) en matraces de 50 ml, los cuales contenían independientemente 30 ml de los diferentes medios de cultivo, posteriormente dichos matraces se incubaron a 28° C. Se utilizó el contenido de cada matraz (muestras descartivas) cada tercer día para determinar la biomasa, proteína solubles y

carbohidratos solubles. Las determinaciones se hicieron por triplicado durante un periodo de crecimiento de 15 días.

7.4.2 Determinación de biomasa en medio líquido.

La biomasa se cuantificó por determinación de peso seco, para ello se filtró y lavó el micelio dos veces con agua bidestilada, se secó a 70 °C por 4 horas, posteriormente se obtuvo la cantidad de micelio por diferencia de peso.

7.4.3 Determinación de biomasa en medio sólido.

Con la finalidad de determinar la cantidad de micelio crecido en medio sólido que se inoculó al grano de trigo y que la cantidad inoculada fuera equivalente a la cantidad de micelio líquido utilizado, se hizo la determinación de biomasa del micelio crecido en medio sólido agregando el contenido de una caja de agar con micelio en un matraz de 250 mL, posteriormente se cubrió el matraz con aluminio, se congeló por 12 horas, transcurrido ese tiempo se agregaron 125 mL de agua destilada, se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 20 minutos, se filtró en caliente, y el papel filtro con la muestra fue secado por 4 horas a 60° C. Se determinó la biomasa por diferencia de peso.

7.4.4 Determinación de curva de crecimiento micelial en sólido.

Se inoculó un trozo de agar con micelio de 0.5 cm de diámetro en el centro de una caja Petri, se incubó a 28° C y se realizaron mediciones diarias del diámetro de crecimiento del micelio de las 5 cepas de *Pleurotus* spp. utilizadas hasta la invasión total de la caja Petri. Se hicieron 5 repeticiones por cepa.

7.4.5 Determinación de carbohidratos.

La concentración total de azúcares se determinó mediante el método de fenol-sulfúrico (Modificado de González *et al.*, 2000), utilizando sacarosa como estándar (10 µg/ µL, lineal 1-5 µL) y a una absorbancia de 490 nm. Se realizaron 3 repeticiones por muestra.

Los reactivos utilizados para esta determinación fueron: 5.5 mL de fenol líquido (90%) más 94.5 mL de agua destilada (concentración final de 5 %), ácido sulfúrico concentrado.

Para obtener la curva patrón se hizo lo siguiente: Colocar en un tubo de ensayo 200 µL de muestra, 200 µL de reactivo de fenol, se ajustó con agua destilada a una cantidad que al sumarla con el H₂SO₄ concentrado diera un volumen total de 2.5 mL, se agregó rápido y con cuidado 1 mL de H₂SO₄ concentrado, se agitó, se mantuvo a temperatura ambiente 10 minutos e incubó a 30°C por 20 minutos y posteriormente se leyó a 490 nm.

7.4.6 Determinación de proteínas.

Para la cuantificación de proteína se utilizó el método de Lowry (modificado de González, *et al.*, 2000), el cual esta basado en el desarrollo de color, mediante una reacción que se efectúa en dos etapas. La primera consiste en la formación de un complejo colorido entre cuatro enlaces peptídicos de la proteína y el ión cúprico en medio alcalino. La segunda etapa es la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu (Ácido fosfololibdico y Ácido fosfotungstico) por el complejo cobre-proteína, dando finalmente un color azul, de intensidad proporcional a la concentración de proteína, que es leído a 750 nm. Esta técnica se utilizó para cuantificar proteínas de cada una de las muestras estudiadas y se realizaron 3 repeticiones por muestra.

Para su realización se prepararon primeramente dos soluciones: Solución A: 2 g NaOH, 10 g Na₂CO₃, 0.1 g de tartrato de sodio y potasio llevados a 50 mL con agua destilada. Solución B: 0.5 g CuSO₄.5H₂O disolver y ajustar a 100 mL con agua destilada. Posteriormente se preparó el reactivo C al mezclar 10 mL de la solución A con 0.2 mL de la solución B esta mezcla se realiza un poco antes de usar este reactivo y por último el reactivo de Folin-Ciocalteu (D): Mezclar una parte del reactivo de Folin (2N) con una de agua.

Preparándola al momento de utilizarla, además se preparó albúmina de suero de bovino (10 μ g/ μ L.) como estándar, lineal 1-10 μ L.

Se colocaron 75 μ L de muestra y se adicionó 750 μ L de reactivo C, se agitó y se mantuvo a temperatura ambiente de 10 a 30 minutos posteriormente se agregó 75 μ L de reactivo de Folín (D) y se agitó posteriormente se ajustó a un volumen total de 2.5 mL con agua destilada y se mantuvo a temperatura ambiente un mínimo de 20 minutos o máximo de 2 horas y se leyó a 750 nm.

7.5 Condiciones para la producción de carpóforos.

7.5.1 Inóculo- grano a partir de micelio crecido en medio líquido y medio sólido.

La producción de “semilla” se realizó utilizando granos de trigo previamente lavados y remojados a temperatura ambiente durante 24 h; posteriormente, se drenó el exceso de agua y se colocaron 100 g de trigo en bolsas de polipapel para su esterilización a 121 °C y 15 lb de presión durante 30 min. Una vez que el grano fue esterilizado y enfriado a temperatura ambiente, se inoculó con un volumen determinado de cultivo líquido de 15 días de crecimiento o con trozos de micelio crecido en medio sólido EMA, en cantidades equivalentes de cada cultivo para cada cepa utilizada. Las bolsas inoculadas se incubaron en una cámara oscura a 28 °C hasta que el micelio invadió totalmente el grano. Se hicieron mediciones del crecimiento micelial cada 24 h, se determinó el tiempo de invasión total del trigo. Las determinaciones se hicieron con 10 repeticiones.

7.5.2 Preparación del sustrato.

Como sustrato se empleó paja de trigo, la cual se picó en trozos de aproximadamente 2-4 cm. de longitud, se colocó en un recipiente con suficiente agua para hidratarla durante 24 h a temperatura ambiente y posteriormente se drenó el exceso de agua. El sustrato fue empacado en bolsas de polipapel (1 kg por bolsa) y posteriormente fue esterilizado a 121 °C y 15 lb de presión durante 60 min. Una vez finalizado el proceso, el sustrato se dejó enfriar a temperatura ambiente para su inoculación.

7.5.3 Obtención de cuerpos fructíferos.

El sustrato estéril y frío fue inoculado asépticamente con la “semilla” (aproximadamente 5 g “semilla”/100 g de sustrato húmedo). Las bolsas fueron comprimidas, selladas y etiquetadas. Se realizaron 10 repeticiones para cada cepa.

Las bolsas de sustrato ya inoculadas se colocaron en una cámara oscura a 28 °C. Después de 5 días de incubación, las bolsas se perforaron para permitir el intercambio gaseoso y posteriormente fueron colocadas en la misma cámara hasta que el micelio invadió completamente el sustrato. Durante este periodo se llevaron a cabo revisiones visuales periódicas para observar el desarrollo del micelio. Se registró el tiempo de invasión y de formación de primordios.

Una vez que el sustrato fue invadido y la formación de primordios comenzó a evidenciarse, se eliminaron las cubiertas de plástico de las pacas formadas con sustrato, posteriormente se llevaron a una cámara de fructificación con humedad de 85-95 % HR; temperatura de 15-30 °C, ventilación de 0.6 % de CO₂ y 12 h/día de luz, para inducir la formación de los esporóforos.

Aproximadamente una semana después de la aparición de los primordios y antes de que ocurriera el proceso de esporulación, se cortaron los cuerpos fructíferos desde su base, se pesaron y midieron.

7.6 Parámetros de productividad.

La precocidad se midió como el número de días transcurrido desde el inicio de la incubación en condiciones de fructificación hasta la primera cosecha de cuerpos fructíferos maduros en cada una de las bolsas (Larraya *et al.*, 2003; Idareta *et al.*, 2004).

Una vez medidos los carpóforos, se clasificaron dependiendo del diámetro alcanzado por su píleo (Salmones *et al.*, 1997) dentro de cuatro grupos. La clasificación fue la siguiente (Cuadro 6):

Cuadro 6. Clasificación de tamaño de píleo alcanzado por los carpóforos

Grupo	Tamaño (cm)
G1	< 5
G2	de 5 a 9.9
G3	de 10 a 14.9
G4	15 o más

(Tomado de Salmones *et al.*, 1997).

Una vez cosechados los cuerpos fructíferos de cada cepa, se pesaron en una balanza granataria, y se les determinó el peso promedio de cuerpos fructíferos cosechados (PMCF), utilizando la siguiente ecuación (Royse *et al.*, 2004).

$$PMCF = \frac{\text{Peso total de hongos frescos cosechados (g)}}{\text{Numero total de hongos}}$$

La eficiencia biológica (%EB) se calculó de acuerdo a Tschierpe y Hartmann (1997) como el peso de hongos frescos entre el peso seco del sustrato por cien. La tasa de producción (Royse, 1989), se calculó dividiendo %EB entre el tiempo total de cultivo desde la inoculación hasta la primera cosecha.

7.7 Parámetros cinéticos.

Para el cálculo de μ y K_m , se obtuvo la ecuación de la curva a partir de la gráfica de biomasa (x) contra tiempo (t) y de dicha ecuación se calculó el valor teórico de la biomasa ($X_{calculada}$). Se determinó la derivada $\frac{dx}{dt}$ de la ecuación obtenida. El mismo procedimiento se siguió para la gráfica de sustrato (s) contra tiempo

(t). Se graficaron los valores de los inversos de $\frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$ contra $\frac{1}{s} \frac{ds}{dt}$ y utilizando la ecuación de Michaelis-Menten, se calculó el valor de V_{max} y K_m .

Para calcular el rendimiento $Y_{x/s}$, se graficaron las derivadas $\frac{dx}{dt}$ contra $\frac{ds}{dt}$ y a partir de la pendiente de la recta, se obtuvo el rendimiento de acuerdo a la ecuación:

$$Y_{x/s} = \frac{dx/dt}{ds/dt}$$

Por último se calculó la velocidad de consumo de nutrientes (q_s) a partir de la ecuación siguiente:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}}$$

7.8 Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS para Windows ver. 12.0. Para la evaluación de las curvas de crecimiento se aplicó una prueba de ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Duncan ($p < 0.05$). Para la comparación entre los diferentes tiempos y parámetros de producción se utilizó un ANOVA de una vía con prueba *post hoc* de Duncan.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1 Recuperación de cepas.

Una de las primeras etapas para la realización del presente trabajo fue la recuperación y activación de las cepas. En el Cuadro 7 se presentan las características de las cepas utilizadas, se indica la procedencia de las mismas, así como, el tipo y abundancia del crecimiento micelial.

Cuadro 7. Cepas activadas en medio sólido (EMA).

Cepa	Procedencia	Crecimiento Micelial	
		Tipo	Abundancia
PCM	H. Leal. UNAM, D. F. México	Algodonoso	Exuberante
IE200	Instituto de Ecología, Méx. (<i>P. djamur</i> , var. sal)	Algodonoso	Regular
ECS127R	ECOSUR Chiapas, Méx. (<i>Pleurotus</i> sp.)	Algodonoso	Regular
IE202	Instituto de Ecología, Méx. (<i>P. djamur</i> , var. sal.)	Algodonoso	Exuberante
RP	Productor en D. F., Méx. (<i>Pleurotus</i> sp.)	Filamentoso	Regular

En la Figura 4 se muestra la morfología micelial de las cepas empleadas, los resultados nos indican que las cepas utilizadas presentan variaciones en su tipo y abundancia micelial, destacando el tipo algodonoso para las cepas PCM, IE200, ECS127R e IE202, mientras que la cepa RP muestra un tipo de crecimiento micelial filamentoso. En cuanto a la abundancia se presentan nuevamente dos tipos, exuberante (PCM, IE202) y regular (IE200, ECS127R, RP), estos resultados coinciden en el tipo de crecimiento y abundancia con los reportados por Valencia (2002).

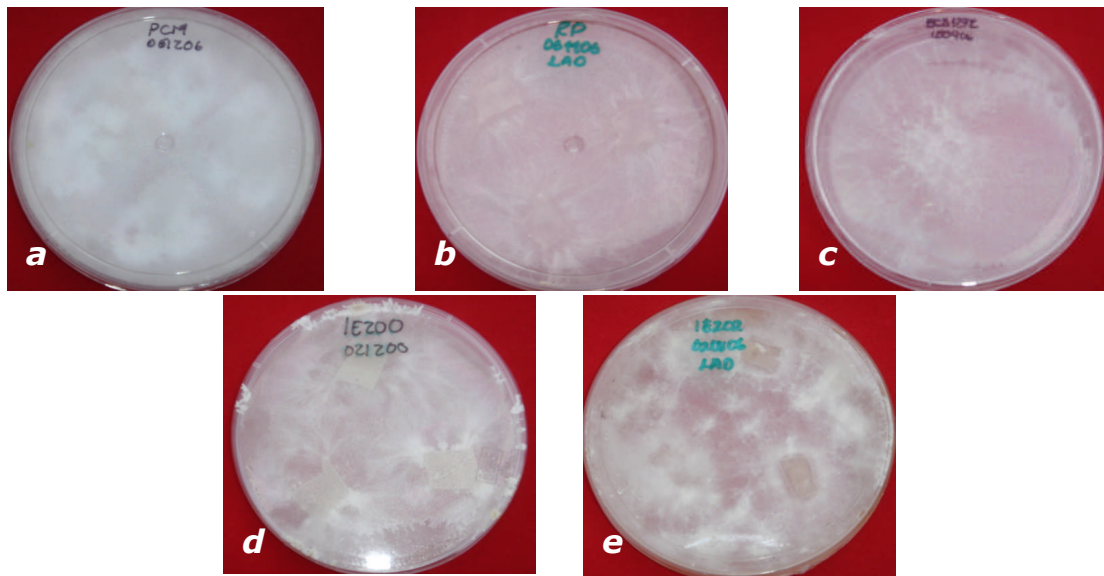


Figura 4. Tipo y abundancia de micelio de cepas de *Pleurotus*. PCM (a), RP (b), ECS127R (c), IE200 (d) y IE202 (e).

8.2 Crecimiento micelial en medio sólido.

En la Figura 5 se presenta el comportamiento que siguieron las cepas. Se muestra que la cepa PCM, alcanzó el crecimiento máximo de 8.16 cm de diámetro a los 8 días de incubación, lo que representa una velocidad de 10.2 mm/día. Se observó un comportamiento lineal a lo largo del tiempo, lo cual coincide con lo reportado por Sánchez y Royse (2001), quienes indican que este tipo de comportamiento se presenta en el crecimiento del micelio en medio sólido.

Para el caso de la cepa IE200 (Figura 5), a los 8 días de incubación se alcanzó un diámetro micelial de 7.98 cm y una velocidad de 9.9 mm/día. De nuevo se observa una tendencia lineal entre los días 1 y 7, manteniéndose constante en el último día.

En la Figura 5 también se presenta la curva de crecimiento micelial obtenida para la cepa ECS127R, en este caso, la cepa presentó un diámetro de 6.9 cm a los 8 días de incubación y una velocidad de crecimiento de 8.6 mm/día. A partir del día 2 se presenta un comportamiento lineal hasta el término de la curva.

La cepa RP fue la que presentó la mayor tasa de crecimiento micelial ya que a los 8 días de incubación se obtuvo un diámetro de 8.6 cm y una velocidad de crecimiento de 10.7 mm/día (Ver figura 5), al igual que en la cepa PCM, la tendencia lineal se presenta a partir del día 1 y se estabiliza en el día 7.

Sin embargo, la cepa IE202 fue la que mostró menor velocidad de crecimiento con 6.62 cm de diámetro a los 8 días de incubación con una velocidad de crecimiento de 8.2 mm/día (Figura 5), se observó una tendencia lineal en la curva de crecimiento a partir del día 1, y mantiene su comportamiento hasta el día 8.

El análisis estadístico de medidas repetidas permitió comparar el comportamiento de las cepas a lo largo del tiempo de crecimiento micelial, se encontraron diferencias estadísticas significativas ($F= 11.057$, $p<0.0001$) entre las cepas, y la prueba *a posteriori* de Duncan indicó que las diferencias se presentaron entre las cepas RP, PCM, IE200, con respecto a las cepas IE202 y ECS127R, en las cuales se obtuvo la menor tasa de crecimiento (Figura 5).

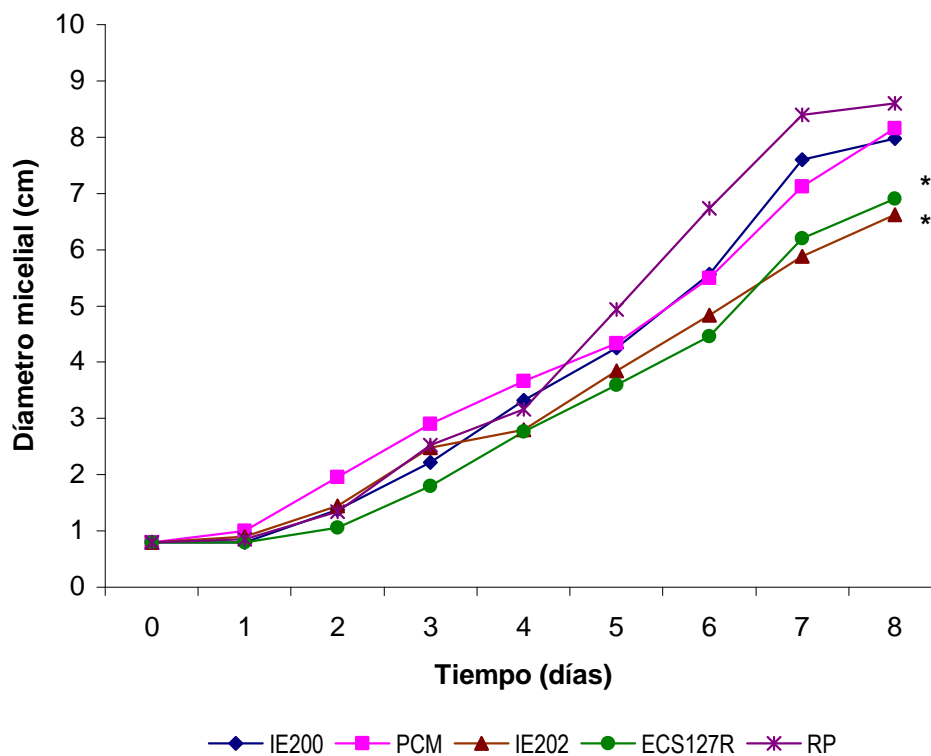


Figura 5. Crecimiento micelial de las cepas de *Pleurotus* en medio sólido.
El * indica las diferencias estadísticas significativas (Post hoc Duncan, $p< 0.05$).

En el Cuadro 8 se presenta el crecimiento progresivo del micelio de las distintas cepas crecidas en medio sólido, estas presentaron diferencias a lo largo de los días para cada una de las cepas

Cuadro 8. Crecimiento micelial de las cepas de *Pleurotus*.

Cepa \ Días	Diámetro micelial en cm.								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
IE200	0.8±0.00	0.8±0.00	1.38±0.17	2.22±0.48	3.32±0.43	4.26±0.56	5.56±0.92	7.6±1.29	7.9 ±0.85 ^a
PCM	0.8±0.00	1.0±0.00	1.96±0.08	2.9±0.21	3.66±0.47	4.34±0.55	5.5±0.63	7.12±0.34	8.16±0.32 ^a
IE202	0.8±0.00	0.9±0.00	1.44±0.05	2.48±0.21	2.8±0.47	3.84±0.26	4.84±0.28	5.88±1.03	6.6±1.10 ^b
ECS127R	0.8±0.00	0.8±0.00	1.06±0.08	1.8±0.38	2.76±0.32	3.6±0.54	4.46±0.71	6.2±1.13	6.9±1.18 ^b
RP	0.8±0.00	0.85±0.00	1.34±0.05	2.52±0.46	3.16±0.50	4.94±0.74	6.74±0.76	8.4±0.34	8.6±0.00 ^a

Media ± DE para 5 repeticiones, letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a Duncan ($p \leq 0.05$).

El tipo de crecimiento algodonoso o filamentososo, o su abundancia exuberante o regular nos indican cualitativamente la producción de biomasa de las cepas, sin embargo, para determinar cuantitativamente dicha producción se decidió determinar el peso seco de las cepas cuando invadieron la caja Petri con EMA en un 100% es decir, un diámetro de 8.6 cm.

En el Cuadro 9 se indican los valores de los pesos secos obtenidos para la invasión total de micelio de la caja Petri para las 5 cepas utilizadas, el Anova de una vía reveló la formación de 4 grupos dependiendo de la cantidad de biomasa producida. El grupo con menor biomasa producida lo constituyó la cepa IE202 (0.020 g), la cepa que le siguió fue la RP con una cantidad de biomasa de 0.035 g, el tercer grupo lo formaron las cepas PCM e IE200, con una producción de 0.058 g y de 0.062 g respectivamente, finalmente la cepa ECS127R conforma el cuarto grupo con la mayor biomasa producida (0.077 g).

Dependiendo de la cepa se observa que puede o no presentarse una correlación entre las velocidades de crecimiento y la producción de biomasa para el caso de las cepas IE200 y PCM, esta correlación fue

positiva debido a que para ambas cepas se obtiene una mayor velocidad de crecimiento (9.9 y 10.2 mm/d respectivamente) con una mayor cantidad de biomasa (0.062, 0.058 g, respectivamente), sin embargo, la cepa RP presentó la mayor velocidad de crecimiento comparada con las demás cepas (10.7 mm/d), pero la biomasa obtenida fue la menor 0.035 g, por lo que para esta cepa la correlación fue negativa. Situación que también se presenta para la cepa ECS127R que presentó una velocidad de crecimiento baja (8.6 mm/d) y fue la que mostró la mayor producción de biomasa (0.077 g). Sin embargo para el caso de la cepa IE202 se obtuvo una velocidad de crecimiento muy baja (8.2 mm/d) y también la producción de biomasa fue mas pequeña (0.020 g) de las cepas trabajadas.

Posiblemente la forma de crecimiento diferencial que se obtuvo en cada cepa esta relacionada con el metabolismo de la misma, de tal manera que la rapidez con la que invade tenga que ver con el tipo y cantidad de enzimas extracelulares que produce. En este caso específico se utilizó el mismo medio de cultivo, que de acuerdo a las referencias bibliográficas, tiene un efecto sobre la elongación y ramificación de la hifa, por lo que es probable que las características de crecimiento y formación de biomasa sean resultado del metabolismo de la cepa considerada, como se indicó anteriormente, por lo que fue posible relacionar en este estudio la morfología micelial con el crecimiento y formación de biomasa

Cuadro 9. Parámetro de crecimiento para las cepas de *Pleurotus* cultivadas en caja Petri.

Cepa	Biomasa (g)	Diametro micelial (cm)	Velocidad de crecimiento (mm/d)
RP	0.0356±0.009 ^a	8.60	10.7
PCM	0.0582±0.015 ^b	8.10	10.2
IE200	0.0623±0.010 ^b	7.90	9.9
ECS127R	0.0770±0.012 ^c	6.90	8.6
IE202	0.0205±0.001 ^d	6.60	8.2

Media ± desviación estándar (DE) para 5 repeticiones
Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a Duncan ($p \leq 0.05$).

8.3 Cinéticas de crecimiento.

La determinación de los parámetros cinéticos biomasa, carbohidratos y proteínas se hicieron por triplicado a lo largo de 15 días de crecimiento.

8.3.1 Producción de biomasa.

Con la finalidad de conocer en que medio de cultivo líquido las cepas producían mayor cantidad de biomasa, se seleccionaron para la realización de este estudio los siguientes medios; peptona de caseína con adición de sacarosa (PCS), extracto de malta con adición de sacarosa (EMS) y extracto de malta desproteinizado (EMD) y extracto de malta desproteinizado con sacarosa (EMDS).

En la Figura 6 se muestra el crecimiento de la cepa ECS127R en los medios de cultivo líquido PCS, EMS y EMD. Con el medio PCS, en el día 15 se obtuvieron 2.17 g/L, para el medio EMD la biomasa fue de 0.7467 g/L y con el medio EMS, la cantidad de biomasa obtenida al final de éste periodo fue de 4.18 g/L.

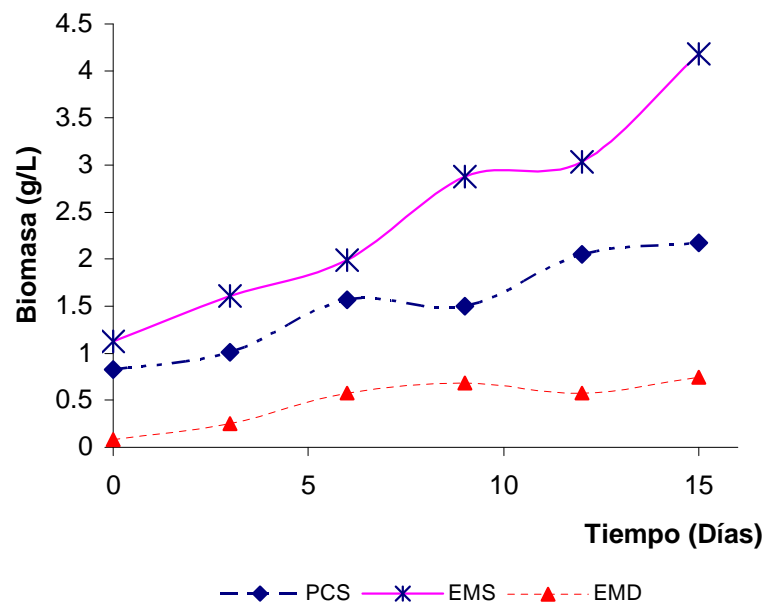


Figura 6. Biomasa para la cepa ECS127R, crecida en diferentes medios de cultivo líquido.

Para comparar el incremento de biomasa de la cepa ECS127R en los diferentes medios de cultivo utilizados, se calcularon los valores porcentuales para cada medio. Por lo que se consideró como base de cálculo el 100% al inicio del crecimiento micelial. Se observó que fue el extracto de malta desproteinizado (EMD) con el que se obtuvo un mayor incremento de biomasa después de 15 días de crecimiento (ver Figura 7).

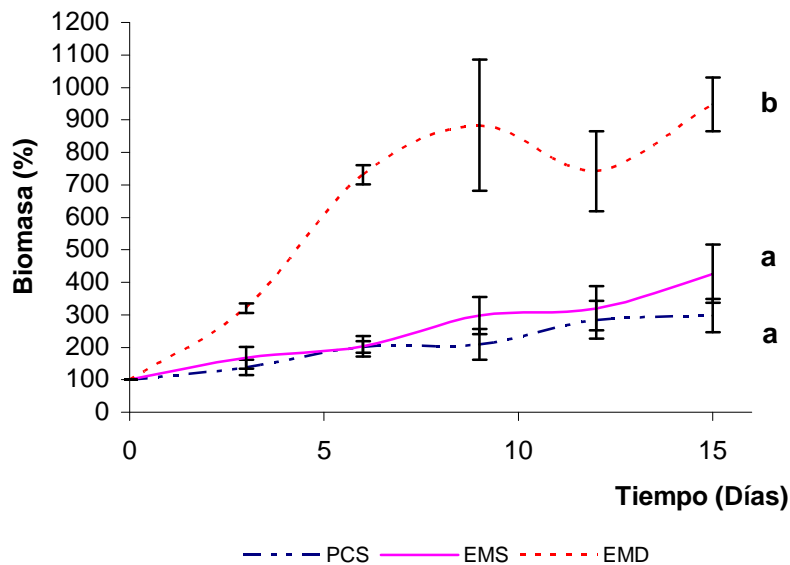


Figura 7. Porcentaje de biomasa de la cepa ECS127R en diferentes medios de cultivo líquido. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p < 0.05$).

Al aplicar la prueba estadística de ANOVA de medidas repetidas, se encontraron diferencias significativas entre los medios utilizados ($F_{(2,12)}=169.07$, $P < 0.0001$) y la prueba a posteriori de *Duncan* ($p < 0.05$) indicó la formación de dos grupos, el mayor incremento de biomasa se obtuvo con el medio EMD, mientras que en los medios de cultivo PCS y EMS fue menor.

La mayor cantidad de biomasa se obtuvo con el medio de cultivo EMD. En base seca el extracto de malta contiene aproximadamente 90–92 % de carbohidratos y este compuesto de hexosas (glucosa y fructosa), disacáridos (maltosa, sacarosa), trisacáridos (maltotriosa) y dextrinas (polímeros de glucosa α 1, 4 con ramificaciones α 1,6). Las sustancias nitrogenadas presentes en el extracto de malta incluyen proteínas, péptidos, aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas. Para el caso del medio líquido PCS, la peptona de caseína tiene diez veces más cantidad de nitrógeno total (13.3 %), comparada con el extracto de malta (1.3%). Es necesario considerar que ambos sustratos se les adicionó el disacárido sacarosa, y la cantidad de biomasa obtenida no fue significativamente diferente. Para el caso de extracto de malta desproteinizado, el tratamiento que se le dio al sustrato implicó la eliminación del contenido proteico, tal vez esto permitió que la cepa utilizara más rápidamente el sustrato, emitiendo menor cantidad de enzimas extracelulares para degradarlo.

Ardon *et al.* (1996) obtuvieron valores de biomasa de 4.8 g/L a los 8 días de incubación, al utilizar una cepa *Pleurotus ostreatus*, el medio de cultivo que utilizaron contenía 5 g/L de glucosa, 0.5 g/L de extracto de levadura, 0.6 g/L de aspargina y diferentes tipos de sales como fosfatos, nitratos, etc. Para el caso de la cepa ECS127R el valor máximo de biomasa fue de 4.18 g/L, en un tiempo de 15 días, es importante mencionar que el medio de cultivo para ambos estudios fue diferente y que también la cepa fue distinta, estas características tienen una influencia importante en la producción de la biomasa.

Para la cepa IE200 (Figura 8) con medio de cultivo PCS en un periodo de 15 días se produjeron 1.51 g/L de biomasa, utilizando el medio EMS, la biomasa obtenida en este mismo periodo de tiempo fue de 4.39 g/L y cuando se evaluó el medio líquido EMD, la cantidad celular formada fue de 2.04 g/L a los 15 días del cultivo.

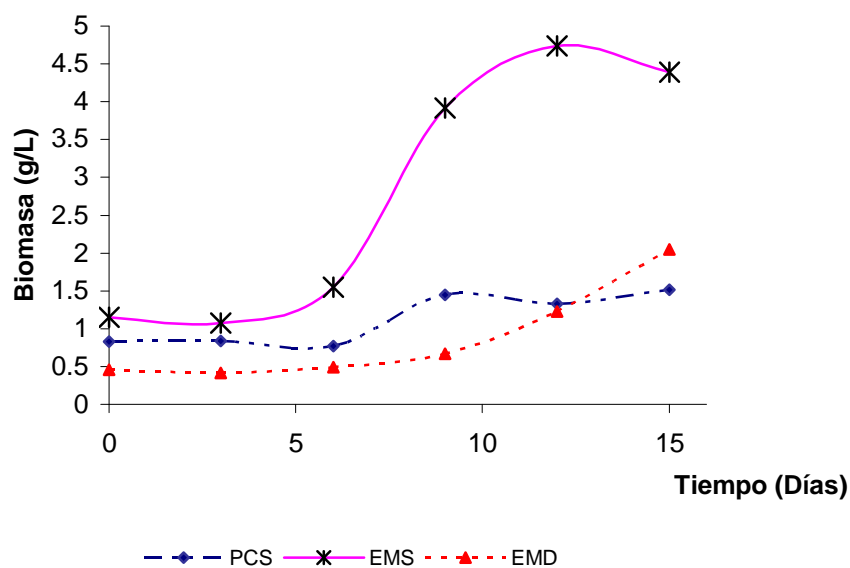


Figura 8 Producción de biomasa para la cepa IE200 en distintos medios de cultivo líquido.

Con el estadístico de medidas repetidas para los valores porcentuales calculados, se encontraron diferencias entre los medios utilizados, la prueba de rango múltiple de *Duncan* ($p < 0.05$) indicó que las diferencias fueron entre los medios EMD y EMS con respecto al medio PCS, siendo en los dos primeros en los que se obtuvo mayor incremento de biomasa con respecto al tiempo de cultivo (Figura 9).

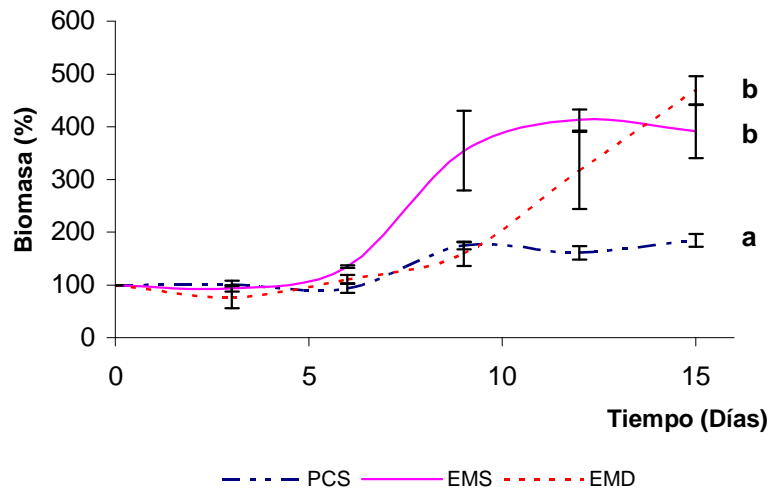


Figura 9. Porcentaje de biomasa de la cepa IE200 en diferentes medios de cultivo líquido. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p < 0.05$).

Los resultados obtenidos para la cepa IE200 indicaron que la producción de biomasa se ve incrementada utilizando los medios EMS y EMD, se han realizado estudios previos como los presentados por Wu *et al.* (2003), que evaluaron la producción de biomasa de *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) en un medio de cultivo base que contenía 2 g/L de peptona, 2 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de KH_2PO_4 , 0.6 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, además de adicionar 3 fuentes de carbono: fructosa, glucosa y harina de maíz (un carbohidrato para cada experimento) con una concentración de 30 g/L para los 3 casos. Obteniendo mejores resultados con la adición de harina de maíz con una biomasa generada de 14.6 g/L a los 12 días de incubación, mientras que para fructosa se obtuvieron valores de 13.3 g/L a los 16 días de incubación y 11.8 g/L de biomasa para glucosa a los 12 días de incubación. Estos valores son superiores a los resultados obtenidos para las cepas IE200 y ECS127R en un tiempo de 15 días, considerando que la concentración de los suplementos adicionados al medio base tuvieron una concentración de 30 g/L, lo cual pudo ser determinante para la producción de biomasa. Así mismo, debe de considerarse que al tratarse de cepas distintas, intervienen factores morfológicos, fisiológicos y genéticos.

En la Figura 10 se presentan las curvas de crecimiento para la cepa PCM utilizando diferentes medios de cultivo.

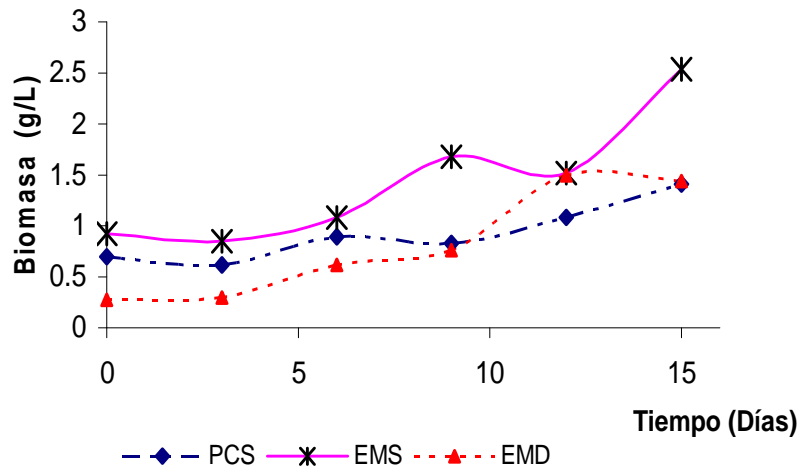


Figura 10. Producción de biomasa para la cepa PCM en distintos medios de cultivo líquido.

El cultivo líquido de PCS tuvo una biomasa final de 1.41 g/L después de 15 días de crecimiento, cuando se utilizó EMS como medio de cultivo, la biomasa fue de 2.53 g/L y con el medio EMD, al término de los 15 días del cultivo la biomasa fue de 1.44 g/L (Figura 11).

El ANOVA de medidas repetidas para los valores porcentuales de biomasa, mostró diferencias estadísticas significativas entre los tres medios utilizados y al realizar la prueba a posteriori de *Duncan* ($p < 0.05$), se observó que el medio EMD (grupo b) presentó el mayor incremento en biomasa con respecto a los medios de cultivo PCS y EMS (grupo a).

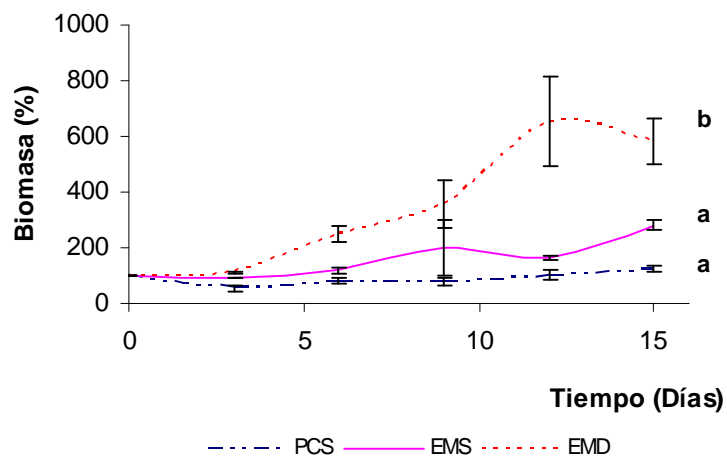


Figura 11. Porcentaje de biomasa de la cepa PCM en diferentes medios de cultivo líquido.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p < 0.05$).

En las tres cepas utilizadas se logró obtener un incremento porcentual de biomasa con el medio EMD con respecto a los otros medios utilizados en un tiempo de 15 días. Y se observó que con el medio PCS se obtuvo el menor incremento en la biomasa. Por lo que independientemente de la cepa utilizada, resultó más fácilmente aprovechable el medio de cultivo que contenía menor proporción de nitrógeno (EMD), lo que sugiere que los hongos de este género utilizan estrategias simples de degradación de compuestos orgánicos, teniendo mayor éxito con carbohidratos en comparación con compuestos nitrogenados.

De todas las cepas utilizadas, la PCM fue la que obtuvo menor crecimiento micelial, en el medio de cultivo EMS, en el periodo evaluado con respecto a las cepas IE200 y ECS127R ya que estas cepas presentan valores de 4.1 y 4.8 g/L de biomasa mientras que la cepa PCM únicamente muestra un valor de 2.5 g/L de biomasa. Lo que pone de manifiesto que las características morfogénicas de cada cepa son importantes para la utilización de los nutrientes y producción de enzimas para degradarlos.

Para determinar la influencia del disacárido sacarosa sobre la producción de biomasa, se realizó la cinética de crecimiento de la cepa PCM con los medios de cultivo EMD Y EMDS.

En la Figura 12 se muestran las curvas de crecimiento obtenidas para la cepa PCM con ambos medios de cultivo, se obtiene una mayor producción de biomasa, después de 25 días de cultivo, con el medio EMDS (2.66 g/L), en comparación con el medio EMD que tuvo una producción de biomasa de fue de 1.14 g/L.

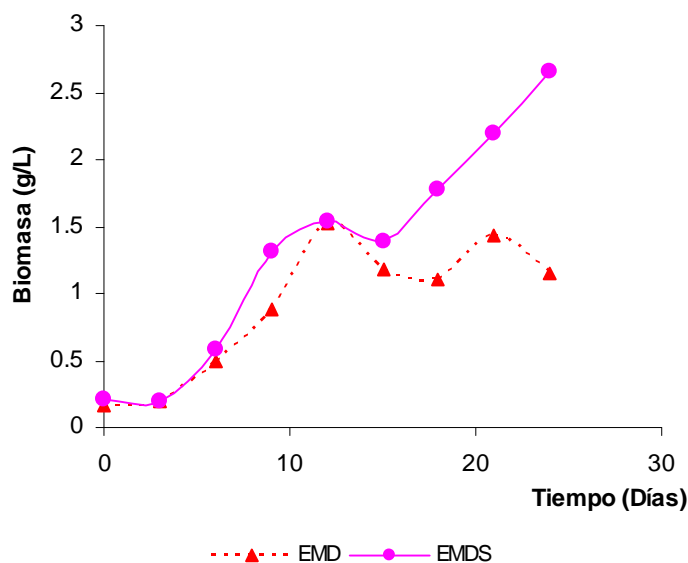


Figura 12. Producción de biomasa de la cepa PCM con y sin adición de sacarosa en medio EMD.

Con respecto al porcentaje de biomasa se observa en la Figura 13 que se obtiene el mayor incremento con el medio EMDS, lo que indica que la cantidad de biomasa obtenida se ve influida por la presencia del disacárido sacarosa.

Estudios previos de Motolinia *et al.* (2003), utilizando una cepa *Pleurotus ostreatus*, demostraron que al utilizar vinaza tequilera diluida al 20 % y adicionada con glucosa, almidón, xilosa o sacarosa, en concentraciones de 10, 15, 20 g/L para cada caso, el incremento de la fuente de carbono provocó un aumento en la biomasa, así, al utilizar 10 g/L almidón se produjo una biomasa de 3.0 g/L, cuando se adicionaron 15 g/L se obtuvo una biomasa de 3.88 g/L y con 20 g/L de almidón, se alcanzó una biomasa de 5.4 g/L.

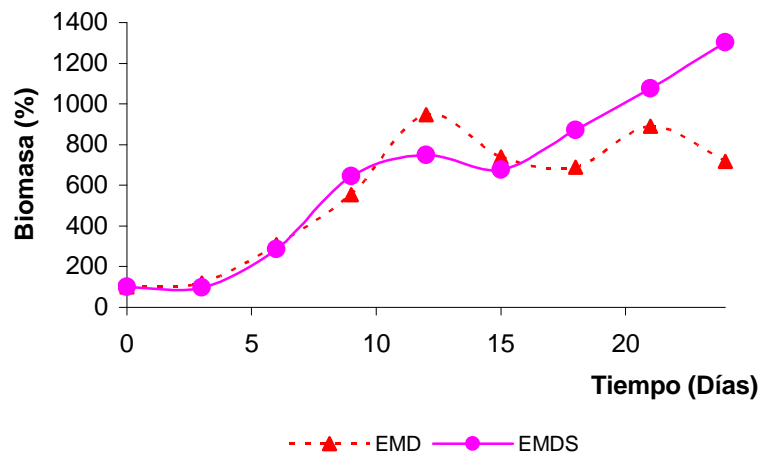


Figura 13. Porcentaje de biomasa de la cepa PCM con y sin adición de sacarosa en medio EMD.

Se observa que con la cepa PCM para el medio EMDS, se obtuvo un valor de biomasa de 2.66, mayor al obtenido por la cepa *P. ostreatus* crecida en medio suplementado con glucosa y xilosa (2.24 y 2.12 g/L, respectivamente). La complejidad de los carbohidratos utilizados fue un factor importante para la producción de biomasa, debido que la nutrición característica de estos macromicetos depende de la acción de las enzimas extracelulares que secretan.

Las ventajas metabólicas que presentan las diferentes cepas utilizadas en este estudio les permite desarrollarse en los diversos medios de cultivo con un crecimiento diferencial, con el objetivo de evaluar la capacidad de crecimiento de las cepas utilizadas se hizo la comparación entre ellas para el medio de

cultivo EMD. En la Figura 14 se presentan las curvas de crecimiento obtenidas para las cepas ECS127R, IE200, PCM y RP.

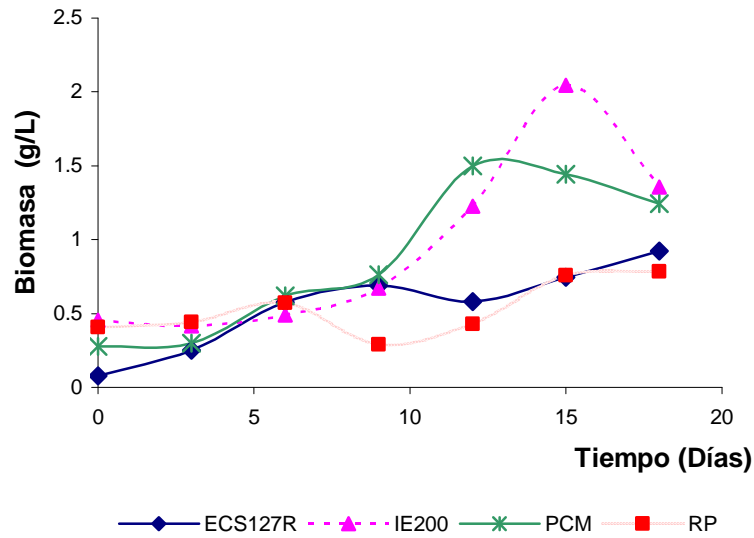


Figura 14. Producción de biomasa para la cepa IE200, PCM, RP, ECS127R en el medio de cultivo EMD.

El análisis de varianza de medidas repetidas para el valor porcentual de la biomasa (ver Figura 15), mostró diferencias significativas entre las cepas ($F_{(3,14)}=19.7$, $P<0.0001$) y a partir de la prueba de rango múltiple de Duncan se formaron tres grupos, encontrándose que la cepa con mayor incremento en la biomasa fue la ECS127R, en comparación con las cepas IE200, PCM, y RP, que se ubica en los dos grupos restantes, los cuales presentan un valor porcentual de biomasa menor.

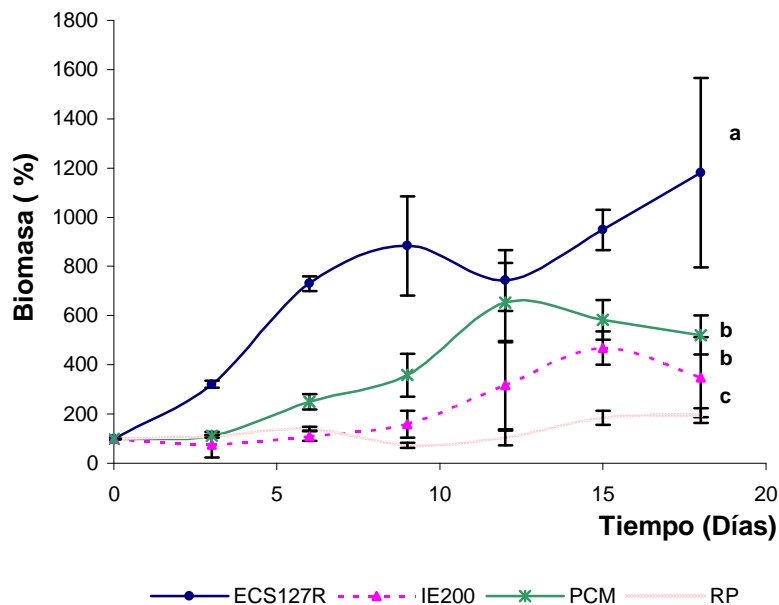


Figura 15. Porcentaje de biomasa para las cepas IE200, ECSR127, RP y PCM con el medio de cultivo EMD.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p < 0.05$).

8.3.2 Cuantificación de carbohidratos solubles.

Para realizar las determinaciones de carbohidratos solubles, primeramente se obtuvo una curva patrón, utilizando sacarosa como estándar y con una relación lineal 1-10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Cuadro 10). Alcanzados estos resultados se graficó la concentración contra la absorbancia para obtener la ecuación que se muestra en la Figura 16 y al despejarla se estableció la concentración de la muestra.

Cuadro 10. Curva estándar de fenol-sulfúrico

Tubo	Concentración Sacarosa ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Sacarosa (μl)	Reactivo Fenol (μL)	Ac. Sulfúrico (μL)	Ajuste con agua (μL)	Absorbancia (490 nm)
1	0	0	200	1000	1300	0
(Blanco)	0	0	200	1000	1300	0
2	0.012	3	200	1000	1297	0.023
3	0.016	4	200	1000	1296	0.032
4	0.024	6	200	1000	1294	0.049
5	0.032	8	200	1000	1292	0.072
6	0.04	10	200	1000	1290	0.084

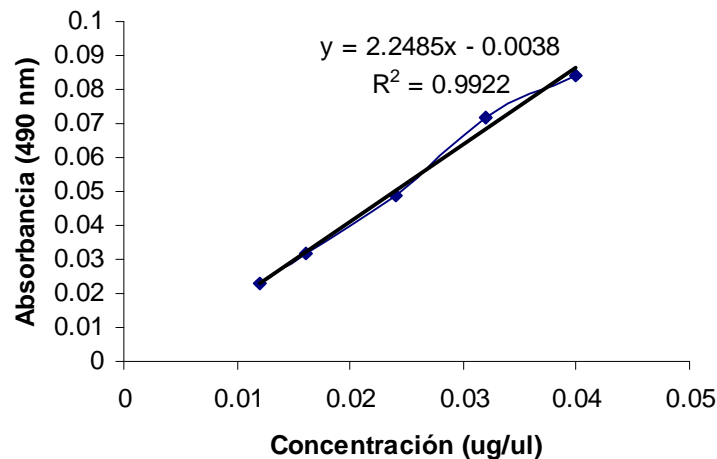


Figura 16. Curva estándar de sacarosa, la línea de color negra indica la línea de regresión lineal

A partir de la gráfica lograda de la Figura 16 y de la ecuación obtenida, se despeja a “x” consiguiendo la ecuación siguiente:

$$x = (y + 0.0038) / 2.2485$$

En donde “y” representa la absorbancia de nuestra muestra y “x” es la concentración desconocida por lo que substituyendo los valores se obtuvieron los datos correspondientes a las muestras trabajadas.

Como ya se mencionó anteriormente las mejores producciones de biomasa se dan a partir de los 9 y hasta los 15 días de crecimiento, Wu *et al.* (2004) sugieren que la relación C/N es otro parámetro importante que se necesita optimizar para el crecimiento micelial del hongo, en la siguiente parte del estudio se determinó la evolución que sigue el sustrato en las diferentes cinéticas de crecimiento de las cepas utilizadas, por lo que se describe el comportamiento de este parámetro a lo largo del cultivo.

En la Figura 17 se observa la variación del contenido de carbohidratos solubles en el medio de cultivo, durante un periodo de 15 días de crecimiento, con la cepa ESC127R. Para el medio PCS la cantidad de azúcares en el periodo de cultivo fue 2.13 g/L, en medio EMS el contenido fue de 2.44 g/L y para el medio EMD 0.27 g/L de carbohidratos.

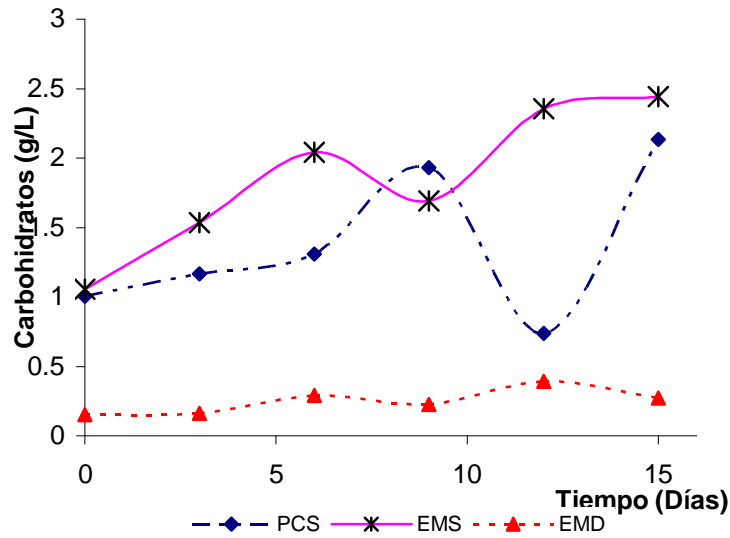


Figura 17. Contenido de carbohidratos solubles en distintos medios con la cepa ECS127R.

La prueba de ANOVA de medidas repetidas no indicó diferencias estadísticas significativas ($F_{(2,6)} = 2.66, p < 0.148$) en el porcentaje de carbohidratos obtenidos con los diferentes medios de cultivo para la cepa ECS127R (ver Figura 18). Lo que muestra que para esta cepa no fue determinante la composición del medio de cultivo utilizado en la producción de carbohidratos.

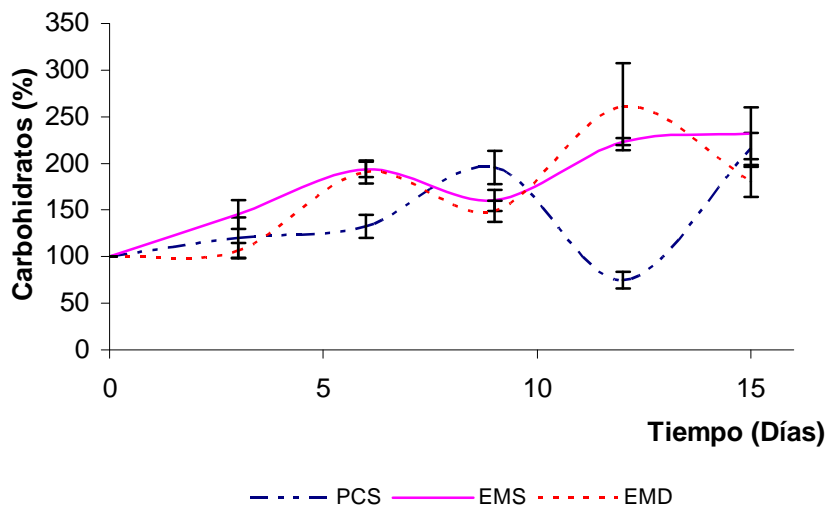


Figura 18. Porcentaje de carbohidratos solubles en distintos medios de cultivo líquido con la cepa ECS127R.

Rogero *et al.* (2003), indican que al existir un decremento de la concentración de glucosa, existe un incremento de carbohidratos totales contenidos durante el crecimiento del hongo en medio líquido, sin embargo, en este estudio el medio EMD no presenta diferencia en la producción de azúcares con respecto a los medios EMS y PCS, en los cuales se adicionó sacarosa en una concentración de 20 g/L.

Para la cepa IE200, se muestra en la Figura 19 la variación del contenido de carbohidratos solubles en el cultivo, utilizando diferentes medios. Con el medio PCS, para el día 15, se obtuvieron 1.24 g/L de azúcares, con EMS se obtuvieron 0.86 g/L de carbohidratos y para el medio EMD la concentración fue de 0.22 g/L.

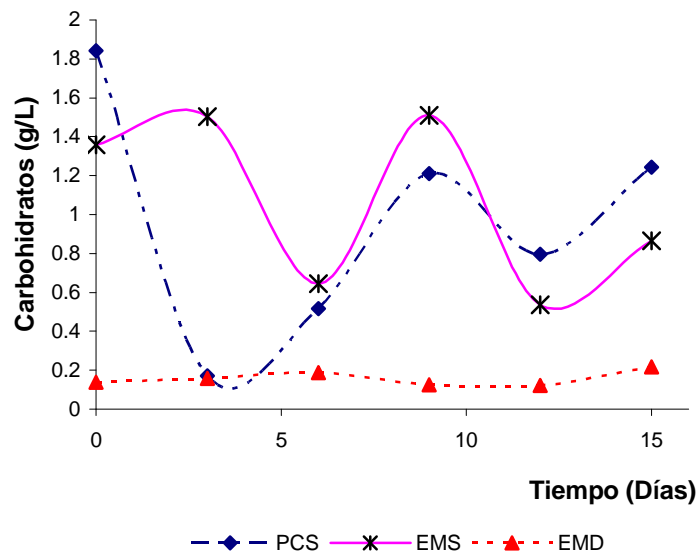


Figura 19. Contenido de carbohidratos solubles en distintos medios de cultivo líquido con la cepa IE200.

Al realizar el ANOVA de medidas repetidas para el porcentaje de carbohidratos producidos por la cepa IE200 en los diferentes medios de cultivo, se encontraron diferencia significativas ($F_{(2, 6)} = 18.85$, $p < 0.003$), y la prueba de rango múltiple de Duncan reveló la formación de tres grupos, dentro de los cuales fue en el medio EMD en el que se obtuvo el mayor incremento de azúcares (ver Figura 20).

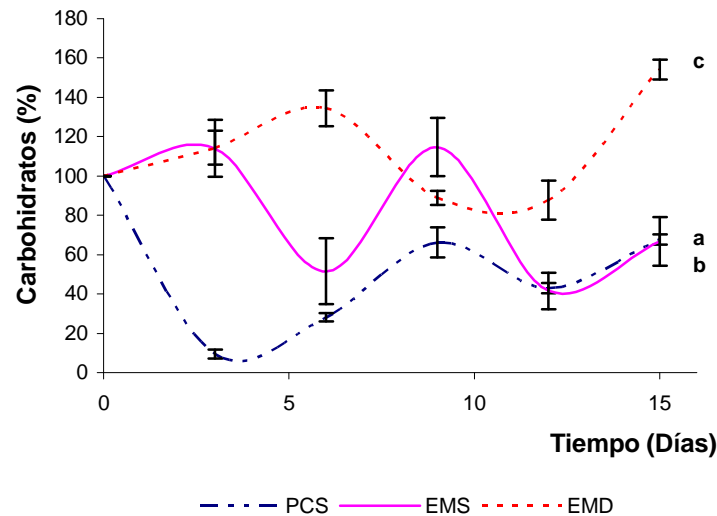


Figura 20. Porcentaje de carbohidratos solubles en distintos medios de cultivo líquido con la cepa IE200.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p < 0.05$).

Rogério *et al.* (2003), realizaron estudios sobre la producción de exopolisacáridos y carbohidratos totales, determinándolos con el método de fenol-sulfúrico en cepas de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus ostreatoroseus*, preparando una solución acuosa con 1 g/L de peptona, 2 g/L extracto de levadura, 1g/L K_2PO_4 , 0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ y 60 g/L de glucosa, obteniendo exopolisacáridos de 5.8 g/L con la cepa *Pleurotus ostreatus* y 1.4 g/L con la *Pleurotus ostreatoroseus* después de 7 días de fermentación en matraces de 500 ml conteniendo 100 ml de cultivo, es importante destacar que la concentración de azúcares utilizado por estos investigadores es 3 veces mayor que la que se utilizó en el presente estudio. También debe tenerse en cuenta que aunque la cepa IE200 pertenece al complejo de especies *P. djamur*, al igual que la cepa *P. ostreatoroseus*, utilizada por Rogério *et al.* (2003), la concentración de 60 g/L de glucosa utilizada por estos investigadores permitió la generación de una cantidad equivalente (1.4 g/L) a la producida por la cepa IE200 (1.24 g/L), en la mitad de tiempo. Otro factor importante a considerar es el decremento de pH que se presenta durante el tiempo del cultivo, ya que durante el metabolismo de los azúcares se presenta producción ácidos orgánicos y la consecuente disminución de pH (Rajarathnam *et al.*, 1992).

La producción de carbohidratos solubles para la cepa PCM cultivada en diferentes medios se muestra en la Figura 21, para el caso del medio PCS en el día 15 la concentración de azúcares fue de 2.13 g/L, en medio

líquido utilizando EMS se obtuvo una concentración de carbohidratos de 1.70 g/L y con el medio EMD, al final del cultivo la concentración fue de 0.06 g/L.

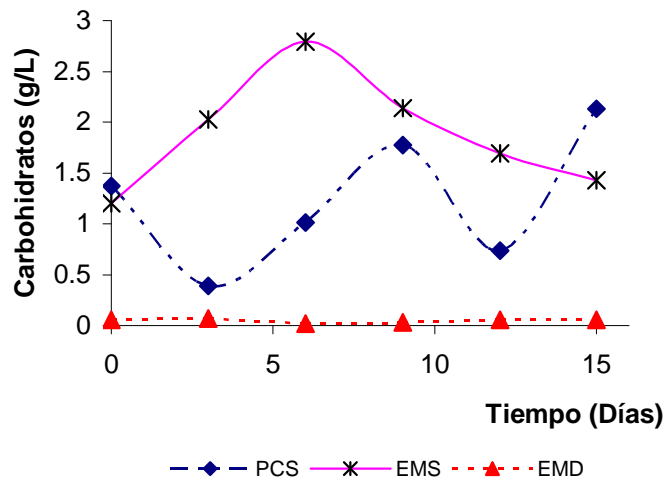


Figura 21. Contenido de carbohidratos solubles en distintos medios de cultivo líquido con la cepa PCM.

Al realizar la prueba de ANOVA de medidas repetidas, para el porcentaje de carbohidratos, se detectaron diferencias significativas entre los medios utilizados ($F_{(2, 6)} = 24.83, p < 0.001$), la prueba *post hoc* de Duncan ($p < 0.05$) clasificó en dos grupos, de tal forma que el mayor incremento de azúcares fue con el medio PCS (grupo a), con respecto a los medios EMS y EMD (grupo b), ver Figura 22.

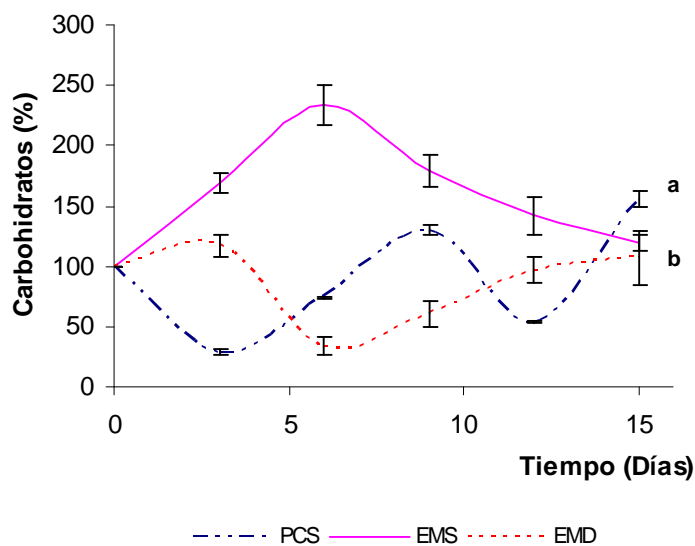


Figura 22. Porcentaje de carbohidratos solubles en distintos medios de cultivo líquido con la cepa PCM.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p < 0.05$).

8.3.3 Cuantificación de proteínas solubles.

La cuantificación de proteínas solubles se realizó utilizando la curva patrón, utilizando albumina de suero bovino como estándar y con una relación lineal 1-10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Cuadro 11). Logrados estos resultados se graficó la concentración contra la absorbancia para obtener la ecuación que se muestra en la Figura 23 y al despejarla se estableció la concentración de la muestra.

Cuadro 11. Curva estándar de Lowry

Tubo	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Albumina (μL)	Reactivo C (μL)	Reactivo D (μL)	Ajuste con agua (μL)	Absorbancia (750 nm)
1 BLANCO	0	0	750	75	1600	0
2	0.024	6	750	75	1669	0.218
3	0.032	8	750	75	1667	0.298
4	0.048	12	750	75	1663	0.388
5	0.064	16	750	75	1659	0.473
6	0.08	20	750	75	1655	0.565

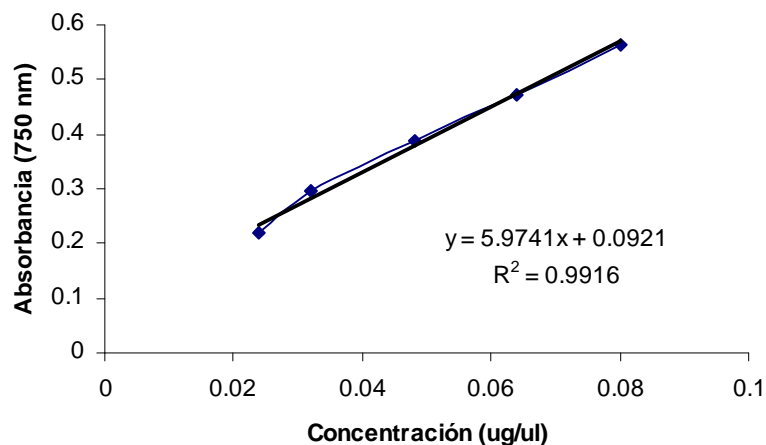


Figura 23. Curva estándar de albúmina de suero bovino, la línea de color negra es la línea de regresión lineal

A partir de la grafica obtenida en la Figura 23 y de la ecuación lograda, se despeja a "x" y nos queda la ecuación como sigue:

$$x = (y - 0.0921) / 5.9741$$

En donde “y” representa la absorbancia y “x” es la concentración desconocida, por lo que sustituyendo los valores, se alcanzan los datos correspondientes a las muestras trabajadas.

Para la cepa ESC127R crecida en los diferentes medios de cultivo, la variación de la concentración de proteína soluble durante 15 días de cultivo se muestra en la Figura 24. Cuando se utilizó PCS, la concentración de proteína fue de 0.07 g/L, con el medio EMS, el contenido proteico fue de 0.05 g/L y en el medio EMD se obtuvieron 0.03 g/L.

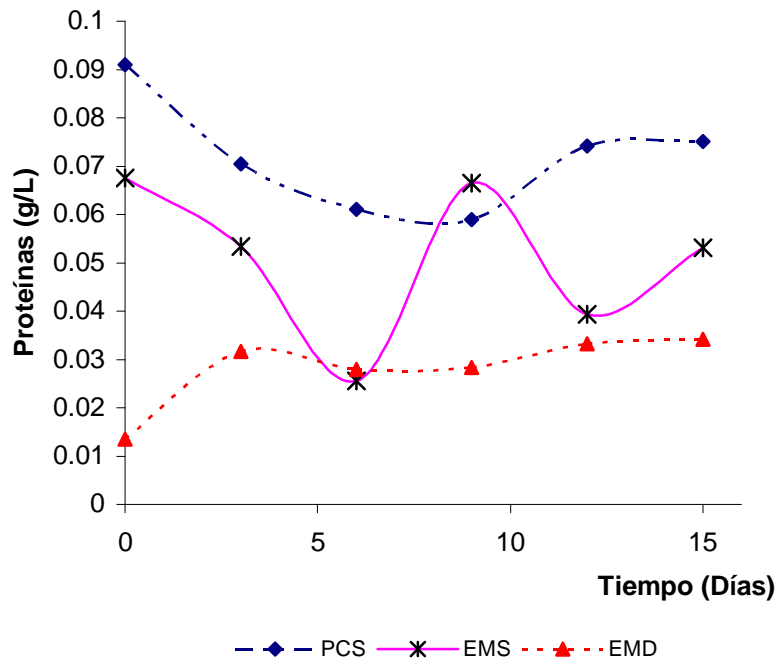


Figura 24. Contenido de proteínas solubles en distintos medios de cultivo líquido con la cepa ECS127R.

Al someter los porcentajes de proteínas al estadístico de ANOVA de medidas repetidas, se encontraron diferencias significativas para éste parámetro ($F_{(2,6)} = 231.41$, $p < 0.0001$). La prueba a posteriori de Duncan indicó que el medio EMD obtuvo un mayor incremento con respecto a los medios EMS y PCS (ver Figura 25).

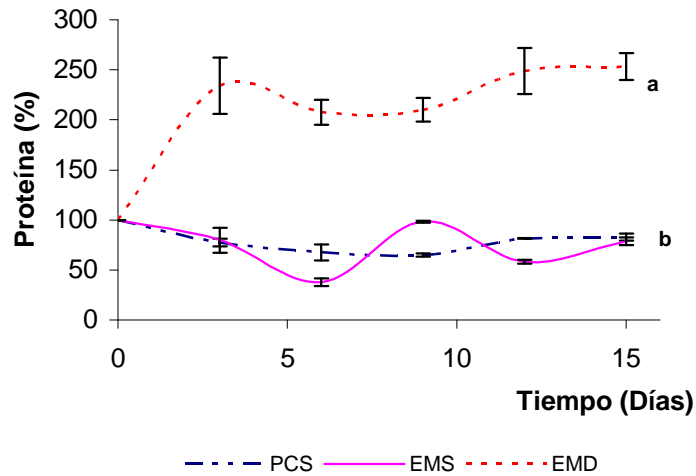


Figura 25. Porcentaje de proteínas solubles en distintos medios de cultivo líquido con la cepa ECS127R. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p < 0.05$).

En la Figura 26 se presenta la variación con respecto al tiempo para el contenido de proteínas solubles en el medio PCS para la cepa IE200, se obtuvo una concentración 0.05 g/L al término del día 15, en el medio líquido EMS la concentración fue de 0.01 g/L para el mismo periodo de tiempo y con medio líquido EMD la concentración fue de 0.02 g/L.

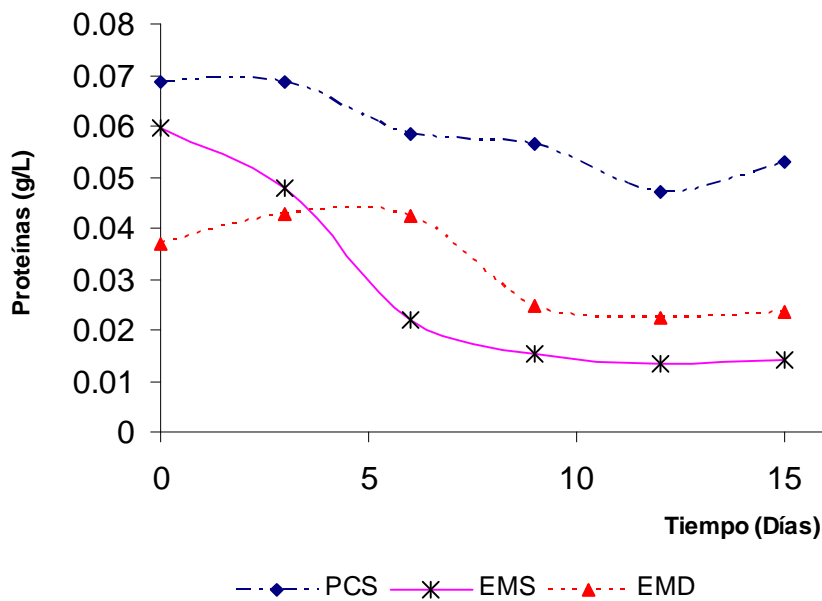


Figura 26. Contenido de proteínas solubles en distintos medios de cultivo líquido con la cepa IE200.

Se calculó el porcentaje de proteínas solubles para cada medio utilizado y se aplicó el Análisis de varianza de medidas repetidas, se encontraron diferencias significativas ($F_{(2,6)} = 47.17$, $p < 0.0001$) entre el porcentaje de proteínas solubles para los tres medios de cultivo utilizados. Como se muestra en la Figura 27, con la prueba de Duncan se detectó que los medios EMD y PCS tuvieron el mismo comportamiento y fueron diferentes al medio EMS.

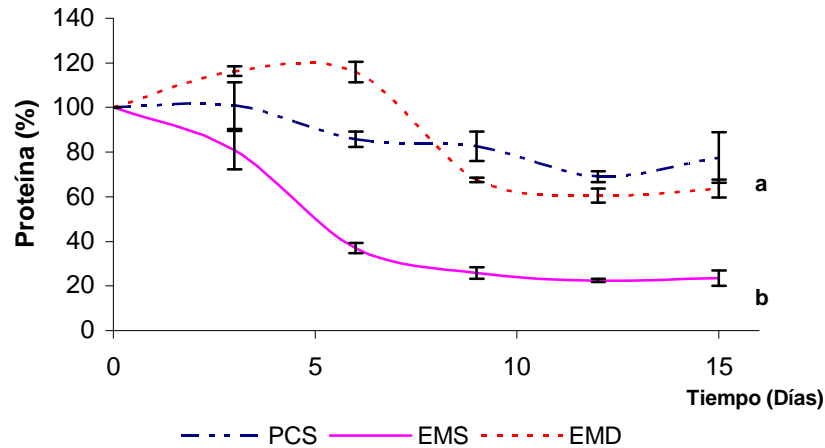


Figura 27. Porcentaje de proteínas solubles en distintos medios de cultivo líquido con la cepa IE200.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p < 0.05$).

La determinación de la concentración de proteína soluble, con respecto al tiempo, para la cepa PCM, con diferentes medios de cultivo, se presenta en la Figura 28. Con el medio líquido con PCS la concentración de proteína soluble después de 15 días de cultivo fue 0.11 g/L, con el medio EMS, la concentración final fue de 0.06 g/L y en el medio EMD la concentración de proteínas solubles al término del cultivo fue de 0.004 g/L.

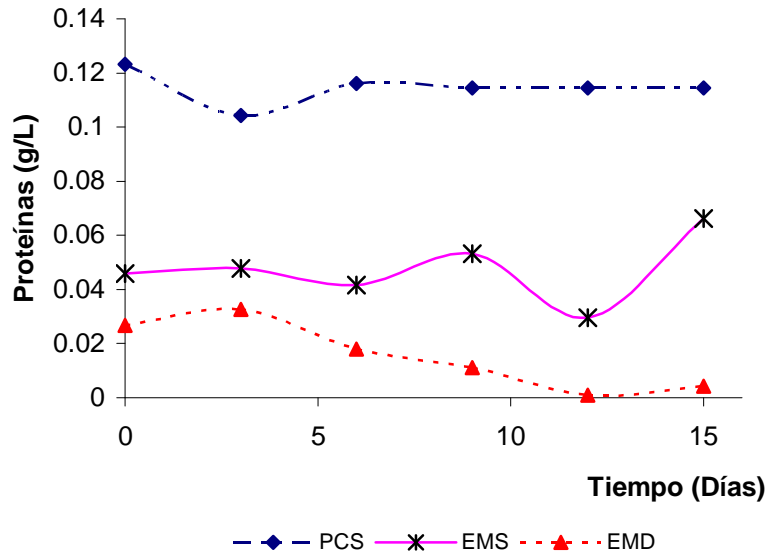


Figura 28. Contenido de proteínas solubles en distintos medios de cultivo líquido con la cepa PCM.

La prueba estadística de ANOVA de medidas repetidas, para el porcentaje de proteínas solubles en el medio, indicó que los medios evaluados (PCS, EMS y EMD) presentaron diferencias significativas entre sí ($F_{3, 11} = 25.72, p < 0.0001$), la prueba de Duncan indicó la formación de 2 grupos, el medio EMD fue el que obtuvo más porcentaje proteico, ver Figura 29.

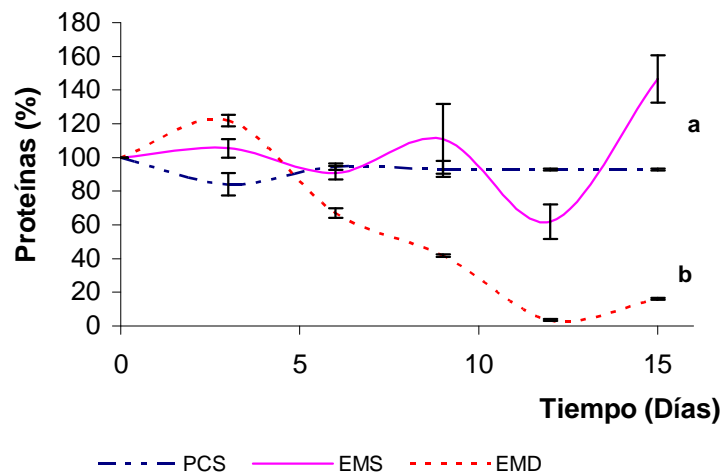


Figura 29. Porcentaje de proteínas solubles en distintos medios con la cepa PCM.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p < 0.05$).

Para detectar en que cepa se obtuvo un mayor porcentaje de concentración de proteínas, con el medio de cultivo EMD, se obtuvieron las gráficas que se presentan en la Figura 30. El ANOVA de medidas repetidas indicó diferencias entre las cepas utilizadas y con la prueba de Duncan, se observó que la cepa ECS127R fue la que presentó mayor porcentaje de concentración de proteínas.

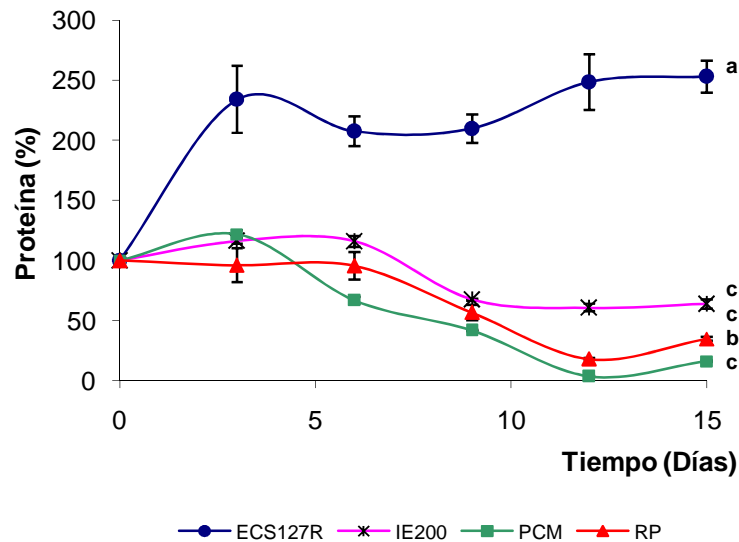


Figura 30. Porcentaje de proteínas solubles en el medio de cultivo líquido EMD, con todas las cepas.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p < 0.05$).

Para el medio EMD se observó que las cepas IE200, PCM y RP tuvieron un comportamiento similar, sin embargo, la cepa ECS127R mostró diferencia en la cinética de crecimiento (Figura 30) siendo la que presentó un mayor porcentaje de proteínas. Con respecto a la cantidad de proteínas Tribal *et al.* (2002) reportan concentraciones de proteína extracelular con una cepa de *P. ostreatus* utilizando celulosa cristalina en concentraciones de 10 g/L como única fuente de carbono, los datos fueron 0.006 mg/mL sin adición de surfactante y 0.025 mg/mL con Triton 100X, en el trabajo realizado por Ardon *et al.* (1996) utilizando también una cepa de *P. ostreatus* obtuvieron cantidades de proteínas extracelular de 0.04 mg/ml utilizando como fuente de carbono 5 g de glucosa y 0.5 g de extracto de levadura por litro. Para el estudio que nos ocupa se utilizaron como fuente de carbono, sacarosa y extracto de malta, se observó que la concentración de proteínas extracelulares varió de acuerdo con el tipo de medio utilizado. Se obtuvieron valores de 0.04–0.07 g/L para el caso de EMS, mientras que para EMD 0.02-0.04 g/L y para PCS se obtienen valores de 0.07-0.11 g/L de proteínas extracelulares. Además es importante notar que las concentraciones de proteína extracelular son variables dependiendo de la cepa utilizada, por lo que se infiere que tienen diferente estrategia para metabolizar los nutrientes del cultivo. En el presente estudio se

observaron disminuciones en la concentración de proteínas extracelulares a lo largo del cultivo, esto se debe a que los aminoácidos presentes en el medio son absorbidos directamente por el micelio como lo mencionan Quinnghe *et al.* (2004)

8.4 Obtención de inóculo-grano.

Con la finalidad de evaluar los tiempos de producción de inóculo-grano obtenido con micelio crecido en medio sólido con respecto al micelio crecido en medio líquido, se seleccionaron las cepas IE200 y PCM. Para ambas cepas, se inocularon cantidades equivalentes (en peso seco) de micelio fresco para lo cual se obtuvo el micelio crecido en medio sólido con 9 días de cultivo y el micelio crecido en medio líquido con 15 días de cultivo, se agregaron en bolsas que contenían 100 g de trigo con un número de repeticiones igual a 10, se incubaron a 28 °C y se determinó el tiempo de invasión total de cada bolsa de trigo.

En la Figura 31 se muestra las bolsas de trigo invadidas con micelio para la cepa IE200, para el trigo inoculado con el micelio crecido en medio sólido la invasión total se llevó a cabo en 12 días, mientras que para las bolsas inoculadas con micelio cultivado en medio líquido (día 9), el tiempo de invasión total fue de 9.6 días. Para ambos casos la cantidad de inóculo utilizada fue de 0.00912 g de micelio que corresponde a 2.9 cm² o 10 mililitros de cultivo en medio líquido (día 15).

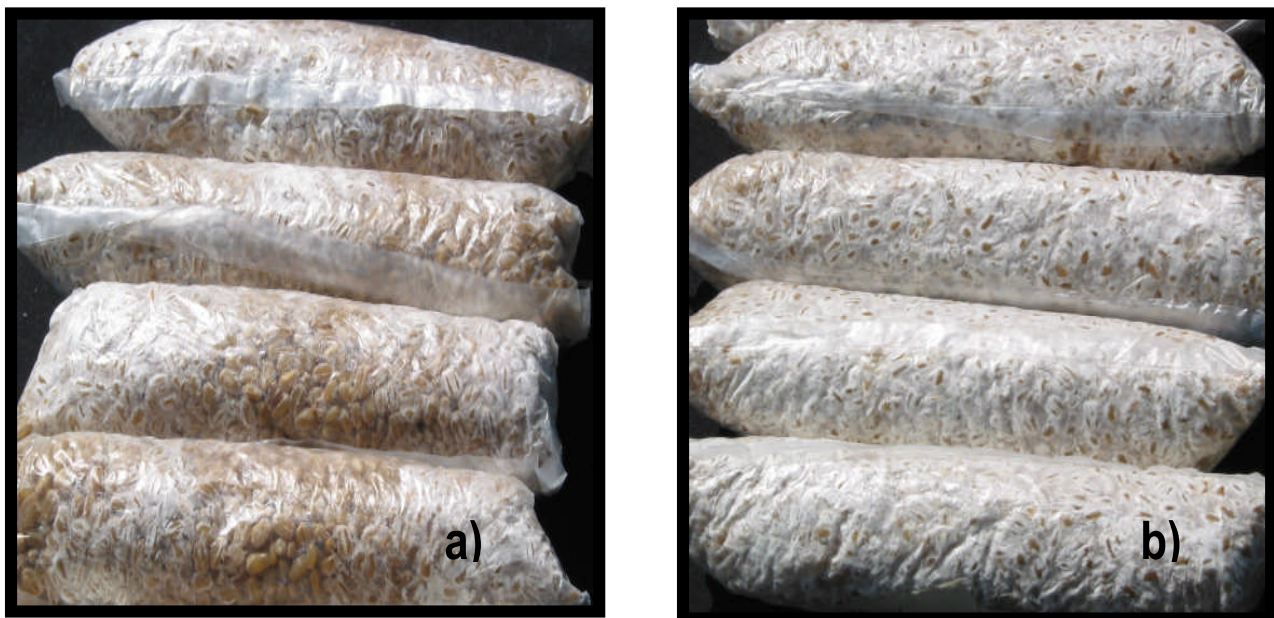


Figura 31. Invasión del trigo inoculado con micelio crecido en medio sólido, cepa IE200 (a).
Invasión del trigo inoculado con micelio crecido en medio líquido, cepa IE200 (b).

Las bolsas de “semilla” obtenidas para la cepa PCM se muestran en las Figuras 32. Para esta cepa la cantidad de inóculo utilizada fue 0.01506 g, que correspondió a 3.8 cm² de micelio crecido en agar o a 10 mililitros del cultivo en medio líquido (día 15). La invasión de trigo por el micelio crecido en medio sólido se realizó en 9.2 días y para las bolsas de trigo inoculadas con micelio crecido en medio líquido, el tiempo de invasión total fue de 7.4 días.

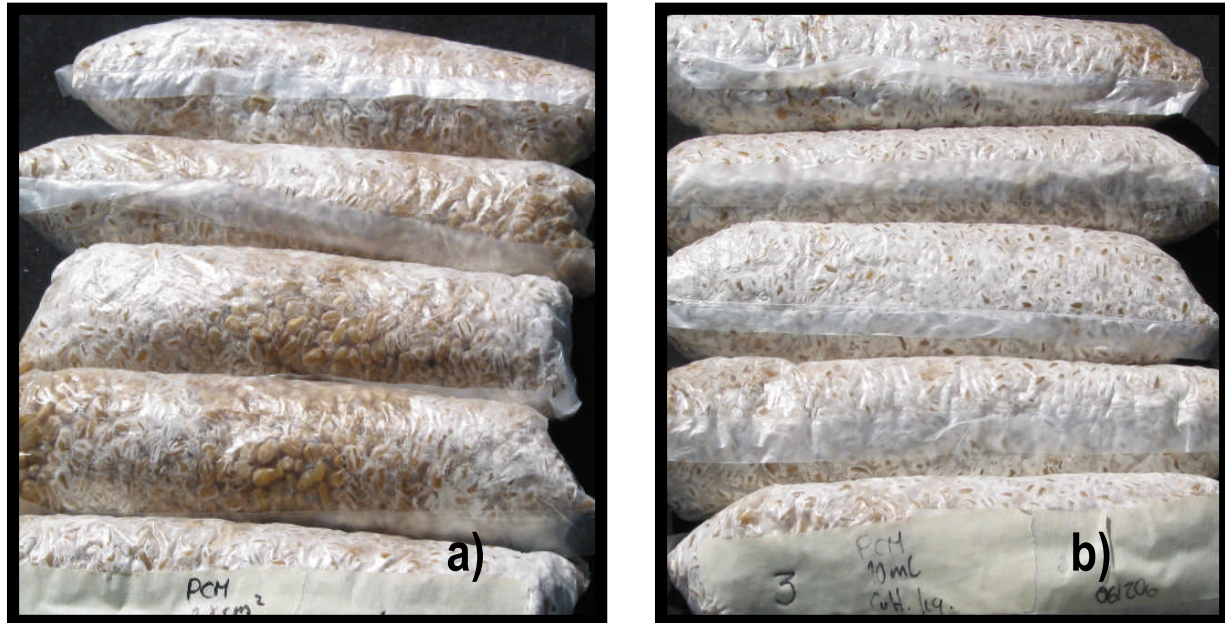


Figura 32. Trigo inoculado con micelio crecido en medio sólido con la cepa PCM (a).
Trigo inoculado con micelio crecido en medio líquido de la cepa PCM (b).

La prueba de ANOVA de una vía indicó diferencias significativas entre los tiempos de invasión para el trigo inoculado con micelio cultivado en medio líquido con respecto a los tiempos de invasión del trigo con el inóculo proveniente del micelio cultivado en medio sólido, para ambas cepas IE200 ($F_{(1,19)} = 36.00$, $p < 0.0001$) y PCM ($F_{(1,9)} = 16.2$, $p < 0.004$). En la Figura 33 se observa que se reducen significativamente los tiempos de producción para la “semilla” obtenida con micelio crecido en medio líquido con respecto a la obtenida con micelio crecido en medio sólido. La reducción del tiempo de invasión en esta etapa crucial del cultivo de hongos del género *Pleurotus* permitirá incrementar la rentabilidad de los cultivos a nivel comercial.

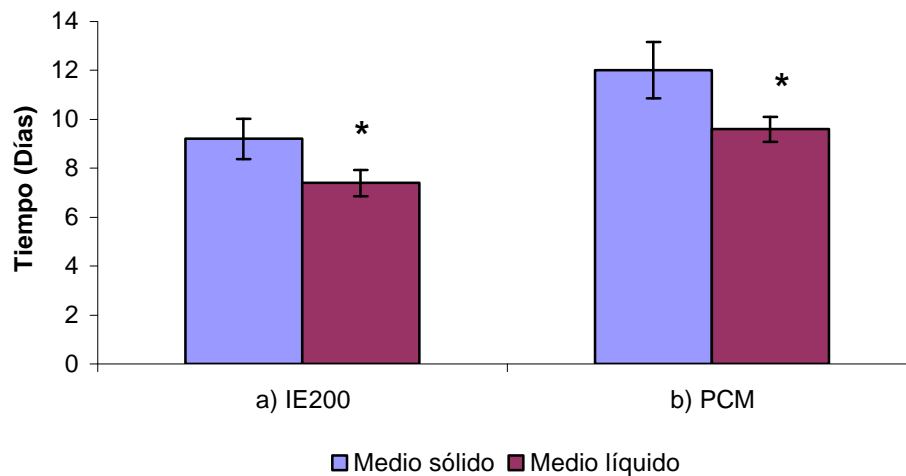


Figura 33. Invasión de trigo inoculado con micelio crecido en medio sólido y micelio crecido en medio líquido para las cepas **a)** IE200, **b)** PCM. El * indica las diferencias estadísticas significativas (Post hoc Duncan, $p < 0.05$).

8.5 Fructificación y cosecha.

Para determinar la influencia del inóculo-grano utilizado, se obtuvieron los cuerpos fructíferos de la cepa IE200 a partir de un sustrato previamente inoculado con “semilla” obtenida de micelio crecido en medio sólido y micelio crecido en medio líquido. En esta etapa del trabajo se evaluó la Eficiencia Biológica (%EB), Precocidad (Pr) y Tasa de Producción (TP), así como peso y tamaño de los carpóforos obtenidos para la cepa IE200.

8.5.1 Parámetros de productividad.

8.5.1.1 Precocidad (Pr).

La precocidad se midió como el número de días transcurridos desde el inicio de la incubación en condiciones de fructificación, hasta la primera cosecha de cuerpos fructíferos maduros en cada una de las bolsas. En la Figura 34 se muestra la precocidad que presentaron los cuerpos fructíferos de la cepa IE200, al realizar la prueba de ANOVA de una vía no se obtuvieron diferencias significativas ($F_{(1,19)} = 2.04$, $p < 0.170$) entre el parámetro Pr para el sustrato invadido con micelio crecido en medio sólido con respecto a

micelio crecido con medio líquido, por lo que la utilización de la “semilla” inoculada con micelio cultivado en medio líquido no afectó la precocidad de la cepa utilizada. Los valores de precocidad obtenidos para la cepa IE200 se encuentran entre los intervalos reportados por Royse (2002), el cual obtiene que los días de producción se encuentran entre los 22.1 hasta los 35.9, con una cepa de *Pleurotus cornucopiae*.

8.5.1.2 Tasa de producción (TP) y eficiencia biológica (%EB).

En la Figura 35 se presenta la Tasa de producción de esporóforos obtenidos para la cepa IE200. No se presentaron diferencias estadísticas significativas ($F_{(1,19)} = 3.71$, $p < 0.070$) cuando se inoculó el sustrato con “semilla” obtenida a partir de micelio crecido en medio sólido, con respecto al micelio crecido en cultivo líquido por lo que la utilización de ambos tipos de micelio para la generación de la semilla no influyó en la TP. Los valores de las tasas de producción están en un intervalo de 0.3 a 1.385 en sustrato inoculado con “semilla” generada con micelio crecido en medio sólido, mientras que para el sustrato inoculado con “semilla” obtenida con micelio crecido en medio líquido, se presentaron TP con valores entre 0.28 y 0.90. Salmones *et al.* (1997), reportan las tasas de producción para tres cepas de *Pleurotus djamur*, provenientes de diferentes lugares de Latinoamérica: para la cepa de Guatemala la TP varía de 0.86 a 1.44, para la cepa de México los valores se encuentran entre 0.35 a 1.68 y con la cepa de Cuba los valores fueron de 0.34 a 1.51. Así mismo informan que la TP para una cepa de *Pleurotus ostreatus* los valores obtenidos se encuentran en el intervalo de 0.48 a 1.38, finalmente con una cepa de *Pleurotus pulmonarius* la TP varió de 0.31 a 1.3. Se puede notar que los datos de tasa de producción reportados en el presente trabajo están dentro de los valores informados por Salmones *et al.* (1997).

La %EB obtenida para la cepa IE200 se muestra en la Figura 36, tampoco se presentaron diferencias significativas con el ANOVA de una vía ($F_{(1, 19)} = 2.81$, $p < 0.111$). A pesar de que la mayor productividad se presentó en el sustrato inoculado con “semilla” generada de micelio crecido en medio sólido (33.2 %), comparada con la “semilla” obtenida de micelio crecido en medio líquido (23.59 %), la cantidad de cuerpos fructíferos formados no se ve afectada por el tipo de micelio utilizado para producir el inóculo-grano. Royse (2002) informó que para una cepa de *Pleurotus cornucopiae*, se presentaron eficiencias biológicas en un intervalo de 23 % a 110 % utilizando 13.6 kg. de sustrato. Las eficiencias biológicas obtenidas para la cepa IE200 con ambos tipos de “semillas” están dentro del intervalo reportado por Royse (2002).

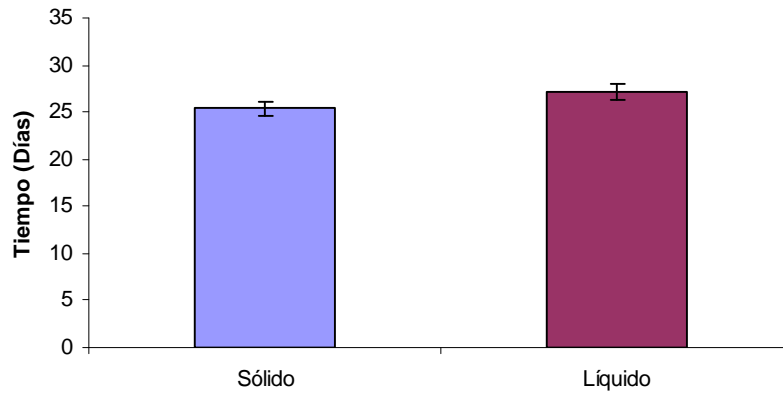


Figura 34. Precocidad presentada por la cepa IE200
Media \pm ESM para 10 repeticiones.

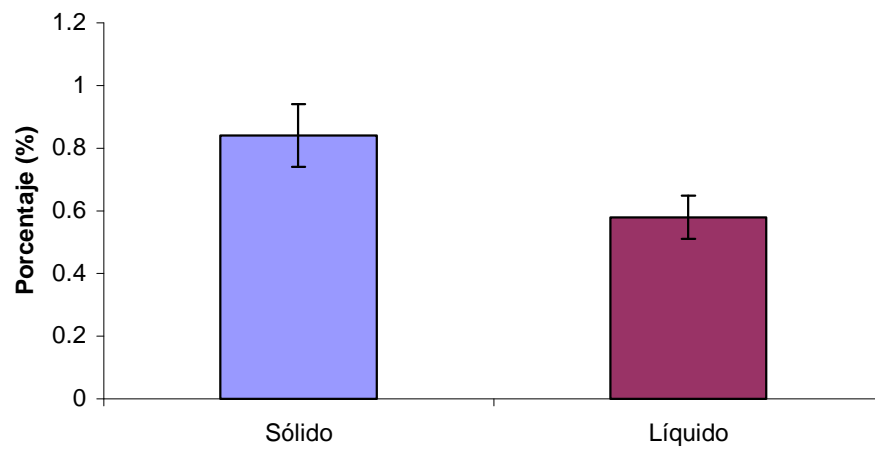


Figura 35. Tasa de Producción presentada por la cepa IE200
Media \pm ESM para 10 repeticiones.

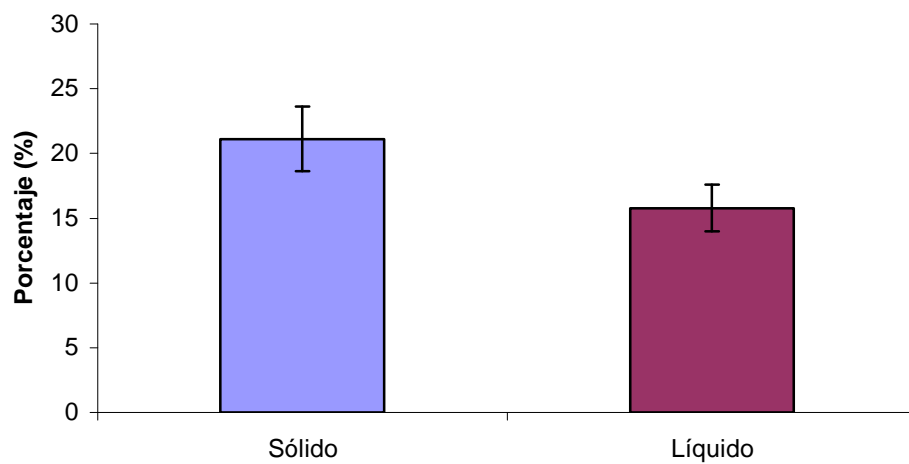


Figura 36. Eficiencia Biológica presentada por la cepa IE200
Media \pm ESM para 10 repeticiones.

8.5.2 Tamaño de carpóforos.

En la Figura 37 se presentan las imágenes de los carpóforos obtenidos con ambos tipos de “semilla”, se observa que la morfología y la coloración fue la misma.

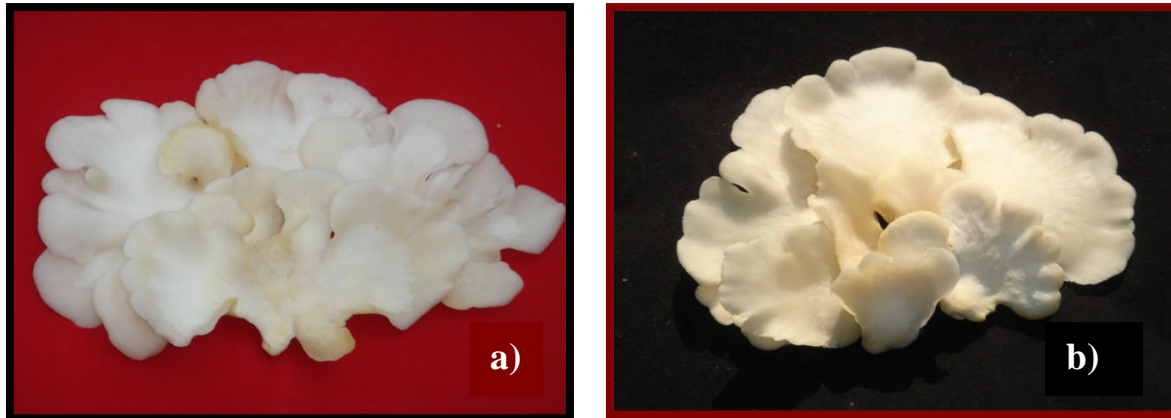


Figura 37. Tamaño de los cuerpos fructíferos obtenidos mediante de sustrato inoculado con trigo desarrollado con micelio crecido en medio sólido (a) y con trigo desarrollado con micelio crecido con medio de cultivo líquido (b) de la cepa IE200.

El análisis estadístico indicó que no existe diferencia significativa en cuanto a los pesos obtenidos al utilizar el inóculo-grano obtenido a partir de micelio crecido en medio sólido o con micelio obtenido en medio líquido de la cepa IE200 (Figura 37 y 38). Por lo que las características de los carpóforos obtenidos con inóculo-grano generado a partir del micelio cultivado en medio líquido no afectó el tamaño de los carpóforos.

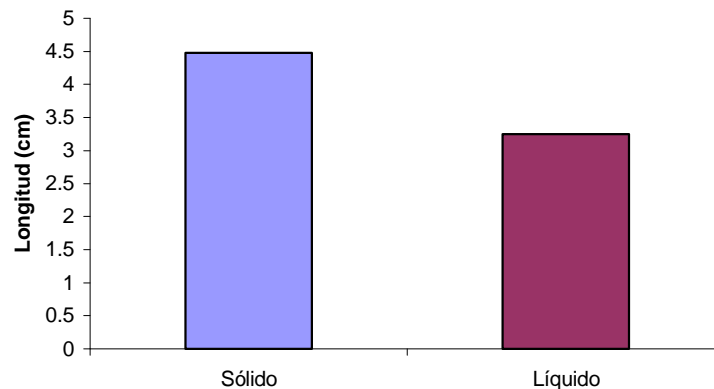


Figura 38. Peso medio de cuerpos fructíferos cosechados con la cepa IE200.

En la Figura 39 se presentan los resultados del tamaño de los carpóforos desarrollados para la cepa IE200, crecida en paja de trigo inoculada con “semilla” obtenida a partir de micelio cultivado en medio sólido y en medio líquido. Con respecto al diámetro de los carpóforos desarrollados con la semilla generada con micelio crecido en medio sólido, se formaron dos grupos (Salmones *et al.*, 1997), el primero corresponde a G₁ que incluye carpóforos menores de 5 cm y representó el 38 % de la cosecha total, el segundo grupo formado fue G₂ que incluye carpóforos con tamaño entre 5 a 9.9 cm y fue el 62%.

Cuando se inoculó la paja con “semilla” obtenida de micelio crecido en medio líquido, el grupo G₁ representó el 37 % de tamaño de carpóforos, mientras que el grupo G₂ fue del 63%, en ninguno de los inóculos se presentaron carpóforos que se clasificaran en los grupos G₃ o G₄. Con ambas formas de obtención de carpóforos partiendo de micelio crecido en medio líquido o medio sólido no afecta el tamaño de estos.

El trabajo por Salmones *et al.* (1997) presentan tamaño de carpóforos recolectados a lo largo de tres cosechas sobre el sustrato paja de cebada con cepas del complejo *P. djamur* de 1-5 cm de diámetro (grupo G₁). En comparación con los resultados de este estudio el diámetro de carpóforos correspondió al intervalo de 5-9 cm (grupo G₂) las diferencias entre los resultados obtenidos entre ambos estudios pueden explicarse por las condiciones medioambientales ya que la cepa IE200 pertenece al complejo *P. djamur*.

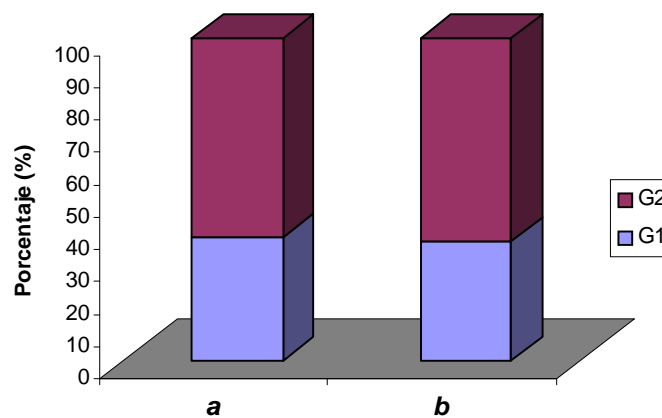


Figura 39. a) sustrato inoculado con semilla obtenida a partir de cultivo sólido
b) sustrato inoculado con semilla obtenida a partir de cultivo líquido.

En el Figura 40 se comparan los valores obtenidos para los tamaños G_1 y G_2 para ambos tipos de inóculo utilizado, al realizar el ANOVA de una vía, se detectó la presencia de diferencias estadísticas significativas ($F_{(1,15)}=11.57$, $p < 0.001$) para los carpóforos agrupados en G_1 obtenidos a partir del sustrato inoculado con “semilla” invadida con micelio crecido en medio sólido con respecto a la obtenida con micelio crecido en medio líquido. Para los tamaños G_2 no hubo diferencias significativas entre ambos tipos de inóculo-grano utilizado. Lo que sustenta que la utilización de inóculo líquido no afecta el tamaño de los carpóforos al generar la semilla mediante este procedimiento, ya que el mayor porcentaje se ve reflejada en la clasificación G_2 , aunque en G_1 si se presentan diferencias, no se consideran relevantes debido a que comercialmente se prefiere carpóforos de mayor tamaño.

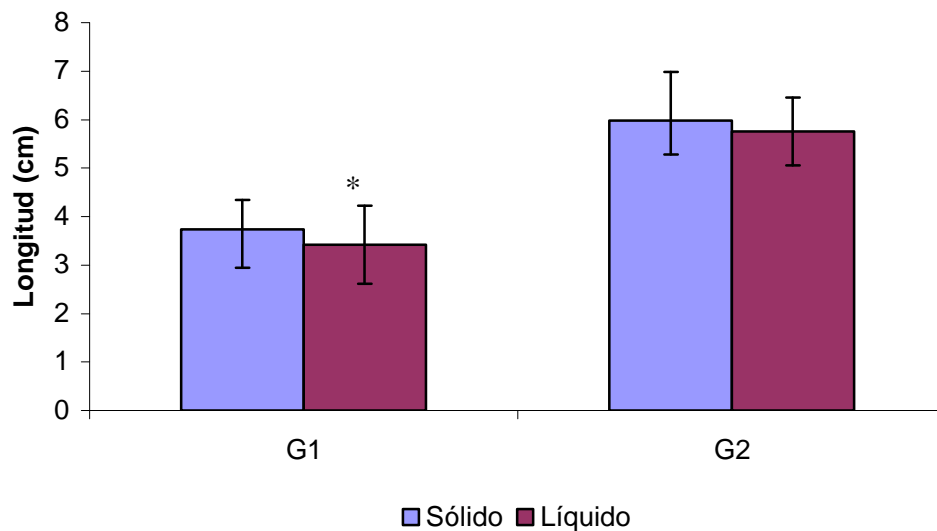


Figura 40. Tamaño de carpóforo desarrollado de la cepa IE200 al ser inoculada con semilla obtenida de medio sólido y semilla obtenida de cultivo en medio líquido.

8.6 Parámetros cinéticos.

En el Cuadro 12 se presentan los parámetros cinéticos obtenidos al utilizar la cepa IE200 crecida en medio de cultivo líquido EMS.

Cuadro 12. Parámetros cinéticos de la cepa IE200 cultivada en EMS.

Tiempo (Días)	Biomasa (gL ⁻¹)	Carbohidratos (gL ⁻¹)	Y _{x/s}	μ	qs
3	1.0744	1.3598	1.39	0.023	0.01843165
6	1.5483	1.5021			
9	3.9172	0.644			
12	4.7383	0.536			

La biomasa obtenida a las 288 h de cultivo fue de 4.73 g/L, la velocidad específica de crecimiento de la cepa IE200 con el medio EMS fue de $\mu = 0.023 \text{ d}^{-1}$ cuando se utilizaron 20 g/L de extracto de malta, suplementado con una concentración igual de sacarosa. El rendimiento ($Y_{x/s}$) fue de 1.39 g de biomasa /g de sustrato consumido. Los valores obtenidos por Guillen-Navarro *et al.* (1998), quienes utilizaron una cepa de *Pleurotus ostreatus* en un biorreactor con agitación reportan una biomasa de 8.6 g/L y un rendimiento de 0.41 g de biomasa/ g de glucosa. Hadar y Cohen-Arazi (1986) utilizando una cepa de *Pleurotus ostreatus* denominada Florida F6 obtuvieron 6.45 g/L a las 72 h de cultivo con una concentración de 20 g/L de glucosa. Las disminuciones en los rendimientos y producción de biomasa se deben a que se utilizaron medios de cultivos diferentes y a la capacidad de la cepa para metabolizar. Es difícil definir el rendimiento en un medio complejo pero los resultados obtenidos por estos autores indican que *Pleurotus ostreatus* utiliza de manera más eficiente el sustrato y que en condiciones de sustrato limitado *Pleurotus* puede utilizar una fuente de carbono alternativa (Guillen-Navarro *et al.*, 1998).

Se cree que la producción de lignina peroxidasa y lacasa puede estar asociada al crecimiento de algunas especies de *Pleurotus*, sin embargo se requieren estudios precisos para determinar la producción en *Pleurotus*. Además de que al ser expulsadas al medio extracelular es factible utilizar el cultivo para obtener enzimas como subproducto de alto valor agregado (Guillen-Navarro *et al.*, 1998). Dentro de las enzimas constituyentes del complejo multienzimático ligninolítico de *Pleurotus* spp. se encuentran la lacasa la cual participa en la degradación de la lignina y compuestos similares en ausencia de lignina peroxidasa y magnesio peroxidasa. La producción de lacasa esta directamente relacionada con la cantidad de biomasa

producida en especies de *Pleurotus*. En *Pleurotus*, la lacasa no es regulada por condiciones limitantes de nutrientes, pues cantidades suficientes o en exceso de éstos estimulan su actividad y la producción de biomasa (Rodríguez *et al.*, 2003).

8.7 Simulación.

Con los datos cinéticos obtenidos se realizó la simulación para un cultivo batch con duración de 200 h para la cepa IE200, se utilizó el programa Mathcad versión 2001 (Figura 41). El objetivo por el cual se decidió la realización de la simulación es para conocer el comportamiento que presentará la cepa IE200 a lo largo del tiempo.

La presente simulación se realizó para obtener un modelo el cual nos describa la relación entre las variables de condición y de esta forma explicar cualitativamente el comportamiento del sistema, obteniendo un método que nos provea sugerencias útiles para el análisis y operación del fermentador.

También se realizó una simulación con los datos cinéticos obtenidos de Guillen-Navarro *et al.* (1998) al utilizar la cepa de *Pleurotus* denominada ECS-0110, para comparar si el comportamiento que presentan estos autores es similar a los obtenidos en esta investigación a lo largo del tiempo.

CULTIVO POR LOTE PARA LA CEPA IE200.

Definiciones:

Ks: Constante de saturación (gramos/litro)

ms: Constante de mantenimiento celular (horas)

μ_{max} : Máxima concentración celular (gramos de sustrato/gramos de células* hora)

Yg: Rendimientos (gramos de células/ gramos de sustrato)

t_{final}: Tiempo final

$\alpha\beta\eta$: Constantes de asociación de crecimiento dependientes de la formación de producto

CONSTANTES CINÉTICAS

$$K_s = 0.25 \frac{g}{l}$$
$$m_s = -0.018 \frac{gsus}{gcelh}$$
$$\mu_{max} = 0.023 h^{-1}$$
$$Y_g = 1.39 \frac{gcel}{gsus}$$
$$\alpha = 0$$
$$\beta = 0$$
$$\eta = 0$$
$$T_{final} = 200 h$$

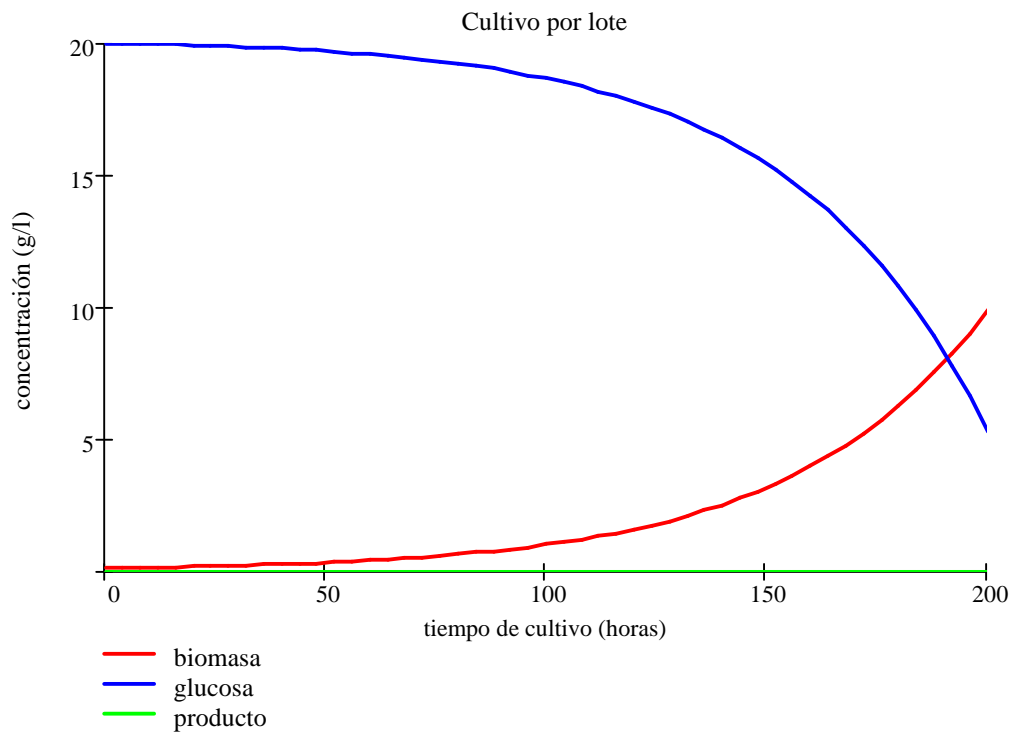


Figura 41. Simulación de la producción de biomasa de la cepa IE200.

Se hizo una comparación con los datos obtenidos de una investigación realizada por Guillen- Navarro *et al.* (1998) y se obtuvo la siguiente simulación (Figura 42).

CULTIVO POR LOTE PARA LA CEPA *P. ostreatus* (ECS-0110)

CONSTANTES CINÉTICAS

$$K_s = 1.75 \frac{g}{l}$$

$$\mu_{max} = 0.013 h^{-1}$$

$$\alpha = 0.5$$

$$\eta = 0$$

$$m_s = 0.00 \frac{g_{sus}}{g_{cel}h}$$

$$Y_g = 0.41 \frac{g_{cel}}{g_{sus}}$$

$$\beta = 0$$

$$T_{final} = 384 h$$

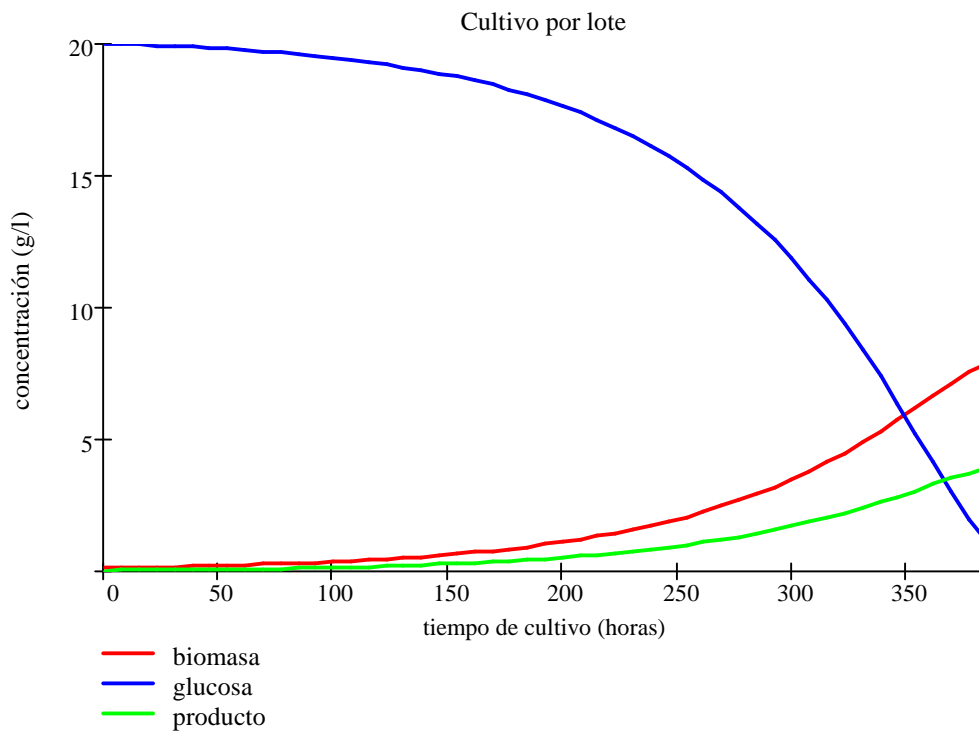


Figura 42. Simulación de la cepa *Pleurotus ostreatus* ECS-0110 (Guillen-Navarro *et al.*, 1998).

La aplicación y control de los procesos fermentativos son de gran importancia para este estudio. En un cultivo por lote, varían los estados del sistema y los factores ambientales y estos pueden ser manejados y controlados bajo condiciones óptimas. Al realizar las variaciones del cultivo se pueden mejorar el rendimiento, optimizar la calidad y además reducir los costos del cultivo.

Para realizar la simulación de las cinéticas de crecimiento se utilizaron los datos cinéticos obtenidos de una cepa de *Pleurotus ostreatus* denominada ECS-0110 obtenidos por Guillen-Navarro *et al.* (1998) y los datos de la cepa IE200 del complejo *P. djamur* utilizada en este estudio.

Al analizar las curvas obtenidas para la producción de biomasa y consumo de glucosa de las cepas pertenecientes al complejo *P. ostreatus* (ECS-0110) y *P. djamur* (IE200) se observó que tuvieron un comportamiento similar. Sin embargo, la curva obtenida para el producto fue diferente en la cepa IE200 con respecto a la cepa *P. ostreatus*.

Con respecto al consumo de sustrato se observó que con la cepa IE200, éste se agotó a partir de las 150 h de cultivo, mientras que para la cepa *P. ostreatus*, el sustrato se termina hasta las 200 h. Se puede inferir que la cepa *P. ostreatus* debido a los valores de sus constantes cinéticas, utiliza una estrategia distinta para consumir la glucosa. Para la biomasa, la cepa IE200 presentó una mayor producción de biomasa a las 200 h mientras que para la cepa ECS-0110 fue de 350 h aproximadamente.

La obtención de los parámetros cinéticos y su utilización para realizar las simulaciones de las cinéticas de crecimiento permitió identificar que las condiciones de cultivo para ambas cepas comparadas, son diferentes y por lo tanto deberá tomarse en cuenta para estudios posteriores en los que se lleve a cabo la implementación del cultivo a mayor escala.

La importancia de conocer el comportamiento cinético de las distintas cepas a trabajar y conociendo adecuadamente estos datos nos permitirán seleccionar las cepas, obtener datos concretos sobre el consumo de glucosa y formación de algún producto de interés, además de no afectar económicamente la producción a una escala mayor.

9. CONCLUSIONES.

- Se implementó con eficiencia el cultivo líquido de micelio de la cepa *Pleurotus* spp.
- No se encontró una relación entre la morfología micelial de cultivo en medio sólido y velocidad de crecimiento del micelio.
- El medio EMDS resultó ser el más adecuado para la producción de biomasa en el cultivo de micelio en medio líquido.
- La cepa IE200 presentó características importantes para considerarla como cepa potencial en el cultivo comercial de setas.
- Se comprobó la viabilidad de la utilización de micelio crecido en medio líquido para la generación de “semilla” de hongos del género *Pleurotus*.
- La utilización del cultivo líquido de micelio permitió reducir en un 20 % el tiempo de producción de “semilla” comparado con el cultivo sólido de micelio obtenido en caja Petri.
- Las pruebas realizadas en sustrato, con inóculo- grano obtenido a partir de micelio crecido en medio líquido, no presentaron diferencias significativas en la producción de carpóforos, tamaño y peso, así como en la forma de los carpóforos obtenidos con respecto a los resultados obtenidos con inóculo-grano generado a partir de micelio crecido en medio sólido, por lo que es recomendable la producción de “semilla” a partir de micelio crecido en medio líquido.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Anderson, N., G. R. Furnier., A. S. Wang., J. W. Schwandt. 1991. The number and distribution of incompatibility factors in natural populations of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sapidus*. *Can. J. Bot.* 69: 2187-2191.
- Anderson, N., S. S. Wang., J. W. Schwandt. 1973. The *Pleurotus ostreatus-sapidus* species complex. *Mycologia.* 65: 28-35.
- Ardon, O., Z. Kerem., Y. Hadar. 1996. Enhancement of laccase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *Journal of Biotechnology.* 51: 201- 207.
- Bridge, P. D., D. K. Arora. 1998. Interpretation of PCR methods for species definition. In: P.D. Bridge. *British Mycol. Soc.* 90: 29-36.
- Chang, S. T. 1999. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: nongreen revolution. *Int. Journal of Medicinal Mushrooms.* 1: 1-7.
- Chang, S. T., P. G. Miles. 2004. *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, environmental impact.* CRC Press, Boca Raton.
- Dokmetzian, D. A., M. E. Ranalli. 2004. Crecimiento de especies del género *Ascobolus*. II. (Pezizales–Ascomycota). *Rev. Iberoamericana de Micología.* 21: 96-99.
- Eger, G. 1978. Biology and breeding of *Pleurotus*. In: S. T. Chang y W. A. Hayes (eds). *The biology and cultivation of edible mushrooms.* New York, Academic Press. 497-519
- Eger, G., S. F. Li., H. Leal-Lara. 1979. Contribution to the discussion on the species concept in the *Pleurotus ostreatus* complex. *Mycologia.* 71: 577-588.

- Egger, K. N. 1992. Analysis of fungal population structure using molecular techniques. In: G.C. Carroll y D.T. Wicklow (eds). The fungal community-its organisation and role in the ecosystem. Marcel Dekker, New, York, U.S.A. 193-208
- Eugenio, C. P., N. A. Anderson. 1968. The genetics and cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Micologia*. 60: 627-634.
- Fasidi, I. O., S. K. Olorunmaiye. 1994. Studies on the requirements for vegetative growth of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer a Nigerian mushrooms. *Food Chemistry*. 50: 397-401.
- González, M. S., C. I. Peñalosa. 2000. Biomoléculas. Métodos de análisis. UNAM Campus Iztacala. México, D. F. 256.
- González, N. 2005. Molecular characterization of wild and commercial strains of shiitake (*Lentinula* spp.) cultivated in Mexico, and their potential for genetic improvement. Tesis Profesional. Universidad de las Américas, Escuela de Ciencias, Puebla.
- Guillen-Navarro, K. G., F. J. Márquez-Rocha., J. E. Sánchez-Vázquez. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Rev. Iberoam. Micol.* 15: 302-306.
- Guzmán, G. 1994. Fungi in traditional medicine in Mesoamerica and México. *Revista Iberoamericana de Micología*. 11(3): 81-85.
- Guzmán, G. 1995. La diversidad de los hongos en México. *Revista Ciencias*. 39: 52-57.
- Hadar, Y., E. Cohen-Arazi. 1986. Chemical Composition of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus* Produced by Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 51(6): 1352-1354.
- Han, Y. H., K. M. Chen., S. Cheng. 1974. Characteristics and cultivation of a new *Pleurotus* in Taiwan. *Mush. Sc.* 9: 167-174.

- Herrera, T., M. Ulloa. 1990. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. Fondo de Cultura Económica y UNAM. México. 552.
- Hibbett, D. S. 1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. *Trans. Mycol. Soc. Japan.* 33: 533-556.
- Hilber, O. 1982. Die Gattung *Pleurotus* (Fr.) Kummer unter besonderer Berücksichtigung des *Pleurotus eryngii*-formenkomplexes. *Bibliotheca Mycologica* 87, J. Cramer:Vaduz.
- Honda, Y., T. Matsuyama., T. Irie., T. Watanabe., M. Kuwahara. 2000. Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr. Genet.* 37: 209-212.
- Hong, J. S. 1978. Studies on the physicochemical properties and the cultivation of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *J. Korean Agr. Chem. Soc.* 21(3): 150-184.
- Horgen, P. A., R. Arthur., O. Davy., A. Moum., F. Herr., N. Straus., J. B. Anderson. 1984. The nucleotide incompatibility factors in natural populations of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sapidus*. *Can. J. Bot.* 69: 2187-2191.
- Idareta, E., L. Larraya., A. G. Pisabarro., L. Ramirez. 2004. Evaluación de parámetro de producción y de calidad en cultivo semi-industrial de cepas de setas ostra *Pleurotus ostreatus* obtenidas mediante selección asistida por marcadores moleculares. *Actas de Horticultura No. 40. II Congreso de mejora genética de plantas.* 416-419.
- Iraçabal, B., G. Zervakis., J. Labarère. 1995. Molecular systematics of the genus *Pleurotus*: analysis of restriction polymorphisms in ribosomal DNA. *Microbiology.* 141: 1479-1490.
- Jahnke, K. I., G. Bahnweg., J. J. Worrall. 1987. Species delimitation in the *Armillaria mellea* complex by analysis of nuclear and mitochondrial DNAs. *Trans. British Mycol. Soc.* 88: 572-575.
- Kirk, P. M., P. F. Cannon., J. C. David., J. A. Stalpers. 2001. *Dictionary of the Fungi.* Ed. CABI Publishing. New York. 655.

- Koltin, Y., J. Stamberg., P. A. Lemke. 1972. Genetic Structure and Evolution of the incompatibility factors in higher fungi. *Bacteriological reviews*. 36(2): 156-171.
- Kues, U., Y. Liu. 2000. Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 141-152.
- Kulkarni, R. K., C. D. Kamerath., K. L. Allred. 1987. Genetic diversity between isolates of *Pleurotus ostreatus* as revealed by isozyme analysis. In: P. J. Wuest., D. J. Royse., R. B. Beelman (eds). *Cultivating Edible Fungi-Developments in Crop Science*. Elsevier, The Netherlands. 10: 171-181.
- Larraya, L. M., M. M. Peñas., G. Pérez., C. Santos., E. Ritter., A. G. Pisabarro., L. Ramirez. 1999. Identification of incompatibility alleles and characterisation of molecular markers genetically linked to the A incompatibility locus in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr. Genet.* 34: 486-493.
- Larraya L. M., M. Alfonso., A. G. Pisabarro., L. Ramirez. 2003. Mapping of genomic regions (Quantitative Trait Loci) controlling production and quality in industrial culture of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology.* 69(6): 3617-3625.
- Lilly, V. G., H. L. Barnett. 1951. *Physiology of the Fungi*. Mc Graw Hill. 24-44.
- Manning, D. L. 1977. Fruiting and mating compatibility studies in the *Pleurotus ostreatus-sapidus* complex. H. E. Bigelow y E. G. Simmons (eds). *Second International Mycological Congress. Abstract.* 415. Tampa:IMC-2 Inc.
- Martínez-Carrera, D., A. Larqué-Saavedra., P. Morales., M. Sobal., W. Martínez., A. Aguilar. 1993. Los hongos comestibles en México: biotecnología de su reproducción. *Ciencia y Desarrollo (CONACYT)*. 108: 41-49.
- Martínez-Carrera, D. 2000. Mushroom biotechnology in tropical America. *Int. J. of Mushroom Sciences.* 3: 9-20.
- Martínez-Carrera, D. 2002a. Mushroom. *McGraw-Hill Encyclopedia of Science and Technology*, 9th Edition. McGraw-Hill, Inc., Nueva York.

- Martínez-Carrera, D. 2002b. Current development of mushroom biotechnology in Latin America. *Micol. Apl. Int.* 14: 61-74.
- Martínez-Carrera, D., A. Aguilar., W. Martínez., P. Morales., M. Sobal., M. Bonilla., A. Larqué-Saavedra. 1998a. A sustainable model for rural production of edible mushrooms in Mexico. *Micol. Neotrop. Apl.* 11: 77-96.
- Martínez-Carrera, D., A. Larqué-Saavedra. 1990. Biotecnología en la producción de hongos comestibles. *Ciencia y Desarrollo (CONACYT)*. 95: 53-64.
- Martínez-Carrera, D., F. Vergara., S. Juárez., A. Aguilar., M. Sobal., W. Martínez. 1996. Simple technology for canning cultivated edible mushrooms in rural conditions in Mexico. *Micol. Neotrop. Apl.* 9: 15-27.
- Martínez-Carrera, D., M. Bonilla., M. Sobal., A. Aguilar., W. Martínez., A. Larqué-Saavedra. 1999. A culture collection of edible mushrooms and its significance for germplasm preservation, breeding, and the development of mushroom cultivation in Mexico. *Micol. Neotrop. Apl.* 12: 23-40.
- Martínez-Carrera, D., M. Sobal., A. Aguilar., M. Navarro., M. Bonilla., A. Larqué-Saavedra. 1998b. Canning technology as an alternative for management and conservation of wild edible mushrooms in Mexico. *Micol. Neotrop. Apl.* 11: 35-51.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales., M. Sobal., M. Bonilla., W. Martínez. 2006. México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. In: *El cultivo de Pleurotus en México*. ECOSUR-IE-UNAM-COLPOS, México, D. F.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales., M. Sobal., S. T. Chang., A. Larqué-Saavedra. 1991a. Edible mushroom cultivation for rural development in tropical America. *Mushroom Science*. 13: 805-811.
- Martínez-Carrera, D., R. Leben., P. Morales., M. Sobal., A. Larqué-Saavedra. 1991b. Historia del cultivo comercial de los hongos comestibles en México. *Ciencia y Desarrollo (CONACYT)*. 96: 33-43.
- May, B., D. Royse. 1988. Interspecific allozyme variation within the fungal genus *Pleurotus*. *Trans. British Mycol. Soc.* 90: 29-36.

- Mikosch, T. S. P., B. Lavrijssen., A. S. M. Sonnenberg., L. J. L. D. van Griensven. 2000. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Mushroom Science*. 15: 173-179.
- Miles, P.G., Ch. Shu-Ting. 1997. *Biología de las setas. Fundamentos básico y acontecimientos actuales*. Hong Kong. World Scientific. 133.
- Morales, P., C. F. Thurston. 2003. Efficient isolation of genes differentially expressed on cellulose by suppression subtractive hybridization in *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*. 107: 401-407.
- Motolinia, R. C., G. A. Arias. 2003. Producción de biomasa de *Pleurotus ostreatus* en medios de cultivo líquido con vinazas tequileras y diferente fuente de carbono.
- Mukhopadhyay, R., B. P Chatterjee., A. K. Guha. 2002. Biochemical changes during fermentation of edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* in whey. *Process Biochemistry*. 38: 723–725.
- Ng, T. B., H. X. Wang. 2004. A novel ribonuclease from fruiting bodies of the common edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides*. 25: 1365-1368.
- Okunda, T., Y. Yoshiok., T. Ikekawa., G. Chiara., K. Nishioka. 1972. Anticomplementary activity of antitumor polysaccharides. *Nature*. 238 (80): 59-60.
- Qinnghe, C., Y. Xiaoyu., N. Tiangui., J. Cheng., M. Qiugang. 2004. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemistry*. 39: 1561-1566.
- Rajarithnam, S., M. N. Shashireka., Z. Bano. 1992. Biopotentialities of the Basidiomycetes. *Adv. Appl. Microbiol.* 42: 37–44.
- Ramírez, L., L. Larraya., A. G. Pisabarro. 2000. Molecular tools for breeding Basidiomycetes. *International Microbiology*. 3: 147-152.
- Raypeck, V. 1977. Chemical composition of hemicellulose as a factor participating in the substrate specificity of wood destroying fungi. *Wood Sci. Technol.* 11: 59

- Rodríguez, S., M. Fernández., R. C. Bermúdez., H. Morris. 2003. Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. Rev. Iberoam. Micol. 20: 164-168.
- Rogério, R. F., S. Germano., E. R. Carbonero., S. M. Gomes da Costa., M. Lacomini., C. Kimmelmeier. 2003. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* SING. and *Pleurotus ostreatus* "florida" (JACK.:FR.) KUMMER. J. Basic Microbiol. 3: 230 – 237.
- Romagnesi, H. 1969. Sur les *Pleurotus* du groupe *ostreatus* (*Ostreomyces* Pilat). Bulletin de la Société Mycologique de France 85: 305-314.
- Royse, D. J. 1989. Factors influencing the production rate of shiitake. Mushroom J. Tropics. 9: 27-138.
- Royse, D. J., T. W. Rhodes., S. Ohga., J. E. Sanchez. 2004. Yield, mushroom size and time to production of *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) grown on switch grass substrate spawned and supplemented at various rates. Bioresource Technology. 91: 85-91.
- Royse, D. J., Sanchez-Vázquez, J. E. 2001. La importancia del cultivo de *Pleurotus* spp. estadísticas mundiales de producción, con énfasis en Hispanoamérica. In: La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Ecosur. El Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México. Ed. 2001.
- Royse, D. J. 2002. Influence of spawn rate and commercial delayed release nutrient levels on *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) yield, size and time to production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58: 527–531.
- Salmones, D., R. Gaitán-Hernández., R. Pérez., G. Guzmán. 1997. Estudios sobre el género *Pleurotus*. VIII. Interacción entre el crecimiento micelial y productividad. Rev. Iberoam. Micol. 14: 173-176.
- Sánchez-Vásquez J. E., D. J. Royse. 2001. Crecimiento y fructificación. In: La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Ecosur. El Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México. Ed. 2001.

- Sánchez-Vázquez, J. E. 2005. El cultivo de *Pleurotus* en México. I Reunión Nacional sobre el Cultivo de *Pleurotus* (resúmenes). ECOSUR-SMM-IE-SEPI, San Cristóbal de Las Casas, Chiapas.
- Sato, T., K. Yaegashi., S. Ishii., T. Hirano., S. Kajiwara., K. Shishido., H. Enei. 1998. Transformation of the edible basidiomycete *Lentinus edodes* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. Biosci. Biotech. Biochem. 62: 2646-2650.
- Smith, M. L., J. B Anderson. 1989. Restriction fragment length polymorphisms in mitochondrial DNAs of *Armillaria*: identification of North American biological species. Mycol. Res. 93: 247-256.
- Smith, M. L., L. C. Duchesne., J. N. Bruhn., J. B. Anderson. 1990. Mitochondrial genetics in a natural population of the plant pathogen *Armillaria*. Genetics 126: 575-582.
- Tchierpe, M. J., K. Hartmann. 1977. A comparison of different growing methods. Mush. J. 60: 404-416.
- Terakawa, H. 1960. The incompatibility factors in *Pleurotus ostreatus*. Scientific papers (Coll. Gen. Educ., Univ. Tokyo). 10: 65-71.
- Tribal, M., J. A. Ocampo., I. G. Romera. 2002. Production of xyloglucanolytic enzymes by *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus*, *Wardomyces inflatus*, and *Pleurotus ostreatus*. Mycologia. 94(3): 404-410.
- Valencia del Toro, G., M. E. G. Aguilar. 2000. Aspectos generales del cultivo de las setas comestibles (*Pleurotus* spp.). UNAM-IZTACALA.
- Valencia del Toro, G. 2002. Estudio sobre la expresión del color de los esporóforos en *Pleurotus* spp. por apareamiento de neohaplontes compatibles y progenies monospóricas. Tesis- Doctorado. UNAM. México D.F.
- White, T. J., T. Bruns., S. Lee., J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis., D. H. Gelfand., J. J. Sninsky., T. J. White. (eds). PCR protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, U.S.A. 315-322.

Wu, J., C. K. Cheung., K. Wong., N. Huang. 2003. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 1: physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency. *Food Chemistry* 81: 389–393.

Wu, J., C. K. Cheung., K. Wong., N. Huang. 2004. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to- nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. *Food Chemistry*. 85: 101-105.

Zervakis, G., C. Balis. 1995. Incompatibility alleles and mating behaviour between and within *Pleurotus* species. *Mush. Sc.* 14: 53-62.

Zervakis, G., J. Sourdis., C. Balis. 1994. Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus* species based on isozyme analysis. *Mycol. Res.* 98: 329-341.