



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

PROPIEDADES FUNCIONALES DEL HONGO COMESTIBLE *PLEUROTUS* Y SU RELEVANCIA EN LA ALIMENTACIÓN REGIONAL

MIGUEL ÁNGEL JUÁREZ LUNA

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2012



**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE
LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Miguel Ángel Juárez Luna**, alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección de la Profesora **Dra. Mercedes Sobal Cruz**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Propiedades funcionales del hongo comestible *Pleurotus* y su relevancia en la alimentación regional** y, de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, la Consejera y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla, a 10 de septiembre de 2012

Miguel Ángel Juárez Luna

Firma

Dra. Mercedes Sobal Cruz

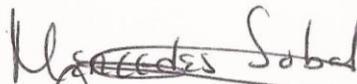
Vo.Bo. Profesora Consejera

La presente tesis, titulada: **Propiedades funcionales del hongo comestible *Pleurotus* y su relevancia en la alimentación regional**, realizada por el alumno: **Miguel Ángel Juárez Luna**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR:



DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESOR:



DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESORA:



DRA. REBECA RAMÍREZ CARRILLO

Puebla, Puebla, México, a 10 de septiembre de 2012

PROPIEDADES FUNCIONALES DEL HONGO COMESTIBLE *PLEUROTUS* Y SU RELEVANCIA EN LA ALIMENTACIÓN REGIONAL

Miguel Ángel Juárez Luna, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2012

En México, la influencia del ámbito familiar, social, cultural o económico es decisiva para lograr buenos hábitos de alimentación. Un consumo adecuado de alimentos que proporcionen los nutrientes necesarios es vital para ayudar al crecimiento y desarrollo óptimo de las personas. Con ello, es posible evitar muchos tipos de enfermedades. En los últimos años se han descubierto propiedades funcionales en varios hongos comestibles entre los que se encuentra el género *Pleurotus* spp. Aun así, el número de especies de macromicetos investigados en nuestro país son bajas y los que existen son de origen asiático y europeo. Por lo que, en la presente investigación se evaluó la concentración de fenoles totales y la actividad antibacteriana de extractos obtenidos de dos especies del género *Pleurotus*, una cepa comercial de *P. ostreatus* (CP-50) y, una cepa nativa de *P. levis* (CP-30). La cepa que presentó la mejor eficiencia biológica fue la cepa CP-30 de *P. levis* con 59.4 %. La mayor concentración de fenoles totales para ambas cepas fue en macerado agua (M1), siendo de 389.49 ± 3.24 mg equivalentes de ácido gálico/g de basidiocarpo seco para la CP-30 y de 277.74 ± 2.22 mg equivalentes de ácido gálico/g de basidiocarpo seco para la CP-50. La actividad bacteriostática de los extractos fue medida *in vitro* por el método de dilución en microplaca y la actividad bactericida fue observada tomando por triplicado 10 μ l de cada concentración y, sembrándola sobre agar Mueller Hinton. La mejor actividad antibacteriana se observó en el extracto M1 de la CP-30 contra *Bacillus subtilis* ATCC-6633 en todas sus concentraciones, mientras que en la cepa CP-50 fue en M1 y M2 (macerado tequila) en sólo dos de sus concentraciones. Se identificaron las condiciones óptimas del cultivo de las especies de *Pleurotus* estudiadas, proponiendo un paquete tecnológico, elemento esencial en procesos de innovación para impulsar el desarrollo rural en México.

Palabras clave: actividad antibacteriana, alimento funcional, fenoles totales, nutrición, *Pleurotus*.

FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE EDIBLE MUSHROOM *PLEUROTUS* AND ITS RELEVANCE TO REGIONAL NUTRITION

Miguel Ángel Juárez Luna, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2012

In Mexico, the influence of family, social, cultural or economic environment is vital to achieve good eating habits. An adequate intake of foods that supply of nutrients is essential to support growth and optimal development of individuals. This can prevent many types of diseases. In recent years, have been discovered functional properties in various edible fungi among which is the *Pleurotus* spp genus. Still, the numbers of species of macrofungi investigated in our country are low and there are Asian and European. So in the present study was assessed the concentration of total phenols and antibacterial activity of extracts from two species of *Pleurotus*, a commercial strain of *P. ostreatus* (CP-50) and wild strain of *P. levis* (CP-30). The strain CP-30 de *P. levis* showed the highest biological efficiency with 59.4%. The highest concentration of total phenols for both strains was in water macerated (M1) with 389.49 ± 3.24 mg gallic acid equivalents/g dry weight pileus and with 277.74 ± 2.22 mg gallic acid equivalents/g dry weight pileus for CP-50. The bacteriostatic activity of the extracts was measured *in vitro* by the microplate dilution method and bactericide activity was observed taking by triplicate 10 μ l of each concentration and seeding on Mueller Hinton agar. The best antibacterial activity was observed in M1 extract of the CP-30 strain against *Bacillus subtilis* ATCC-6633 at all concentrations, while the CP-50 strain was in M1 and M2 in only two concentrations. Were identified the optimum conditions of cultivation of *Pleurotus* spp., proposing a technology package, an essential element in innovation processes to promote rural development in Mexico.

Key words: antibacterial activity, functional food, nutrition, *Pleurotus*, total phenols.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por el apoyo económico brindado para realizar mis estudios.

Al Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla por haberme admitido en el Programa en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional, para realizar la Maestría en Ciencias.

A la Dra. Mercedes Sobal Cruz, por los valiosos comentarios y revisión al presente escrito.

Al Dr. Daniel Martínez Carrera, por haberme brindado la oportunidad de realizar la presente investigación en el área de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales.

Al Dr. Porfirio Morales Almora, por su amistad y por compartir sus conocimientos, y por sus valiosas y oportunas observaciones al presente trabajo.

A la Dra. Rebeca Ramírez Carrillo, por sus oportunas observaciones a esta investigación.

A todos los profesores del Colegio de Postgraduados, que participaron en mi formación.

Y, a todos mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, que me apoyaron en algún momento en mi trabajo de investigación, en especial a la M.C. Myrna Bonilla Quintero y al Biólogo Wilfrido Martínez Sánchez.

De igual forma se agradece el apoyo que brindó la Línea Prioritaria de Investigación 5 “Biotecnología Microbiana, Animal y Vegetal” proporcionando insumos del laboratorio y el bagazo de la caña de azúcar que se utilizó para elaborar la formulación COLPOS-17, la cual sirvió para cultivar los hongos comestibles estudiados.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO DE REFERENCIA	2
2.1 La alimentación y su relación con la salud	2
2.2 Radicales libres	4
2.3 Antioxidantes	5
2.4 Importancia patógena de <i>Bacillus subtilis</i>	6
3. REVISIÓN DE LITERATURA	8
3.1 Aspectos generales de los hongos	8
3.2 Importancia biotecnológica de los hongos comestibles	9
3.3 Los hongos comestibles en la alimentación	11
3.4 Propiedades nutricionales de los hongos comestibles	11
3.5 Compuestos fenólicos y ácidos orgánicos en hongos comestibles	14
3.6 Los hongos como alimentos funcionales	14
3.7 El género <i>Pleurotus</i>	16
3.8 Taxonomía de <i>Pleurotus</i> spp.	16
3.9 Propiedades funcionales de <i>Pleurotus</i> spp.	17
3.9.1 Antioxidantes en <i>Pleurotus</i> spp.	18
3.9.2 Propiedades antimicrobianas de <i>Pleurotus</i> spp.	19
3.10 Métodos de extracción	20
3.10.1 Extracción continua o progresiva (Soxhlet)	21
3.10.2 Extracción discontinua o simultánea (macerado)	21
4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	23
5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1 Material biológico	26
6.2 Biotecnología del cultivo de las cepas de hongos comestibles	27
6.3 Obtención de los extractos de las cepas en estudio	28
6.4 Determinación de las propiedades funcionales de los extractos	32
6.4.1 Método para fenoles totales	32
6.4.1.1 Curva de calibración con ácido gálico	34
6.4.1.2 Cuantificación de fenoles totales	35
6.4.2 Prueba de la actividad antibacteriana	36
6.4.2.1 Cinética de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC-6633)	39
6.4.2.2 Determinación del efecto de los extractos en <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	39
6.4.2.3 Determinación del efecto de los extractos	40

6.4.2.4 Cálculo del efecto de los extractos sobre la bacteria	42
6.4.2.5 Determinación del efecto bactericida de los extractos de las cepas en estudio	42
6.5 Análisis de resultados	43
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES	44
7.1 Recursos genéticos de hongos comestibles	44
7.2 Características morfológicas y calidad de los basidiocarpos	44
7.2.1 Evaluación de la producción con base en la eficiencia biológica	46
7.3 Propiedades funcionales de las cepas en estudio	47
7.3.1 Fenoles totales	47
7.3.1.1 Fenoles totales de <i>P. levis</i> (CP-30)	47
7.3.1.2 Fenoles totales de <i>P. ostreatus</i> (CP-50)	48
7.3.1.3 Comparación de fenoles totales entre CP-30 de <i>P. levis</i> y CP-50 de <i>P. ostreatus</i>	48
7.3.2 Actividad antibacteriana de los extractos	49
7.3.2.1 Cinética de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC-6633)	49
7.3.2.2 Efecto de los extractos de la cepa CP-30 de <i>P. levis</i>	50
7.3.2.3 Efecto de los extractos de la cepa CP-50 de <i>P. ostreatus</i>	54
7.3.2.4 Comparación del efecto de los extractos entre la CP-30 de <i>P. levis</i> y CP-50 de <i>P. ostreatus</i>	57
7.3.3 Efecto bactericida de los extractos de CP-30 de <i>P. levis</i> y CP-50 de <i>P. ostreatus</i>	59
8. CONCLUSIONES	61
9. ESTRATEGIA PARA APROVECHAR LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE <i>PLEUROTUS</i> EN EL MEDIO RURAL	62
10. LITERATURA CITADA	69
11. ANEXOS	74
Anexo 1	74
Anexo 2	75
Anexo 3	76
Anexo 4	77
Anexo 5	78

LISTA DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Consejos para una alimentación saludable (Calañas-Continente y Bellido, 2006).	3
Cuadro 2	Especies reactivas del oxígeno (modificado de Dorado <i>et al.</i> , 2003).	4
Cuadro 3	Aplicaciones biotecnológicas de <i>Pleurotus</i> (Mora y Martínez-Carrera, 2007; Brizuela <i>et al.</i> , 1998; Garzón y Cuervo, 2008).	10
Cuadro 4	Composición proximal de algunas especies cultivadas de hongos comestibles (Chang y Miles, 2004).	12
Cuadro 5	Comparación de aminoácidos esenciales de <i>Pleurotus</i> spp. con otros hongos comestibles y huevos de gallina (Chang y Miles, 1989).	13
Cuadro 6	Contenido vitamínico de los principales hongos comestibles cultivados comercialmente en México (Adaptado de Martínez-Carrera <i>et al.</i> , 2004).	13
Cuadro 7	Componentes activos con efecto medicinal de Basidiomicetos (Cohen <i>et al.</i> , 2002; Lindequist <i>et al.</i> , 2005).	18
Cuadro 8	Material biológico (MB) depositado en el CREGENHCFyM empleado para la cuantificación de fenoles totales y evaluación de la actividad antibacteriana.	27
Cuadro 9	Nomenclatura de los extractos usados para evaluar las propiedades funcionales.	31
Cuadro 10	Diluciones realizadas para cuantificar los polifenoles totales presentes en los extractos.	33
Cuadro 11	Volúmenes utilizados de cada solución para realizar la prueba de sensibilidad bacteriana de los extractos contra <i>B. subtilis</i> .	40
Cuadro 12	Características de los basidiocarpos de la cepa <i>Pleurotus levis</i> (CP-30) y <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-50) en COLPOS 17.	44
Cuadro 13	Características físicas de los hongos frescos de las cepas CP-30 de <i>Pleurotus levis</i> y CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivadas en la formulación COLPOS 17.	45
Cuadro 14	Períodos de tiempo registrados en la fase de producción (1ª. Fructificación), número de cosechas y eficiencia biológica.	45
Cuadro 15	Efecto de las concentraciones de extractos obtenidos de basidiocarpos en <i>B. subtilis</i> (ATCC-6633).	58
Cuadro 16	Efecto bactericida de extractos obtenidos de basidiocarpos en <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC-6633).	60

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Clasificación de las bacterias de mayor relevancia clínica por género y especie (OPS, 2004).	6
Figura 2	Esquema de la agrupación de las hifas (micelio) dentro de la tierra o de un sustrato artificial y del cuerpo fructífero de tamaño macroscópico (modificado de Kalac y Svoboda, 2000).	8
Figura 3	Producción mundial de hongos comestibles ton/año (FAOSTAT, 2007).	9
Figura 4	Diagrama general de trabajo realizado en la presente investigación.	26
Figura 5	Procedimiento para la obtención de los extractos por Soxhlet (continua o progresiva) y por maceración (discontinua o simultanea) de los hongos comestibles del genero <i>Pleurotus</i> . *marca comercial® (tequila blanco 100 años).	29
Figura 6	Obtención de la muestra a partir de los basidiocarpos cosechados de las cepas de <i>Pleurotus</i> .	30
Figura 7	Obtención de extracto acuoso a partir de los basidiocarpos.	30
Figura 8	Distribución espacial de los 96 pozos de la microplaca (Vacutest, Kima).	34
Figura 9	Determinación de fenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico de los extractos obtenidos con las cepas CP-30 y CP-50.	35
Figura 10	Bioensayo con los extractos estériles de los hongos comestibles contra <i>B. subtilis</i> .	37
Figura 11	Prueba bactericida o letal realizada en cajas Petri con agar Muller Hinton. Los alfanúmeros sombreados representan el pozo de la microplaca del cual fue tomada la muestra y colocada en la caja Petri. Los alfanúmeros no sombreados muestran la dilución a la que pertenecen las muestras representadas por los alfanúmeros sombreados.	43
Figura 12	Cepas fructificadas en la fórmula suplementada COLPOS 17 en el módulo experimental del Colegio de Postgraduados. A= <i>Pleurotus levis</i> (CP-30), B= <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-50).	44
Figura 13	Condiciones ambientales de temperaturas máximas y mínimas registradas durante la fructificación de las cepas CP-30 y CP-50.	46
Figura 14	Humedad relativa en el módulo de producción durante la fructificación de la cepa CP-30 de <i>Pleurotus levis</i> y CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	46
Figura 15	Concentración de fenoles presentes en extractos de la cepa de <i>P. levis</i> (CP-30).	47
Figura 16	Concentración de fenoles presentes en extractos de la cepa de <i>P.ostreatus</i> (CP-50).	48
Figura 17	Comparación de fenoles totales presentes en los extractos macerados de la CP-30 de <i>P. levis</i> y la CP-50 de <i>P. ostreatus</i> .	49

Figura 18	Cinética de crecimiento de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> (CPB-9) utilizada para evaluar las propiedades antibacterianas de los extractos de las cepas CP-30 de <i>Pleurotus levis</i> y CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	49
Figura 19	Lecturas obtenidas a tiempo cero en el efecto de los extractos M1, M2 y M3 del basidiocarpo de la CP-30 contra CPB-9 (<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633).	50
Figura 20	Actividad antibacteriana a 24 h de incubación de la bacteria CPB-9 (<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633) en los extractos, M1, M2 y M3 del basidiocarpo de la CP-30 de <i>Pleurotus levis</i> .	52
Figura 21	Actividad antibacteriana a 48 h de incubación de la bacteria CPB-9 (<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633) en los extractos, M1, M2 y M3 del basidiocarpo de la CP-30 de <i>Pleurotus levis</i> .	52
Figura 22	Lecturas obtenidas a tiempo cero en el efecto de los extractos A1, A2 y A3 del basidiocarpo de la CP-30 contra CPB-9 (<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633).	53
Figura 23	Actividad antibacteriana a 24 h de incubación de la bacteria CPB-9 (<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633) en los extractos, A1, A2 y A3 del basidiocarpo de la CP-30 de <i>Pleurotus levis</i> .	54
Figura 24	Actividad antibacteriana a 48 h de incubación de la bacteria CPB-9 (<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633) en los extractos, A1, A2 y A3 del basidiocarpo de la CP-30 de <i>Pleurotus levis</i> .	54
Figura 25	Lecturas obtenidas a tiempo cero en el efecto de los extractos M1 y M2 del basidiocarpo de la CP-50 contra CPB-9 (<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633).	55
Figura 26	Actividad antibacteriana a 24 h de incubación de la bacteria CPB-9 (<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633) en los extractos M1 y M2 del basidiocarpo de la CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	56
Figura 27	Actividad antibacteriana a 48 h de incubación de la bacteria CPB-9 (<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633) en los extractos M1 y M2 del basidiocarpo de la CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	57
Figura 28	Mapa conceptual de la aplicación del paquete tecnológico, intervenciones y actores participantes.	63

1. INTRODUCCIÓN

En México el consumo de hongos forma parte del acervo cultural de la población rural, su conocimiento y uso fue muy importante en las culturas prehispánicas, sobre todo en las mesoamericanas. Fray Bernardo de Sahagún en su “Historia General de las Cosas de la Nueva España” informa sobre la existencia del “Hongo Divino” o “Teonanacatl”, utilizado en ceremonias religiosas por sus propiedades alucinógenas, pero también hace mención de la utilidad en la medicina de estos hongos, indicando que son medicina para la calentura con frío y para la gota. De tal manera que constituyeron parte de una estrategia de subsistencia basada en el uso múltiple de los recursos naturales, en ciertas regiones del país aún persisten las recolectas realizadas por toda la familia con fines de autoconsumo o comercialización (Capello *et al.*, 2006). La mayoría de nosotros consume hongos comestibles por su excelente sabor, aroma, y textura. Sin embargo, es poco conocido su gran potencial como alimento funcional con propiedades nutricionales y medicinales que promueven la salud. Estas propiedades son únicas y diferentes a las aportadas por otros alimentos ampliamente consumidos, ya que los hongos constituyen un reino de la naturaleza independiente de las plantas y los animales (Martínez-Carrera *et al.*, 2004).

En lo que respecta al uso de estos hongos en la medicina, se han aislado de algunos de ellos diversos principios activos, tales como: polisacáridos, terpenoides, complejos de péptido-polisacáridos y proteínas, los cuales son utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades. Entre los hongos que presentan algunos de estos principios activos se puede señalar a: *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc; *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst; *Grifola frondosa* (Dicks) Gray; *Lentinula edodes* (Berck.) Pegler, *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn, cuyo consumo es recomendado para reducir los niveles de colesterol, en el tratamiento de la diabetes, caída del cabello, desórdenes nerviosos, hipertensión, disfunción sexual, úlcera intestinal, bronquitis crónica, además como antiparasitario, antioxidante, laxante, antiinflamatorio, antitumoral (Karaman *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2007; Trigos y Suárez-Medellín, 2010).

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 La alimentación y su relación con la salud

En el mundo mueren 57 millones de personas al año. Según la Organización Mundial de la Salud, el aumento de las enfermedades crónicas no transmisibles son las responsables de las dos terceras partes de estas muertes y del 46% de la morbilidad global. Estos porcentajes van en aumento, por lo que si no invertimos esta tendencia, en el año 2020 las enfermedades no transmisibles serán la causa del 73% de las defunciones y del 60% de la carga mundial de enfermedad (Calañas-Continente y Bellido, 2006).

El nexo existente entre alimentación, mantenimiento de la salud y desarrollo de enfermedades crónicas ha acumulado una considerable evidencia científica en los últimos años. Muchas de las causas actuales de mortalidad están íntimamente asociadas a factores de riesgo evitables como alimentación desequilibrada, obesidad, sedentarismo, tabaquismo y consumo de alcohol. De los diez factores de riesgo identificados por la Organización Mundial de la Salud como claves para el desarrollo de las enfermedades crónicas, cinco están estrechamente relacionados con la alimentación y el ejercicio físico: obesidad, sedentarismo, hipertensión arterial, hipercolesterolemia y consumo insuficiente de frutas y verduras. Una alimentación saludable debería cumplir los siguientes objetivos (Calañas-Continente y Bellido, 2006):

- Asegurar que el beneficio global de sus recomendaciones sea superior a cualquier peligro potencial en los grupos poblacionales a las que van dirigidas.
- Aportar una cantidad de calorías suficiente como para llevar a cabo los procesos metabólicos y de trabajo físico necesarios.
- Suministrar suficientes nutrientes con funciones plásticas y reguladoras.
- Favorecer el mantenimiento o consecución del peso ideal.
- Favorecer el equilibrio entre las cantidades de cada uno de los nutrientes entre sí. Es recomendable un aporte de hidratos de carbono del 45-65% del aporte calórico total; de grasas no superior al 20-35% de las calorías diarias y un 10-35% en forma de proteínas de alto valor biológico.
- Reducir el riesgo de enfermedades crónicas relacionadas con la alimentación.

Una alimentación saludable es aquella que permite el crecimiento y desarrollo del niño, el mantenimiento de la salud, la actividad y la creatividad del adulto y la supervivencia y el confort en el anciano. Además, el término saludable se relaciona con una alimentación que favorece y posibilita el buen estado de salud y disminuye el riesgo de enfermedades crónicas relacionadas con la alimentación (Calañas-Continento y Bellido, 2006) (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Consejos para una alimentación saludable (Calañas-Continento y Bellido, 2006).

Limitar la ingesta de grasa (especialmente saturada)
Limitar la ingesta de colesterol
Potenciar el consumo de frutas, verduras y granos integrales con fibra
Mantener un equilibrio calórico mediante dieta y ejercicio
Mantener un aporte adecuado de calcio en la mujer
Reducir el consumo de sodio
Aumentar la ingesta de hierro
Aumentar la ingesta de beta-caroteno y otros antioxidantes
Lactancia natural

Cada vez hay más evidencias de que los nutrientes interaccionan directamente con los genes y todo parece indicar que ciertos alimentos con compuestos bioactivos son capaces de interactuar con regiones del genoma consiguiendo una acción protectora frente a mecanismos de iniciación de algunas enfermedades (Fernández y Benito 2008). En los últimos años, se han descubierto componentes en los alimentos que, independientemente de su valor nutricional, intervienen en la mejoría de las funciones fisiológicas o previenen enfermedades. Los polifenoles del vino tinto fueron los primeros identificados, y a partir de ellos se han ido incorporando una larga lista: licopeno (contenido en el tomate y frutos rojos), isoflavonas y fitoesteroles (soja), compuestos organofosforados (ajo, cebolla), β -glucanos (avena), indoles, isocianatos (coles, brócoli), carotenoides (zanahoria), ácidos grasos omega-3 (pescados), etc. En la actualidad, la preocupación de la población en los países industrializados ha ido cambiando de la búsqueda de alimentos suficientes y seguros a la de alimentos saludables y, más recientemente de los funcionales. Estos últimos, se definen como alimentos naturales o modificados que contienen ingredientes alimenticios que, con independencia de su valor nutricional, aportan efectos beneficiosos en las funciones fisiológicas (entre las que se encuentran el crecimiento y desarrollo), o para la prevención de enfermedades. Un aspecto

importante es que sean consumidos dentro de la dieta habitual (no en forma farmacológica) (Alonso-Franch y Castellano, 2007).

2.2 Radicales libres

Se consideran radicales libres (RL) aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad (Rodríguez *et al.*, 2001). Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos (Avello y Suwalsky, 2006). Esto lo hace muy inestable, extraordinariamente reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, así como con la diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Rodríguez *et al.*, 2001). En los sistemas vivos se generan muchos tipos de radicales libres, siendo los más conocidos los radicales del oxígeno. Se utiliza el término Especies Reactivas del Oxígeno (reactive oxygen species, ROS) como nombre colectivo para referirse a las especies derivadas del oxígeno, incluyendo tanto a los derivados radicales como los no radicales, que son agentes oxidantes y fácilmente convertibles en radicales. En el **cuadro 2** se presentan las principales especies reactivas implicados en la biología redox (Dorado *et al.*, 2003).

Cuadro 2. Especies reactivas del oxígeno (modificado de Dorado *et al.*, 2003).

	ROS	Símbolo
Radicales	Radical superóxido	$O_2^{\cdot -}$
	Radical Hidroxilo	OH^{\cdot}
	Radical Alcoxilo	RO^{\cdot}
	Radical Peróxilo	RO_2^{\cdot}
	Radical de óxido nítrico	NO_2^{\cdot}
	Radical peróxido lípido	L

Al elevarse o disminuir las concentraciones fisiológicas de las especies reactivas del oxígeno (ERO) puede inducir a importantes alteraciones funcionales. La aterosclerosis, el envejecimiento y el cáncer son ejemplos de algunas enfermedades originadas por disfunciones y corresponden a un tercio de la enorme lista de problemas fisiológicos y padecimientos que de alguna manera, se asocian con un número elevado de procesos generadores de RL. Dichas enfermedades se han relacionado con el estrés oxidativo y con la generación de radicales libres. Por esto, terapias antioxidantes y dietas ricas (como la dieta mediterránea) o enriquecidas con antioxidantes parecen prevenir o al menos disminuir el deterioro funcional orgánico originado por el estrés oxidativo (Elejalde-Guerra, 2001).

2.3 Antioxidantes

El término antioxidante fue utilizado originalmente para referirse específicamente a un producto químico que previniera el consumo de oxígeno. A finales del siglo XIX y a principios de siglo XX, extensos estudios fueron dedicados a las aplicaciones de antioxidantes en importantes procesos industriales, tales como la prevención de la corrosión del metal, la vulcanización del caucho y, la polimerización de combustibles en la formación de escoria en motores de combustión interna (Matill, 1947). Las primeras investigaciones sobre el rol de los antioxidantes en biología se centraron en su uso para la prevención de la oxidación de grasas insaturadas, que es la causa de la rancidez. La actividad antioxidante podía ser medida simplemente colocando la grasa en un contenedor cerrado con oxígeno y midiendo la tasa de consumo de éste. Sin embargo, fue la identificación de las vitaminas A, C, y E como antioxidantes la que revolucionó el campo y condujo a dilucidar la importancia de los antioxidantes en la bioquímica de los organismos vivos. Los posibles mecanismos de acción de los antioxidantes fueron investigados por primera vez cuando fue reconocido que una sustancia con actividad antioxidante fuese aquella que se oxida a sí misma fácilmente. Los antioxidantes son a menudo agentes reductores como tioles o polifenoles (Sies, 1997), estos últimos además poseen propiedades antimicrobianas frente a bacterias patógenas para el humano (Barros *et al.*, 2007).

con bacteriemia. Además, el uso de productos de lavandería derivados de *B. subtilis* que contengan enzimas proteolíticas, ha generado casos de dermatitis y enfermedades respiratorias. Varios episodios de intoxicaciones alimentarias se han atribuido a *B. subtilis*, a menudo se ha encontrado en gran cantidad de alimentos (cultivos puros $>10^6$ ufc/g), generalmente en platos de carne como salchichas, empanadas de carne y pollo relleno, también se han encontrado en pizza y pan integral. Los síntomas como vómitos con diarrea en más de la mitad de los incidentes, se produjo después de periodos de incubación de 15 min a 10 h (Logan, 1988)

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Aspectos generales de los hongos

Los hongos son organismos diferentes a los del reino vegetal y animal. Los hongos son organismos con núcleo que se reproducen por esporas, carecen de clorofila (por lo tanto no son fotosintéticos), se reproducen sexual o asexualmente y tienen estructuras somáticas filamentosas y ramificadas rodeadas por una pared celular hecha de celulosa, quitina o ambas (Alexopoulos, 1962) (**Figura 2**).

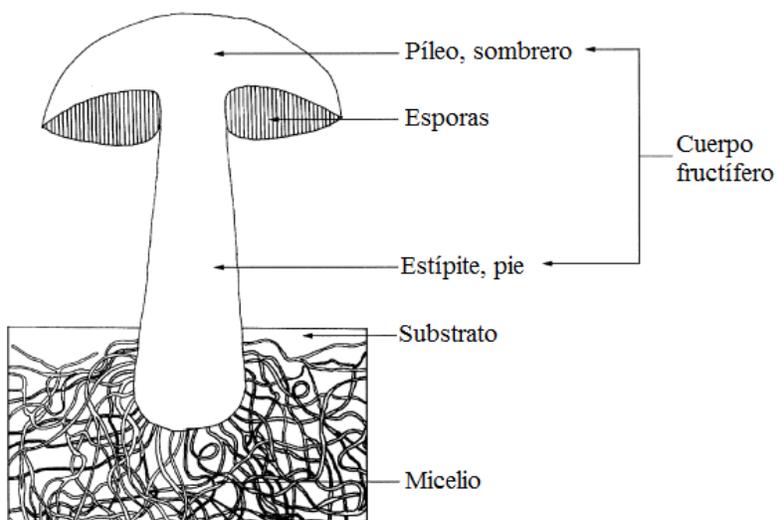


Figura 2. Esquema de la agrupación de las hifas (micelio) dentro de la tierra o de un sustrato artificial y del cuerpo fructífero de tamaño macroscópico (modificado de Kalac y Svoboda, 2000).

Los hongos se clasifican en las divisiones *Oomicetes*, *Quitridiomycetes*, *Zigomicetes*, *Ascomycetes* y *Basidiomycetes*, de las cuales los basidiomycetes son los hongos más evolucionados. La denominación basidiomycetes se refiere a que poseen unos basidios en el extremo de las hifas, donde se forman las esporas de origen sexual, siendo ésta la forma usual de reproducción, la reproducción asexual se da en basidiomycetes menos evolucionados. Su forma de desarrollarse varía según se trate de hongos parásitos o saprófitos, en general los basidiomycetes comestibles suelen ser saprófitos y crecen sobre materias orgánicas o suelos ricos en humus (Strasburger *et al.*, 1986)

Ante la creciente demanda de hongos comestibles en el mundo, su cultivo se ha incrementado en los últimos años y se han tratado de someter a cultivo especies silvestres e intensificado la explotación de las que actualmente se cultivan (Mariaca-Méndez *et al.*, 2001). Los hongos

incluyen aproximadamente 12,000 especies que tienen basidiocarpos macroscópicos, es decir, tienen un tamaño suficiente para ser vistos a simple vista (Martínez, 2010). Cerca de 80 especies (básicamente saprófitas) se han logrado cultivar en laboratorios de diversas partes del mundo y de las cuales 22 han sido cultivadas comercialmente y, sólo 10 se producen a escala industrial. En México, existen más de 200 especies de hongos comestibles, de las cuales dos tienen mayor demanda: el champiñón (*Agaricus bisporus*) y, las setas (*Pleurotus ostreatus*) (Martínez-Carrera *et al.*, 1993).

3.2 Importancia biotecnológica de los hongos comestibles

El cultivo de hongos comestibles es una industria biotecnológica en continuo proceso de expansión y que poco a poco ha ido cobrando mayor importancia en el ámbito económico de muchos países (Figura 3). A nivel mundial, el champiñón (*Agaricus*) es el hongo comestible más importante con un nivel de producción superior a los 2 millones de toneladas métricas anuales, seguido por el *shiitake* (*Lentinula*) con más de 1.5 millones de toneladas, y las setas (*Pleurotus*) con alrededor de un millón de toneladas. El género *Agaricus* es el más cultivado y consumido en Europa, Norteamérica y México, por su parte *Lentinula edodes* es producido en su mayor parte en Japón y, *Pleurotus* en México y Sudamérica (Martínez-Carrera *et al.*, 2007).

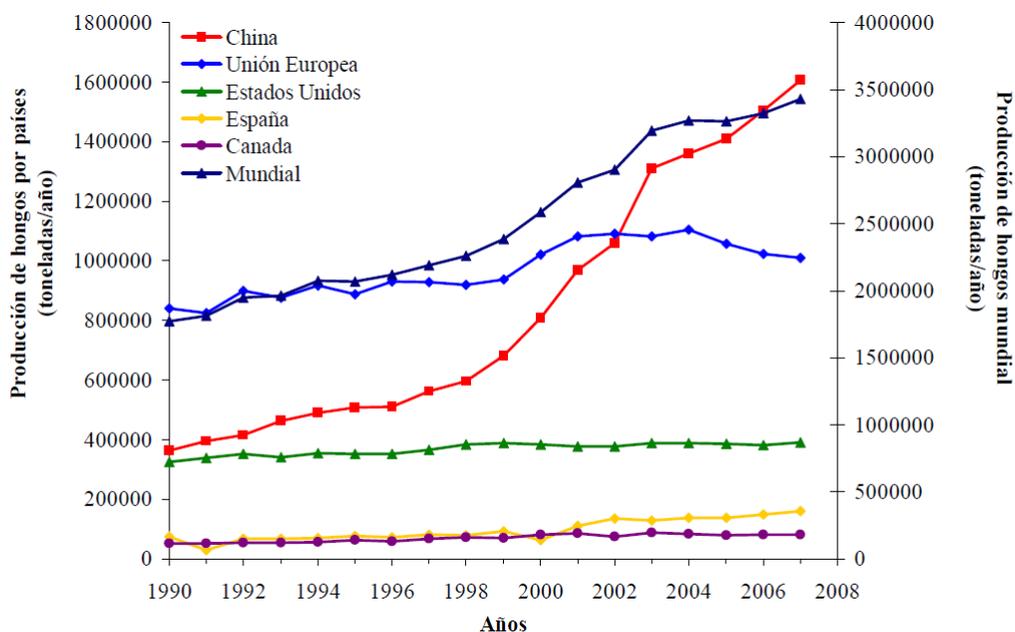


Figura 3. Producción mundial de hongos comestibles (ton/año) (FAOSTAT, 2007).

En lo que se refiere a los hongos del género *Pleurotus*, se ha incrementado su popularidad mundial en los últimos años debido a su capacidad para crecer en un amplio intervalo de temperaturas y, por su versatilidad para utilizar como sustrato diversos materiales ricos en lignina y celulosa. Para la preparación y acondicionamiento de estos sustratos, se han utilizado varias técnicas tales como pasteurización, esterilización, pasteurización-esterilización, fermentación, etc. (Mora y Martínez-Carrera, 2007). La bioconversión de residuos agrícolas lignocelulósicos como fuente para la producción de hongos comestibles a través de procesos de fermentación sólida, representa una posibilidad biotecnológica para la obtención de alimento humano rico en proteínas y la reducción del impacto ambiental de éstos, partiendo por lo general de materia prima de bajo costo (Sánchez y Royse, 2002). El proceso de fermentación sólida utilizando hongos comestibles, mejora la digestibilidad, aumenta el contenido de proteínas, vitaminas y minerales del sustrato residual. Estos hallazgos sugieren su utilización como materia prima para elaboración de concentrados o piensos para animales o en su caso pueden incorporarse directamente al suelo como abono orgánico o someterlos a procesos de compostaje tradicional o vermicompostaje. Así, estos residuos pueden convertirse en una alternativa de reciclado de residuos orgánicos posibilitando la obtención de productos que pueden ser usados como biofertilizantes y acondicionadores de suelo de cara a la agricultura orgánica, que en los últimos años ha creado nuevas oportunidades de exportación (Garzón y Cuervo, 2008). *Pleurotus* y muchos otros basidiomicetos, producen compuestos de interés industrial tales enzimas y, otros metabolitos secundarios con aplicaciones farmacéuticas. Gracias a estas características, los hongos tienen diversas aplicaciones en distintos ámbitos biotecnológicos tales como el ambiental, farmacológico y el alimentario (Mora y Martínez-Carrera, 2007; Brizuela *et al.*, 1998) (**Cuadro 3**).

Cuadro 3. Aplicaciones biotecnológicas de *Pleurotus* (Mora y Martínez-Carrera, 2007; Brizuela *et al.*, 1998; Garzón y Cuervo, 2008).

Ambiental	Farmacológica	Alimentaria
Bioconversión de residuos agroindustriales	Producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico	Alimento humano de alto valor nutritivo
Biodegradación de contaminantes como hidrocarburos aromáticos policíclicos, etc.		Producción de proteínas con uso industrial potencial

3.3 Los hongos comestibles en la alimentación

Es sabido que los hongos son un alimento sabroso y versátil. Han formado parte de nuestra dieta durante años. Sin embargo, mientras otros alimentos como las verduras son bien conocidos por sus propiedades nutricionales e incluso saludables, parece ser que los hongos no han sido valorados del mismo modo. El caso más claro es el del champiñón, eclipsado por sus parientes más exóticos como el shiitake (*L. edodes*) o la seta ostra (*Pleurotus ostreatus*), mejor conocidos por sus propiedades medicinales. Es poco conocido el papel que pueden tener los hongos en cuanto al mantenimiento de una buena salud y en la prevención de enfermedades (Martínez, 2010).

Algunos de los componentes identificados y aislados recientemente a partir de hongos medicinales, han mostrado prometedoras propiedades inmunomodulatorias, antitumorales, cardiovasculares, antivirales, antibacterianas, antiparasitarias, hepatoprotectoras y antidiabéticas. Los polisacáridos derivados de hongos están considerados ahora como componentes capaces de modular la respuesta inmune en animales y humanos e inhibir el crecimiento de ciertos tumores. Debido al gran interés por clasificar a los hongos como alimentos funcionales, es importante conocer su composición (Martínez, 2010).

3.4 Propiedades nutricionales de los hongos comestibles

A nivel alimenticio, los hongos comestibles, poseen el doble del contenido de proteínas que los vegetales y disponen de los nueve aminoácidos esenciales, incluyendo leucina y lisina (ausente en la mayoría de los cereales), ricos en carbohidratos, minerales (superando a la carne de muchos pescados), moderados en fibra cruda, ceniza y bajo contenido de calorías. (Chang y Miles, 2004; López-Rodríguez *et al.*, 2008) (**Cuadro 4**). Uno de los hongos comestibles más estudiado y cultivado durante los últimos años es *Pleurotus ostreatus* debido a la facilidad de cultivo y a su calidad nutricional. El género *Pleurotus*, constituye una buena fuente de nutrientes; sin embargo, se ha reportado que la composición química de los basidiocarpos dependen básicamente del tipo de cepa, la composición del sustrato (sólo o suplementado), técnicas de cultivo, edad y etapa de desarrollo del hongo (Cardona, 2001; Moda *et al.*, 2005).

Cuadro 4. Composición proximal de algunas especies cultivadas de hongos comestibles (Chang y Miles, 2004).

Especie	H.	Proteína cruda (N x 4.38)	Grasa cruda	Carbohidratos		Fibra cruda	Ceniza	V. E.
				Totales	Sin N			
<i>Agaricus bisporus</i>	78.3-90.5	23.9-34.8	1.7-8.0	51.3-62.5	44.0-53.5	8.0-10.4	7.7-12.0	328-368
<i>A. campestris</i>	89.7	33.2	1.9	56.9	48.8	8.1	8.0	354
<i>Auricularia</i> sp.	89.1	4.2	8.3	82.8	63.0	19.8	4.7	351
<i>Boletus edulis</i>	87.3	29.7	3.1	59.7	51.7	8.0	7.5	362
<i>Flammulina velutipes</i>	89.2	17.6	1.9	73.1	69.4	3.7	7.4	378
<i>Lentinula edodes</i>	90.0-91.8	13.4-17.5	4.9-8.0	67.5-78.0	59.5-70.7	7.3-8.0	3.7-7.0	387-392
<i>Pleurotus eous</i>	92.2	25.0	1.1	59.2	-	12.0	9.1	261
<i>P. florida</i>	91.5	27.0	1.6	58.0	-	11.5	9.3	265
<i>P. ostreatus</i>	73.7-90.8	10.5-30.4	1.6-2.2	57.6-81.1	48.9-74.3	7.5-8.7	6.1-9.8	345-367
<i>P. sajor-caju</i>	90.1	26.6	2.0	50.7	-	13.3	6.5	300
<i>Volvariella displasia</i>	90.4	28.5	2.6	57.4	40.0	17.4	11.5	304
<i>V. volvacea</i>	89.1	25.9	2.4	-	45.3	9.3	8.8	276

Todos los datos se presentan como porcentaje de peso seco, excepto humedad (peso fresco %) y valor energético (Kcal/100 g de peso seco). H= Humedad (%). V.E.= Valor Energético.

Uno de los atributos nutricionales de los hongos comestibles es su alto contenido proteico (25%), el cual es equiparable a la leche (25.2%) y frijol (24.2%) y más alto que el reportado para el arroz (7.3%), maíz (11.2%) y trigo (13.2%) (Martínez-Carrera *et al.*, 2004). Sin embargo, la calidad proteica de un producto, está determinada por su valor biológico (contenido de aminoácidos esenciales) y digestibilidad.

La importancia de los aminoácidos radica en su función (**Cuadro 5**). En general, se puede decir que los aminoácidos son los componentes que forman las proteínas, pero además desempeñan un papel muy importante en un gran número de procesos: intervienen en el metabolismo de la glucosa, en la producción de ciertas hormonas, forman parte del metabolismo del sistema nervioso, contribuyen al crecimiento y reparación de los tejidos, tienen funciones desintoxicantes, etc. (Martínez, 2010).

Cuadro 5. Comparación de aminoácidos esenciales de *Pleurotus* spp. con otros hongos comestibles y huevos de gallina (Chang y Miles, 1989).

Aminoácidos	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Lentinula edodes</i>	<i>Pleurotus florida</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	<i>Volvariella diplasia</i>	<i>Volvariella volvacea</i>	Huevos ^a
Leucina	7.5	7.9	7.5	6.8	7.0	5.0	4.5	8.8
Isoleucina	4.5	4.9	5.2	4.2	4.4	7.8	3.4	6.6
Valina	2.5	3.7	6.9	5.1	5.3	9.7	5.4	7.3
Triptófano	2.0	Nd	1.1	1.3	1.2	1.5	1.5	1.6
Lisina	9.1	3.9	9.9	4.5	5.7	6.1	7.1	6.4
Treonina	5.5	5.9	6.1	4.6	5.0	6.0	3.5	5.1
Fenilalanina	4.2	5.9	3.5	3.7	5.0	7.0	2.6	5.8
Metionina	0.9	1.9	3.0	1.5	1.8	1.2	1.1	3.1
Histidina	2.7	1.9	2.8	1.7	2.2	4.2	3.8	2.4
a.a. esenciales totales	38.9	36.0	46	33.4	37.6	48.5	32.9	47.1

Los datos son presentados en gramos de aminoácidos por 100 gramos de proteína cruda ajustada. Nd= no determinado, a= por comparación.

Los hongos cultivados son buena fuente de diversas vitaminas y minerales (**Cuadro 6**), particularmente riboflavina (vitamina B₂), ácido pantoténico (vitamina B₅), niacina (vitamina B₃), etc., aunque sus niveles específicos dependen de la especie de hongo considerada y del estado de desarrollo del hongo (Çaglarirmak, 2009). Según algunos estudios, el contenido en riboflavina de algunos hongos como *A. bisporus*, *L. edodes* y *P. ostreatus* es más alto que en muchas verduras y vegetales (0,7-5,1 mg/100 g) y, algunas variedades de *A. bisporus* contienen niveles similares a los de otros alimentos como huevos y quesos; y niveles más altos que en leche y sus derivados (Mattila *et al.*, 2001; Furlani y Godoy, 2008)

Cuadro 6. Contenido vitamínico de los principales hongos comestibles cultivados comercialmente en México (Adaptado de Martínez-Carrera *et al.*, 2004).

Componente	Contenido en base seca (mg/kg)		
	<i>Pleurotus</i>	<i>Agaricus</i>	<i>Lentinula</i>
Vitamina A (retinol)	0.035	0.022	0.031
Vitamina B ₁ (tiamina)	5.7	7.1	5.9
Vitamina B ₂ (riboflavina)	25	51	18
Vitamina B ₆ (piridoxina)	5.5	6.3	4.0
Vitamina B ₁₂ (cobalamina)	0.006	0.008	0.008
Vitamina C (ac. ascórbico)	200	170	250
Vitamina D ₂ (ergosterol)	0.092	0.082	0.091
Vitamina D ₃ (colecalfiferol)	0.236	0.139	0.201

3.5 Compuestos fenólicos y ácidos orgánicos en hongos comestibles

Los hongos contienen cantidades importantes de compuestos fenólicos y ácidos orgánicos. Los ácidos oxálico, cítrico, málico, quínico y fumárico son muy frecuentes en muchas especies de hongos como *Suillus bellini*, *Tricholomopsis rutilans*, *Hygrophorus agathosmus*, *Amanita rubescens*, *Russula cyanoxantha*, *Boletus edulis*, *Tricholoma equestre*, *Suillus luteus* y *Suillus granulatum*. En cuanto a los compuestos fenólicos, sólo se han podido identificar en algunos de ellos, por ejemplo, *A. rubescens*, *R. cyanoxantha* y *T. equestre* contienen ácido phidroxibenzoico. Otros compuestos como los ácidos tánico, gálico, protocatecuico, gentísico, vanillico, siríngico, caféico, cumárico, ferúlico y cinámico se han detectado en extractos acuosos y metanólicos obtenidos de muchas especies de hongos, incluyendo algunas tan conocidas como *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Cantharellus cibarius*, etc. Los extractos acuosos de *Termitomyces heimii* contienen concentraciones muy elevadas de ácido tánico (15,54 mg/g peso seco) en comparación con otras especies, mientras que *Morchella conica* posee los niveles más altos de ácido gálico (12,85 mg/g peso seco), los extractos acuosos de *Helvella crispa* muestran sin embargo, valores elevados de ácidos protocatecuico (18,48 mg/g) y gentísico (4,89 mg/g). A pesar de los numerosos y detallados estudios que se han realizado sobre los compuestos fenólicos de los hongos, prácticamente la totalidad se refieren a *Agaricus bisporus*, por lo que aún hoy en día se desconoce la identidad de los compuestos fenólicos de la mayoría de las otras especies de hongos (Puttaraju *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2006).

3.6 Los hongos como alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son una nueva categoría de alimentos que están generando un elevado interés entre los consumidores y en la industria alimentaria. Un alimento puede considerarse “funcional” si se demuestra satisfactoriamente que, además de su efecto nutritivo, beneficia una o más funciones del organismo de modo que mejora el estado de salud o bienestar y reduce el riesgo de enfermedad. Esta definición es la que propone el FUFOS (Functional Food Science in Europe), y en ella cabe destacar tres aspectos importantes: (1) el efecto funcional es distinto del nutritivo, (2) debe demostrarse satisfactoriamente y, (3) puede consistir en una mejora de las funciones fisiológicas o en una reducción del riesgo de padecer alguna enfermedad. Esta definición, si bien es amplia debe ir acompañada de ciertas premisas,

entre las que destacan: que el alimento funcional debe ejercer su función en el organismo cuando se ingiere en cantidades normales de consumo, y que debe mantener tanto la estructura como la forma de un alimento. Actualmente, este tipo de alimentos van ganando aceptación en el mercado en muchos países económicamente desarrollados entre los cuales podemos mencionar a E.U.A., Canadá, los países miembros de la Unión Europea, Nueva Zelanda, China, Corea y, por supuesto, Japón (Buttriss, 2000; Shimizu, 2002)

Hacia finales de los años sesenta tanto los científicos orientales como los occidentales comenzaron a investigar los mecanismos por los cuales ciertos hongos tenían efectos positivos sobre la salud. La primera investigación exitosa puso al descubierto los efectos antitumorales de extractos (obtenidos en agua caliente) de varias especies de hongos. Los componentes activos principales encontrados fueron polisacáridos, específicamente β -D-glucanos. También se ha aislado de los basidiocarpos de shiitake (*Lentinula edodes*) un polisacárido antitumoral, soluble en agua que se nombró "lentinan". Éste fue un descubrimiento mayor, dado que lentinan demostró una fuerte actividad antitumoral, previniendo el desarrollo de tumores provocados por virus y compuestos químicos en ratones y otros modelos experimentales de estudio. En 1965, en Japón se desarrolló una preparación muy popular y eficaz a partir del hongo *Trametes versicolor* (conocido previamente como *Coriolus versicolor*). Un polisacárido péptido de este hongo con el nombre de "Krestin" fue aceptado para el uso contra varios tipos de cáncer y fue cubierto por el plan oficial de salud japonés. El Krestin contiene 75% de glucanos y 25% de proteína. En los años 90, este compuesto significó el 25% de las drogas anticáncer en Japón, con ventas por 350 millones de dólares. Un producto similar se desarrolló en China con otra cepa de *Trametes versicolor*, bajo el nombre "peptide" (Curvetto, 2009).

En hongos como *Ganoderma*, *Flammulina*, *Coriolus* y *Pleurotus* se ha encontrado que producen sustancias bioactivas con estructuras únicas, las cuales han mostrado muchos efectos medicinales incluyendo propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Karaman *et al.*, 2010). Muchas de las sustancias bioactivas incluyen fenoles y flavonoides (Barros *et al.*, 2007), ergosterol (Trigos y Suárez-Medellín, 2010) y muchos otros.

3.7 El género *Pleurotus*

Los hongos del género *Pleurotus*, del orden Agaricales, son un grupo muy distribuido en la naturaleza, crecen en partes vivas o muertas de plantas, que son generalmente pobres en nutrientes y vitaminas (Zadrazil, 1978). Son de particular importancia económica pues, varias especies son cultivadas comercialmente debido a su capacidad de formar basidiocarpos de buena calidad organoléptica (Chang, 1984). *Pleurotus ostreatus*, fue cultivado primero por Estados Unidos en 1900, posteriormente fue introducido en la India y Europa. Con el paso de los años, fueron introducidos en el mercado nuevas especies como *P. eryngii*. y *P. florida* en 1958, *P. flabellatus* en 1962, *P. cystidiosus* en 1969, *P. sajor-caju* en 1974, y *P. citrinopileatus* en 1981. Después fueron introducidas al mercado *P. abalonus*, *P. cornucopiae*, *P. djamor*, *P. ëous*, *P. eryngii*, *P. euosmus*, *P. pulmonarius*, *P. sapidus*, *P. smithi*, etc. (Gunde-Cimmerman, 1999; Stamets, 1993).

Puesto que *Pleurotus* spp. puede descomponer lignocelulosa de manera eficiente sin un pretratamiento biológico o químico, una gran variedad de desechos lignocelulósicos son utilizados para su cultivo. Algunos ejemplos de desechos agrícolas probados como sustratos son: zacate buffel, viruta de pino, viruta de encino, tamo de maíz, residuos vitivinícolas, rastrojo de maíz, rastrojo de jícama, rastrojo de haba, rastrojo de fríjol, rastrojo de calabaza, pulpa de café, papel desechado de oficina, paja de trigo, paja de sorgo, paja de cebada, paja de arroz, olote de maíz, lirio acuático, hoja seca de maíz, hojas usadas de canela, hojas de zacate limón, hojas de pimienta, hojarasca de parques y jardines, hoja de caña de azúcar, fibra de coco, cáscara de cacahuate, bagazo de maguey tequilero, bagazo de henequén, bagazo de caña de azúcar, etc. (Mora y Martínez-Carrera, 2007)

3.8 Taxonomía de *Pleurotus* spp.

Se ha estimado la existencia de aproximadamente 250, 000 especies diferentes de hongos en la naturaleza (Herrera y Ulloa, 1990). El género *Pleurotus* según Singer (1978), tenía un total de 39 especies distribuidas en 4 secciones. Aunque Kong (2004), mencionó que se tenían registradas aproximadamente 70 especies. Los hongos *Pleurotus* silvestres están distribuidos por todo el mundo. *P. pulmonarius* y *P. cystidiosus* están distribuidos en la región tropical y subtropical, mientras que *P. eryngii* se recolecta en Europa, África y la mayor parte de Asia,

excepto Corea y Japón, donde el hongo se cultiva comercialmente. *P. ostreatus*, es el hongo comercial más importante dentro del género, está extendido en áreas templadas. La especie es bastante adaptable a gran variedad de climas y sustratos (Kong, 2004).

La taxonomía del género es muy compleja debido a un alto grado de variabilidad morfológica de los basidiocarpos, la cual es atribuida principalmente a factores ambientales, provocando que una misma especie puede ser identificada bajo diferentes nombres. Varios autores han clasificado al género *Pleurotus* por medio de criterios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y genéticos (Anderson *et al.*, 1973; Zervakis *et al.*, 1994), por lo que se ha generado valiosa información sobre la distribución taxonómica.

3.9 Propiedades funcionales de *Pleurotus* spp.

Las setas se han considerado desde hace milenios como remedios medicinales muy utilizados en la medicina popular asiática contra diversas enfermedades y desajustes de la salud. Estudios recientes, han confirmado la presencia de determinados compuestos, con interesantes propiedades bioactivas, que serían las responsables de los efectos beneficiosos para la salud derivados de la ingesta de determinadas setas. *Pleurotus ostreatus* se encuentra en la lista de las 37 especies de hongos utilizados en la medicina tradicional de Mesoamérica y en otras regiones de México (Guzmán, 2000). Okuda *et al.* (1972), afirman que se han aislado polisacáridos antitumorales tanto de *Flammulina velutipes* como de *Pleurotus ostreatus*; en 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 galactosa y manosa. Polisacáridos sulfatados obtenidos de la esclerótica de *Pleurotus tuber-regium* presentan actividad antiviral frente al virus del herpes simple tipo 1 y tipo 2. Además, la vetulina, una proteína aislada de *Flammulina velutipes* y una glicoproteína obtenida a partir del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* causan la inhibición de la transcriptasa inversa en el VIH (Wang y Ng, 2000). Como se muestra en el **cuadro 7**, los hongos pertenecientes al género *Pleurotus*, al igual que otros basidiomicetos producen una serie de biomoléculas con actividades biológicas importantes.

Cuadro 7. Componentes activos con efecto medicinal de Basidiomicetos (Cohen *et al.*, 2002; Lindequist *et al.*, 2005).

Efecto Medicinal	Componentes bioactivos
Antibiótico	Micelio, Polisacáridos
Antibacterial	D-glucanos
Antiviral	Polisacáridos, Proteínas
Inmunomodulación	Polisacáridos, Proteínas-polisacáridos
Antitumoral	D-glucanas, Lectinas
Hipocolesterolémico	Cuerpo fructífero, Lovastatina
Hematológico	Lectinas
Antioxidantes	D-glucanos
Antialérgico	Extractos etanólicos
Antiinflamatorios	Extractos metanólicos

3.9.1 Antioxidantes en *Pleurotus* spp.

Los antioxidantes sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA) y hidroxiltolueno butilado (BHT), se han restringido para su uso en los alimentos, ya que se sospecha que pueden ser cancerígenos. Por lo tanto, los compuestos de origen natural que poseen el potencial antioxidante se proponen como una excelente opción. Una fuente de origen natural se encuentra en las setas, las cuales poseen fenoles que son muy eficaces eliminando radicales peróxido. Los compuestos fenólicos en las setas son excelentes antioxidantes y sinergistas, y no son mutagénicos. Se ha encontrado que los extractos de metanol de *Pleurotus florida* poseen capacidad potente para la eliminación de los radicales hidroxilo y la inhibición de las actividades de la peroxidación de lípidos, también los extractos de *P. ostreatus* han protegido a los principales órganos como el hígado, corazón y cerebro de ratas de edad avanzada contra el estrés oxidativo (Jayakumar *et al.*, 2009). Pornariya y Kanok-Orn (2009), reportaron que extractos de *P. ostreatus* presentaron una actividad antioxidante eficaz sobre la reducción del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), señalando a los fenoles totales como responsables de dicha actividad. Por otra parte, Fu y Shieh (2001), reportaron que los extractos de hongos comestibles que poseían una mayor concentración de fenoles totales presentaban una mayor actividad antioxidante en pruebas realizadas con radicales libres.

Los compuestos fenólicos son poderosos antioxidantes y, poseen la capacidad de eliminación de radicales libres debido a sus grupos hidroxilo (Jayakumar *et al.*, 2009). En un estudio realizado por Jayakumar *et al.* (2009), reportaron que el contenido de fenoles totales de *P.*

ostreatus fue el más alto con 54.90 mg equivalentes de ácido gálico/g, en comparación con los valores reportados en otros hongos, tales como *Auricularia auricula* (3.20-8.72 mg equivalentes de ácido gálico/g), *Coriolus versicolor* (23.28 mg equivalentes de ácido gálico/g), *Ganoderma lucidum* (47.25 mg equivalentes de ácido gálico/g), *Ganoderma tsugae* (51.28 mg equivalentes de ácido gálico/g) y *Ganoderma lucidum* (antler) (55.96 mg equivalentes de ácido gálico/g), señalando que la actividad antioxidante del extracto de *P. ostreatus* se debe a su alto contenido de compuestos fenólicos, manifestándose en la capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica, la captura de hidroxilos y radicales superóxido, reducción en la potencia y actividad quelante de los iones ferrosos. Los autores concluyen que el extracto etanólico del hongo *P. ostreatus* podría servir como un elemento de fácil acceso a alimentos ricos en antioxidantes naturales, como complemento alimenticio o incluso como un agente farmacéutico (Jayakumar *et al.*, 2009).

3.9.2 Propiedades antimicrobianas de *Pleurotus* spp.

En hongos como *Ganoderma*, *Flammulina*, *Coriolus* y *Pleurotus* se ha encontrado que producen sustancias bioactivas con estructuras únicas, las cuales han mostrado muchos efectos medicinales incluyendo propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Karaman *et al.*, 2010).

En *Pleurotus ostreatus* se ha observado actividad antimicrobiana. Así, estudios realizados por Beltrán-García *et al.* (1997), demostraron que compuestos volátiles extraídos del cuerpo fructífero como 3-octanona, 3-octanol, 1-octen-3-ol, benzaldehído, 1-octanol, ácido benzoico y un componente sin identificar soluble en cloroformo, poseían una fuerte actividad antibacteriana frente a *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Además, a partir del cuerpo fructífero de este hongo también se ha extraído un péptido con capacidad antifúngica, denominado pleurostrin que inhibe el crecimiento del micelio de los hongos *Fusarium oxysporum*, *Mucosphaerella arachidicola* y *Physalospora piricola* (Chu *et al.*, 2005). En este sentido, a partir del cuerpo fructífero de *Pleurotus eryngii* también se ha aislado otro péptido antifúngico denominado erygin que inhibe el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Mucosphaerella arachidicola* (Wang y Ng, 2004). Gbolagade y Kigigha (2007), realizaron estudios *in vitro*, donde analizaron los efectos antagonicos de

extractos crudos, obtenidos con metanol y extracto purificado (se logró la purificación del extracto, obteniendo la parte acuosa de éste y posteriormente se hizo una extracción más con acetato de etilo) de un grupo selecto de macromicetos nigerianos, contra microorganismos patógenos (*Bacillus cereus*, *E. coli*, *Kleibseilla pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*). El halo de inhibición mayor fue de 24 mm y se obtuvo con el extracto purificado de *Polyporus giganteus*, contra *E. coli*, en comparación del extracto crudo, que brindó un halo de inhibición de 20 mm. El halo de inhibición proporcionado por el extracto purificado de *Pleurotus florida* contra *K. pneumoniae* fue de 22 mm, mientras que el extracto crudo ofreció un halo de 20 mm. *Pleurotus tuber-regium* fue el único macromiceto de los evaluados, que inhibió el crecimiento de *P. aeruginosa*, con un halo de inhibición de 8 mm con el extracto crudo, y no hubo halo de inhibición con el extracto purificado. Se observó, que *Pleurotus florida* y *Termitomyces microcarpus* brindaron el mayor halo de inhibición frente a *S. aureus*, (18 mm del extracto puro y 16 mm del crudo).

3.10 Métodos de extracción

Existen 3 métodos de extracción para aislar principios activos, dentro de los más importantes se encuentran los siguientes: 1) Extracción mecánica, la cual permite obtener los principios activos disueltos en los fluidos propios del material biológico, resultando un “jugo”. Las formas por las que se obtiene este “jugo” son: exprimiendo el material vegetal, aplicando calor y por incisión (recuperación de los exudados de la planta); 2) Destilación, es una técnica que se basa en la diferente polaridad de los principios activos de la planta, lo que permite la separación de los componentes volátiles de otros no volátiles, ejemplos de este método lo son las destilaciones por arrastre de vapor o hidrodestilaciones y 3) Extracción con solventes, consiste en separar los principios activos al ponerlos en contacto con un solvente o una mezcla de ellos capaz de solubilizar dichos principios. Estos deben pasar al disolvente de manera que se obtenga un extracto líquido y un residuo. La extracción con solventes puede dividirse en dos grupos: la continua (Soxhlet) y la discontinua (macerados), los solventes utilizados comúnmente son agua, alcoholes, acetona y éter petróleo (Kuklinski, 2003)

3.10.1 Extracción continua o progresiva (Soxhlet)

Se caracteriza porque el solvente se va renovando o recirculando y actúa sobre el material biológico en una sola dirección. Mediante estos procedimientos se puede obtener prácticamente la extracción completa de los principios activos (Sharapin *et al.*, 2000). Ejemplos de este tipo de extracción son la percolación o lixiviación y Soxhlet

- Percolación o lixiviación: el procedimiento de percolación se lleva a cabo mediante una lluvia del disolvente de manera tal que llegue a toda la masa, pero sin llenar todos los espacios vacíos existentes entre la materia prima. En este sistema el disolvente envuelve a todas las partículas de la materia prima con una película del líquido en continuo recambio (Trevejo-Chávez y Maury, 2002).
- Soxhlet: el equipo consta de tres partes fundamentales: un refrigerante, un cuerpo extractor y un balón. En el balón se lleva a cabo la ebullición del solvente, sus vapores ascienden hasta el refrigerante donde se condensan. El condensado cae sobre la muestra, contenida en un cartucho y colocada previamente en el cuerpo extractor, y la macera hasta que el cuerpo extractor se llena y el extracto sifonea por el tubo lateral, para desembocar en el balón evaporador. Esta operación se repite sucesivamente. El solvente se va reciclando y los principios activos se van concentrando en el balón inferior (Kuklinski, 2003).

3.10.2 Extracción discontinua o simultánea (macerado)

En esta extracción, la totalidad del material biológico se sumerge en el solvente, por lo que la difusión de los principios activos se producirá en todas las direcciones hasta alcanzar el equilibrio entre la concentración del solvente y del residuo (Kuklinski, 2003). Ejemplos de este tipo de extracción son maceración, digestión, infusión y decocción.

Maceración

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretende extraer. Este proceso genera dos productos, el sólido ausente de esencias y el extracto. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada, así como del líquido de

extracción (Fernaroli's, 1975). Existen dos métodos de maceración de acuerdo a la temperatura:

- Maceración en frío: consiste en sumergir el producto a macerar en un recipiente con la cantidad suficiente de solvente para cubrir totalmente lo que se desea macerar. Esto se lleva a cabo en un lapso de tiempo, dependiendo de la materia prima que se vaya a macerar. Las ventajas de la maceración en frío consisten en la utilización de equipos simples que requieren mínimas cantidades de energía y la capacidad de extraer la mayoría de las propiedades de lo que se macera (dependiendo del solvente), prácticamente en su totalidad sin alterarla por efectos de temperatura (Fernaroli's, 1975)
- Maceración con calor: consisten en el contacto entre las fases, el producto a macerar y el solvente, con la diferencia de la variación de la temperatura, en este caso pueden variar las condiciones de maceración. El tiempo que se desea macerar varía mucho de la maceración en frío ya que al utilizar calor se acelera el proceso. La desventaja de la maceración en calor es que no logra extraer totalmente pura la esencia del producto, ya que regularmente destruye algunas propiedades, es decir, muchas veces se trata de compuestos termolábiles que se ven afectados por la temperatura, sin mencionar el consumo energético que dicho proceso implica (Fernaroli's, 1975).

4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Las enfermedades crónico-degenerativas son la principal causa de muerte tanto en México como en el mundo. Estos son padecimientos que se asocian regularmente con la edad, el envejecimiento y de forma importante con la alimentación. Estudios más recientes, con una mayor base científica, han confirmado la presencia de determinados compuestos con interesantes propiedades bioactivas, que serían los responsables de los efectos beneficiosos para la salud derivados de la ingesta de determinados hongos comestibles. Los hongos comestibles se han considerado desde hace milenios como remedios medicinales muy utilizados en la medicina popular asiática contra diversas enfermedades y desajustes de la salud. Muchas enfermedades como el cáncer, la arterioesclerosis, las cardiovasculares y otras enfermedades degenerativas están asociadas a procesos oxidativos que pueden llevar a la muerte celular. Se ha demostrado que si se produce un desequilibrio puede causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y ADN.

Muchos estudios demuestran la existencia de una relación inversa entre la ingesta de frutas y hortalizas, ricas en antioxidantes, y la incidencia de enfermedades. Recientemente, los hongos han llegado a ser principalmente una atractiva comida funcional debido a la capacidad antioxidante de los hongos sobre los radicales libres y, a sus propiedades medicinales. Actualmente, entre el 80 y 85% de todos los productos medicinales derivados de los hongos provienen de los cuerpos fructíferos, los cuales son producidos comercialmente o colectados de manera silvestre. Aun así, el número de especies de macromicetos investigados es relativamente bajo, considerando el conocimiento del gran potencial de los micromicetos para la producción de fármacos, la experiencia en el uso etnomedicinal de los hongos superiores y la capacidad ecológica de estos organismos para producir metabolitos secundarios bioactivos (Chang y Miles, 2004). Lo anterior permite asumir que los diferentes géneros de hongos comestibles poseen propiedades antimutagénicas, antibacterianas, antitrombóticas, hipocolesterolémicas, hipolipidémicas y antioxidantes las cuales están relacionadas con sustancias presentes (compuestos bioactivos) en los cuerpos fructíferos, como ésteres, ácido linoléico y oléico, proteínas, enzimas, polisacáridos y compuestos fenólicos.

Hasta ahora las investigaciones de las setas comestibles nativas de México se han centrado en el valor nutritivo, los métodos de producción intensiva, la identificación de especies por métodos moleculares, estudios enzimáticos, etc., sin embargo, hay relativamente poca información con respecto a las propiedades funcionales (antioxidantes y antibacterianas) de los hongos comestibles del género *Pleurotus* y, sería una opción de alimentación saludable tanto para las familias mexicanas que los consumen, como para los propios productores (autoconsumo), promoviendo más su cultivo y comercialización a nivel regional como nacional.

5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La especie silvestre de *Pleurotus levis* proveniente de zonas rurales de México y la cepa comercial *Pleurotus ostreatus*, presentan propiedades antioxidantes y antibacterianas.

Objetivo general

Determinar las propiedades antioxidantes y antibacterianas de la cepa silvestre *Pleurotus levis* y la cepa comercial *Pleurotus ostreatus* cultivadas en México.

Objetivos particulares

- Comparar las propiedades antioxidantes en los diferentes extractos obtenidos de *Pleurotus levis* y *Pleurotus ostreatus*.
- Determinar la actividad antibacteriana en los diferentes extractos obtenidos de *Pleurotus levis* y *Pleurotus ostreatus*.
- Desarrollar una estrategia para el aprovechamiento de los recursos genéticos nativos de *Pleurotus levis*, con base en sus propiedades funcionales y potencial de cultivo a nivel de pequeña y gran escala para los productores de la Región de Puebla.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Medicinales y Funcionales y en el módulo experimental, de las instalaciones del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. El diagrama general de trabajo que se siguió en la presente investigación se muestra en la **figura 4**.

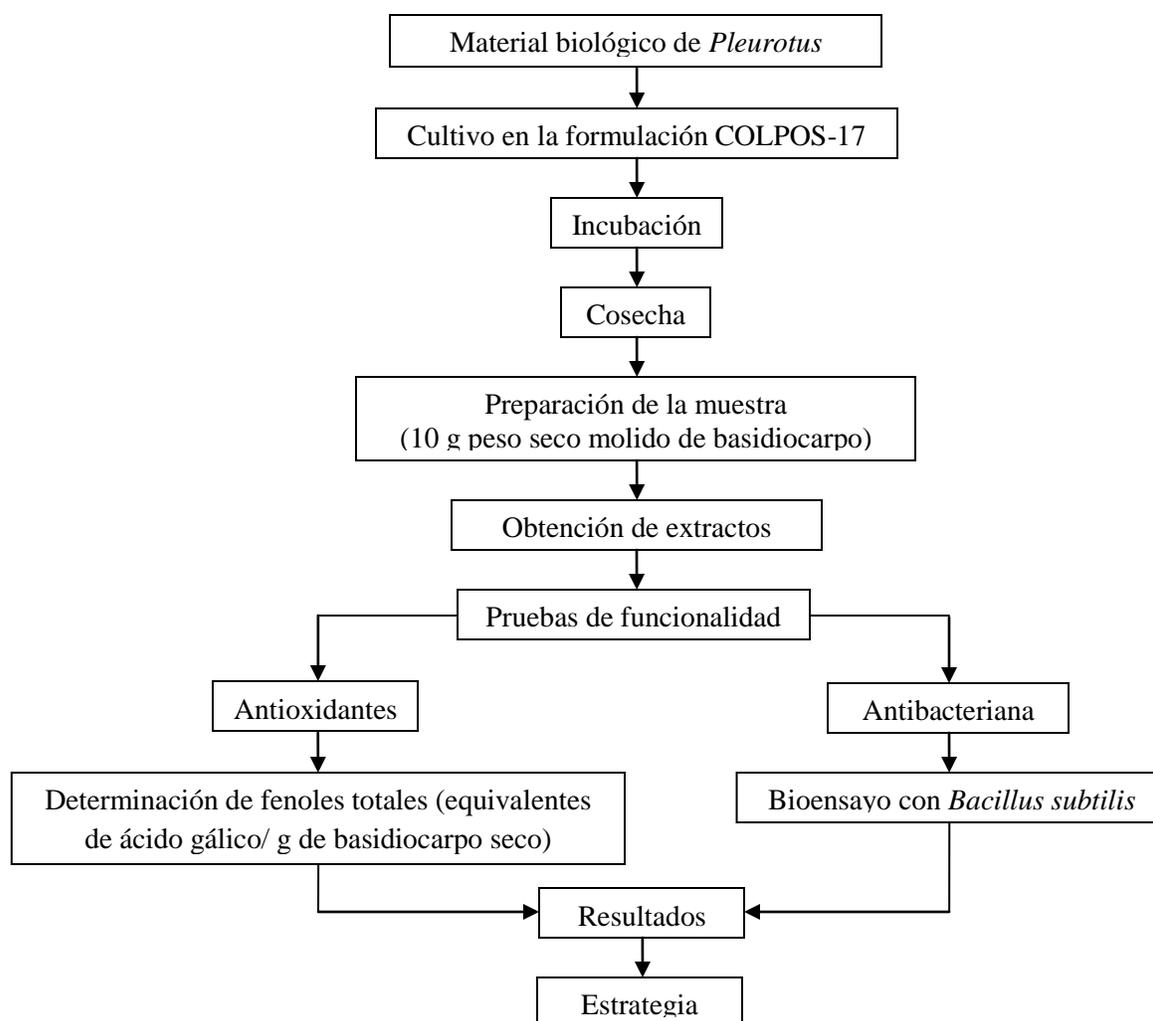


Figura 4. Diagrama general de trabajo realizado en la presente investigación.

6.1 Material biológico

Las cepas estudiadas se encuentran depositadas en el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CREGENHCFyM) del COLPOS, *Campus* Puebla. En el **cuadro 8** se enlista el material biológico utilizado en la presente investigación.

Cuadro 8. Material biológico (MB) depositado en el CREGENHCFyM empleado para la cuantificación de fenoles totales y evaluación de la actividad antibacteriana.

Material biológico	Cepa	Origen
I. Hongos comestibles		
<i>Pleurotus levis</i> (Berk. y M.A. Curtis) Singer	CP-30	México
<i>Pleurotus ostreatus</i> (jacq.) P. Kumm	CP-50	Alemania
II. Bacteria		
<i>Bacillus subtilis</i> (Nakamura) ATCC 6633	CPB-9	ATCC

CPB= Colegio de Postgraduados, sección bacterias. ATCC= American Type Culture Collection.

Las cepas de hongos comestibles utilizadas en la presente investigación fueron identificadas molecularmente en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Medicinales y Funcionales (Morales *et al.*, 2010).

6.2 Biotecnología del cultivo de las cepas de hongos comestibles

Las cepas de *Pleurotus* se mantuvieron y sembraron en el laboratorio en medio de cultivo PDA (Sobal *et al.*, 2007). Para su cultivo se preparó el “inóculo”, siguiendo la metodología propuesta por Martínez-Carrera *et al.* (1988), y la elaboración de la formulación COLPOS-17 se preparó de acuerdo a Sobal *et al.* (2010). Los sustratos inoculados se incubaron a una temperatura máxima de 25°C y una mínima de 15°C. Cuando el micelio de las cepas colonizó completamente los sustratos y se observó la presencia de primordios, las bolsas se trasladaron al módulo experimental para su fructificación en condiciones apropiadas de humedad, temperatura, luz diurna indirecta, y aireación. Se realizaron 4 réplicas por cada cepa. El peso seco y pH del sustrato se determinaron de acuerdo a las metodologías utilizadas en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles Medicinales y Funcionales del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. Se describió la forma, color, olor, y textura de los hongos frescos, el tipo de estípite y su píleo (Corner, 1981). Se usaron las cartas de color marca Pantone (2011), para referir el color de los hongos producidos. La eficiencia biológica (EB) y tasa de producción (TP) se calcularon de acuerdo a Royse (1985), en donde, la eficiencia biológica es el resultado del peso fresco de carpóforos producidos entre el peso seco del sustrato utilizado al momento de la inoculación, multiplicado por 100. La tasa de producción fue el resultado de dividir la eficiencia biológica y el ciclo total de producción (días). También

se evaluaron los periodos de: colonización del sustrato, aparición de los primordios y, obtención de la última cosecha (días).

6.3 Obtención de los extractos de las cepas en estudio

Se le dio mayor importancia a la cepa CP-30 de *P. levis* por ser un hongo nativo y por presentar características morfológicas como tamaño, forma, color y olor diferentes a *P. ostreatus*. Se compararon las propiedades funcionales que presentaron todos los extractos de la cepa CP-30 de *P. levis* con dos extractos de la cepa CP-50 de *P.ostreatus*. En la **figura 5** se muestra el proceso para la obtención de los extractos.

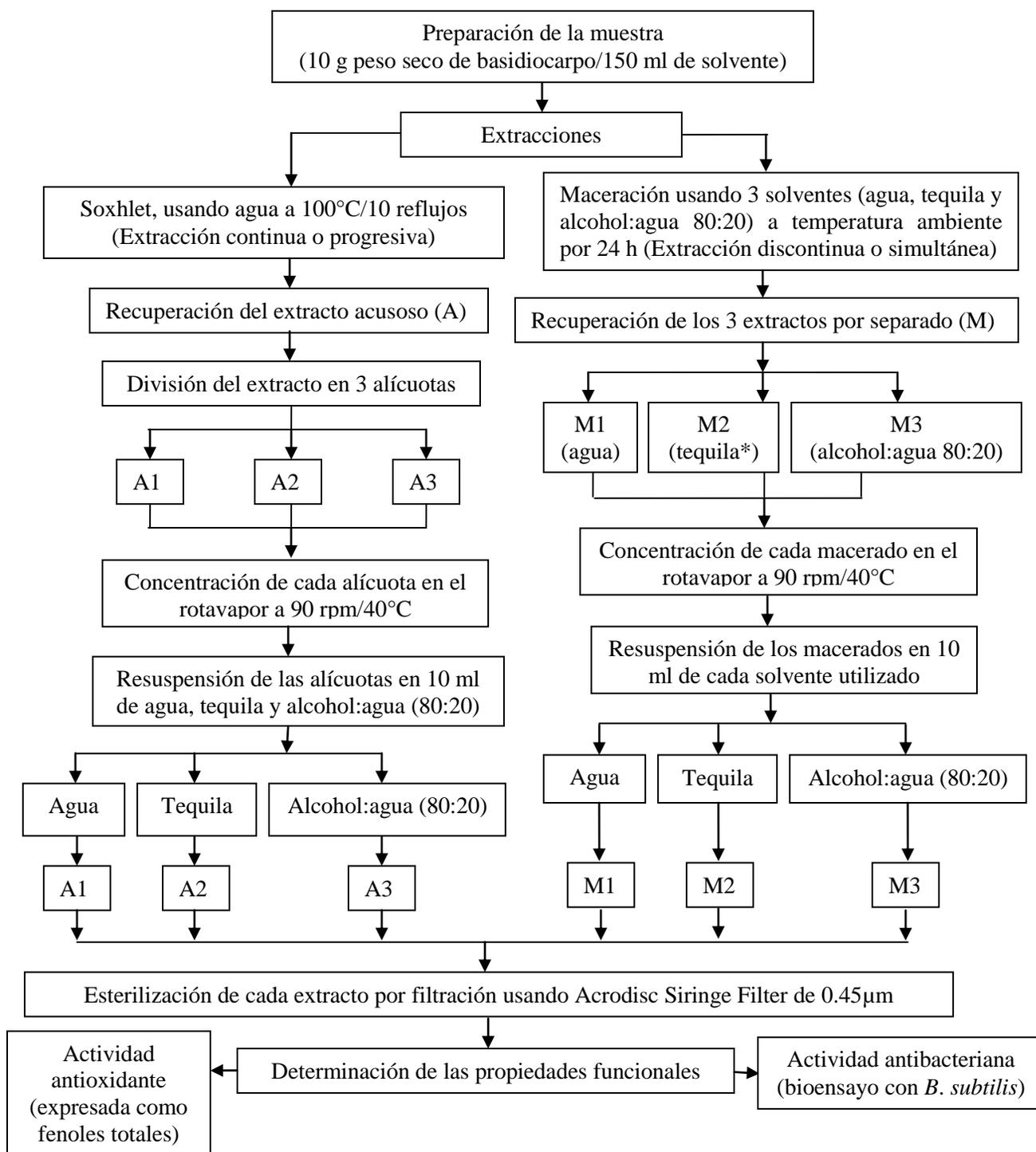


Figura 5. Procedimiento para la obtención de los extractos por Soxhlet (continua o progresiva) y por maceración (discontinua o simultánea) de los hongos comestibles del genero *Pleurotus*.

*Marca comercial® (tequila blanco 100 años).

Obtención de la muestra

Los basidiocarpos se cosecharon, pesaron y cortaron, posteriormente se secaron en un horno (FELISA, USA) a 40°C por 76 h. Después los basidiocarpos se molieron en una licuadora (Osterizer, México) por 60 segundos, y de cada muestra molida, se tomaron 10 g y se colocaron dentro de un sobre de papel filtro perfectamente sellado. Se colocó en un desecador en la obscuridad a temperatura ambiente hasta su uso. La **figura 6** muestra de manera resumida la biotecnología del cultivo de los hongos y la obtención de la muestra.

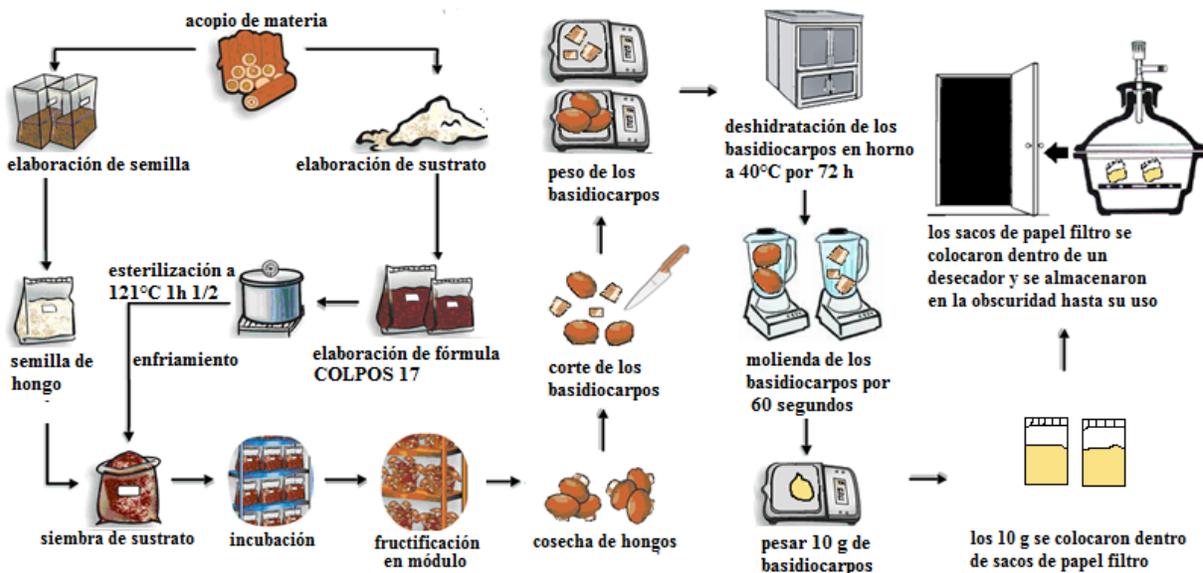


Figura 6. Obtención de la muestra a partir de los basidiocarpos cosechados de las cepas de *Pleurotus*.

Obtención del extracto acuoso usando el equipo Soxhlet

La muestra seca contenida dentro del sobre de papel filtro (10 g) se colocó en 150 ml de agua destilada estéril a ebullición constante en el Soxhlet (PC 1500- 6x6) hasta los 10 reflujos. Después el extracto fue dividido en tres alícuotas iguales y cada fracción del extracto fue colocada en un matraz de bola de fondo plano y colocado en un evaporador rotatorio (HAHNVAPOR, modelo HS: 2000NS) a 90 rpm a 40°C hasta obtener una microemulsión (aproximadamente de 1 ml). Cada matraz con la microemulsión se tapó y guardó a 4°C para su conservación por un tiempo máximo de 24 h (**Figura 7**).



Figura 7. Obtención de extracto acuoso a partir de los basidiocarpos.

Obtención del extracto por maceración

La muestra seca contenida dentro del sobre de papel filtro (10 g) fue colocada dentro de un frasco estéril de vidrio con tapa y se le agregó 150 ml del solvente a utilizar (agua destilada estéril, tequila blanco “100 años” o alcohol:agua 80:20) y se dejó reposar por 24 h. Después el extracto se transvasó a un matraz de bola de fondo plano y se colocó en un evaporador rotatorio a 90 rpm a 40°C hasta obtener una microemulsión de aproximadamente de 1 ml. El matraz con la microemulsión se tapó y guardó a 4°C para su conservación por 24 h. Para facilitar el manejo de los datos se estableció una nomenclatura para nombrar a las resuspensiones de acuerdo a su método de extracción y a los disolventes (**Cuadro 9**).

Cuadro 9. Nomenclatura de los extractos usados para evaluar las propiedades funcionales.

Clave	Disolvente utilizado para la extracción	Método de extracción	Disolvente utilizado para la resuspensión	Descripción
A1	Agua	Soxhlet	Agua	Extracto acuoso resuspendido en agua
A2	Agua	Soxhlet	Tequila	Extracto acuoso resuspendido en tequila
A3	Agua	Soxhlet	Alcohol:agua 80:20	Extracto acuoso resuspendido en alcohol:agua 80:20
M1	Agua	Maceración	Agua	Macerado agua resuspendido en agua
M2	Tequila*	Maceración	Tequila	Macerado tequila resuspendido en tequila
M3	Alcohol:agua 80:20	Maceración	Alcohol:agua 80:20	Macerado alcohol:agua 80:20 resuspendido en alcohol:agua 80:20

*Marca comercial®.

Preparación de el disolvente alcohol:agua [80:20]

Por cada 100 ml del disolvente alcohol:agua [80:20] se agregaron 80 ml de alcohol (Fermont) y 20 de agua.

Resuspensión de los extractos concentrados

Una vez concentrados los extractos, éstos fueron resuspendidos en diferentes disolventes. Como disolventes se emplearon agua destilada estéril, tequila blanco “100 años” y

alcohol:agua a concentración [80:20]. De esta forma, se obtuvieron 8 resuspensiones, de las cuales dos pertenecieron a la cepa CP-50 y seis correspondieron a la cepa CP-30.

Esterilización por filtración de los extractos resuspendidos

En condiciones de esterilidad, se tomó con una jeringa 10 ml de cada extracto y se esterilizaron por filtración con un Acrodisc® Syringe Filter 0.45µm HT Tuffryn® Membrane Low Protein Binding Non-Pyrogenic PN 4184. El extracto estéril se colocó en un tubo Falcon estéril con rosca y se guardó en refrigeración a 4°C hasta su uso.

6.4 Determinación de las propiedades funcionales de los extractos

La concentración de fenoles totales y la actividad antibacteriana fueron evaluadas a partir de extractos obtenidos de las cepas CP-30 de *P. levis* y CP-50 de *P. ostreatus*. Los extractos de la cepa CP-30 de *P. levis* fueron obtenidos por Soxhlet (A1, A2 y A3) y por maceración (M1, M2 y M3); mientras que, los extractos de la cepa CP-50 de *P. ostreatus* sólo se obtuvieron por maceración usando agua y tequila (M1 y M2).

6.4.1 Método para fenoles totales

Los fenoles totales se determinaron de acuerdo al método modificado de Müller *et al.*, (2010). La metodología se definió en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles Medicinales y Funcionales del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. Se evaluó la concentración de fenoles totales de todos los extractos obtenidos de los hongos.

Los reactivos utilizados se prepararon de la siguiente manera (Müller *et al.*, 2010):

- **Reactivo Folin-Ciocalteu**

Se tomó 1 ml del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) y se depositó en un matraz aforado de 10 ml previamente cubierto con aluminio y se aforó con agua destilada estéril. La solución se guardó a temperatura ambiente hasta su uso.

- **Solución stock de ácido gálico**

Se pesaron 0.01 g de ácido gálico (Meyer) y se predisolvieron con 1 ml de alcohol, la dilución fue aforada a 10 ml con agua destilada. Posteriormente, se guardó en un tubo de ensaye cubierto de aluminio hasta su uso.

- **Carbonato de sodio**

Se pesaron 7.5 g de Na₂CO₃ (BAKER) y se predisolvieron en 10 ml de agua destilada, posteriormente, se aforaron en 100 ml de agua destilada y se guardó a temperatura ambiente

Método de dilución para los extractos acuosos y macerados

La oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 740 nm, esta coloración se cuantificó por espectrofotometría usando una curva patrón de ácido gálico. Debido a lo anterior y a la naturalidad de los extractos de presentar color ya sea claro o fuerte fue necesario realizar diluciones de cada extracto para poder cuantificarlos. Después de obtener los volúmenes totales de las diluciones de todos los extractos, estos se ajustaron a un volumen de 1000 µl para una uniformidad en los datos. Por ejemplo, en el extracto M3 se obtuvo un volumen total de dilución de 1500 µl y se realizó el ajuste a 1000 µl de la siguiente manera:

$$\begin{array}{r}
 \begin{array}{c}
 250 \mu\text{l de} \\
 \text{extracto} \\
 X \\
 \hline
 166.66 \mu\text{l de extracto}
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{c}
 1500 \mu\text{l volumen} \\
 \text{total} \\
 1000 \mu\text{l ajuste} \\
 \text{de volumen} \\
 \hline
 833.33 \mu\text{l de disolvente}
 \end{array}
 \quad
 +
 \quad
 \begin{array}{c}
 1250 \mu\text{l de} \\
 \text{disolvente} \\
 X \\
 \hline
 833.33 \mu\text{l de disolvente}
 \end{array}
 \quad
 =
 \quad
 \begin{array}{c}
 1500 \mu\text{l volumen} \\
 \text{total} \\
 1000 \mu\text{l ajuste de} \\
 \text{volumen} \\
 \hline
 1000 \mu\text{l volumen total} \\
 \text{ajustado}
 \end{array}
 \end{array}$$

En el **cuadro 10** se observa las diluciones y los resultados de los ajustes, realizados a cada extracto.

Cuadro 10. Diluciones realizadas para cuantificar los fenoles totales presentes en los extractos.

Cepa	Clave	Dilución	Factor de dilución	Volumen de dilución		Volumen total de dilución	Ajuste a 1000 µl	
				Extracto	Disolvente		Extracto	Disolvente
		Sin dilución	x1	250 µl	----	-----	-----	-----
		1:1	x2	250 µl	250 µl	500 µl	-----	-----
CP-30	M3	1:5	x6	250 µl	1250 µl	1500 µl	166.66 µl	833.33 µl
	A1	1:5	x6	250 µl	1250 µl	1500 µl	166.66 µl	833.33 µl
	A2	1:10	x11	250 µl	2500 µl	2750 µl	90.90 µl	909.09 µl
	A3	1:10	x11	250 µl	2500 µl	2750 µl	90.90 µl	909.09 µl
	M2	1:20	x21	250 µl	5000 µl	5250 µl	47.61 µl	952.38 µl
CP-50	M1	1:40	x41	250 µl	10 000 µl	10 250 µl	24.39 µl	975.60 µl
	M2	1:10	x11	250 µl	2500 µl	2750 µl	90.90 µl	909.09 µl
	M1	1:40	x41	250 µl	10 000 µl	10 250 µl	24.39 µl	975.60 µl

6.4.1.1 Curva de calibración con ácido gálico

Preparación de soluciones estándar de ácido gálico

La curva de calibración se llevó a cabo por el método modificado de Müller *et al.*, (2010). De la solución stock de ácido gálico (0.01 g/10 mL), se tomaron con una micropipeta (FINNPIPETTE, USA) 250, 500, 1000, 1500 y 2000 μ l de la solución, y se colocaron en matraces aforados de 10 ml, aforándolos con agua destilada. Las concentraciones fueron de 0, 25, 50, 100, 150 y 200 mg/L, respectivamente. Las soluciones se guardaron en tubos de ensaye cubiertos con papel aluminio, hasta su uso.

Obtención de la curva de calibración por colorimetría en microplaca

Los 96 pozos de la microplaca (Vacutest, Kima) están marcados como lo muestra la **figura 8**. Las letras de la A hasta la H son columnas y, los números del 1 al 12 son las filas. En los pozos A1, B1 y C1 se agregaron 200 μ l de agua destilada (blanco), para la concentración 0 mg/L de ácido gálico, se colocaron 20 μ l de agua destilada en los pozos A2, B2 y C2. Posteriormente, a los pozos A3, B3 y C3 se agregaron 20 μ l de la concentración de 25 mg/L, repitiendo lo mismo con las distintas concentraciones de 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L de ácido gálico. Después a los pozos se les agregaron 100 μ l del reactivo Folin-Ciocalteu y, por último 75 μ l de carbonato de sodio. La reacción se incubó por 2 h a temperatura ambiente en condición de obscuridad y, posteriormente se midió a 740 nm en un lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) (**Anexo 1**).

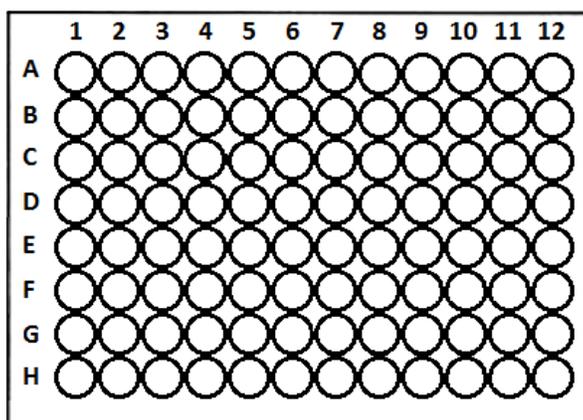


Figura 8. Distribución espacial de los 96 pozos de la microplaca (Vacutest, Kima).

6.4.1.2 Cuantificación de fenoles totales

El reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965), se utilizó para medir la cantidad de compuestos fenólicos totales en cada extracto obtenido de basidiocarpos del hongo. El número de grupos-OH que es potencialmente oxidable en cada extracto crea un cambio de color de amarillo a azul. En esta investigación se modificó el protocolo de Müller *et al.*, (2010), para trabajar en una microplaca de 96 pozos. De cada extracto se hizo por cuadruplicadas muestras y blancos. Primero, se adicionaron 20 µl de cada uno de los extractos a estudiar en los pozos A1, B1, C1, D1 hasta A9, B9, C9, D9. Posteriormente, se adicionó a todos los pozos A1, B1, C1 D1, E1, F1, G1 H1 hasta A9, B9, C9 D9, E9, F9, G9 H9 100 µl del reactivo Folin-Ciocalteu e, inmediatamente 75 µl de la solución de carbonato de sodio. La reacción permaneció 2 h en obscuridad a temperatura ambiente y posteriormente se adicionaron a los blancos (E1, F1, G1, H1 hasta E9, F9, G9. H9) 20 µl de extracto acuoso, alcohólico o macerado. Se midió la densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda de 740 nm en un lector de microplacas (**Anexo 2**). El procedimiento general para la cuantificación de los compuesto fenólicos totales se muestra en la **figura 9**.

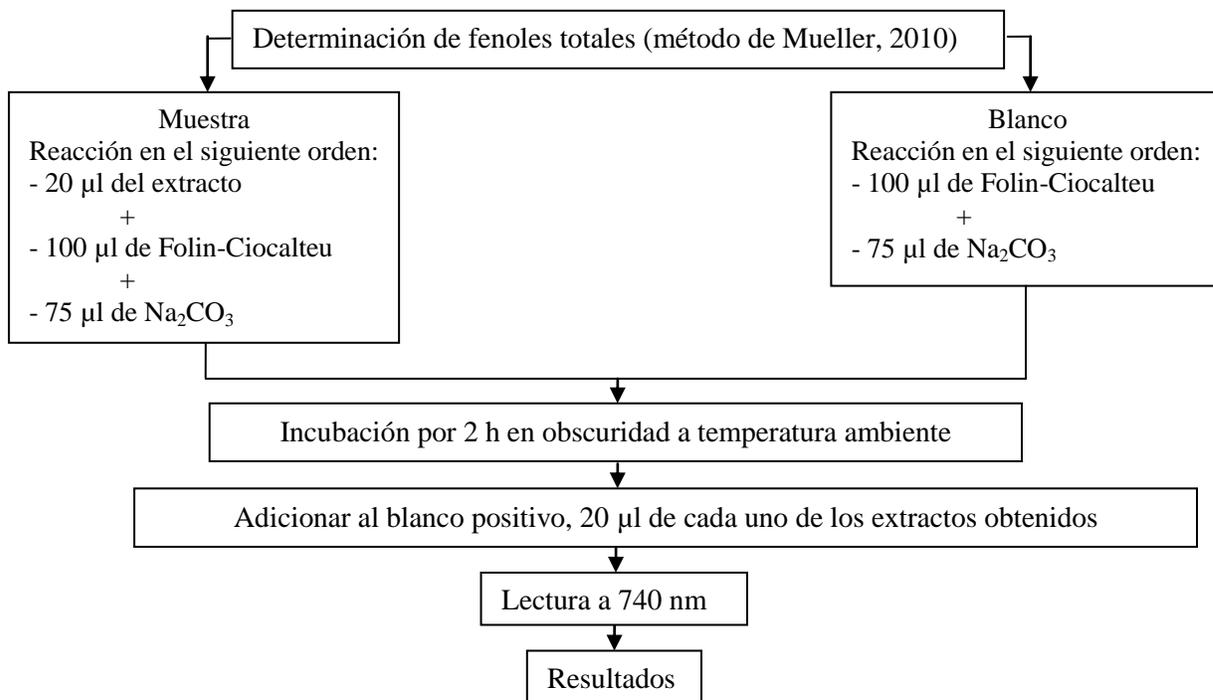


Figura 9. Determinación de fenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico de los extractos obtenidos con las cepas CP-30 y CP-50.

Cálculos para la determinación de la concentración de fenoles totales

Para conocer la concentración del extracto se utilizaron las diferentes concentraciones de ácido gálico (0 a 200 mg/L). Se obtuvo curva patrón y, a partir de ésta se hizo la regresión lineal obteniendo la siguiente ecuación:

$$Y = 0.0065x + 0.0521 \text{ (ecuación 1)}$$

Para conocer la concentración de los extractos se despejo la ecuación 1 obteniendo:

$$X = \frac{Y - 0.0521}{0.0065} \text{ (ecuación 2)}$$

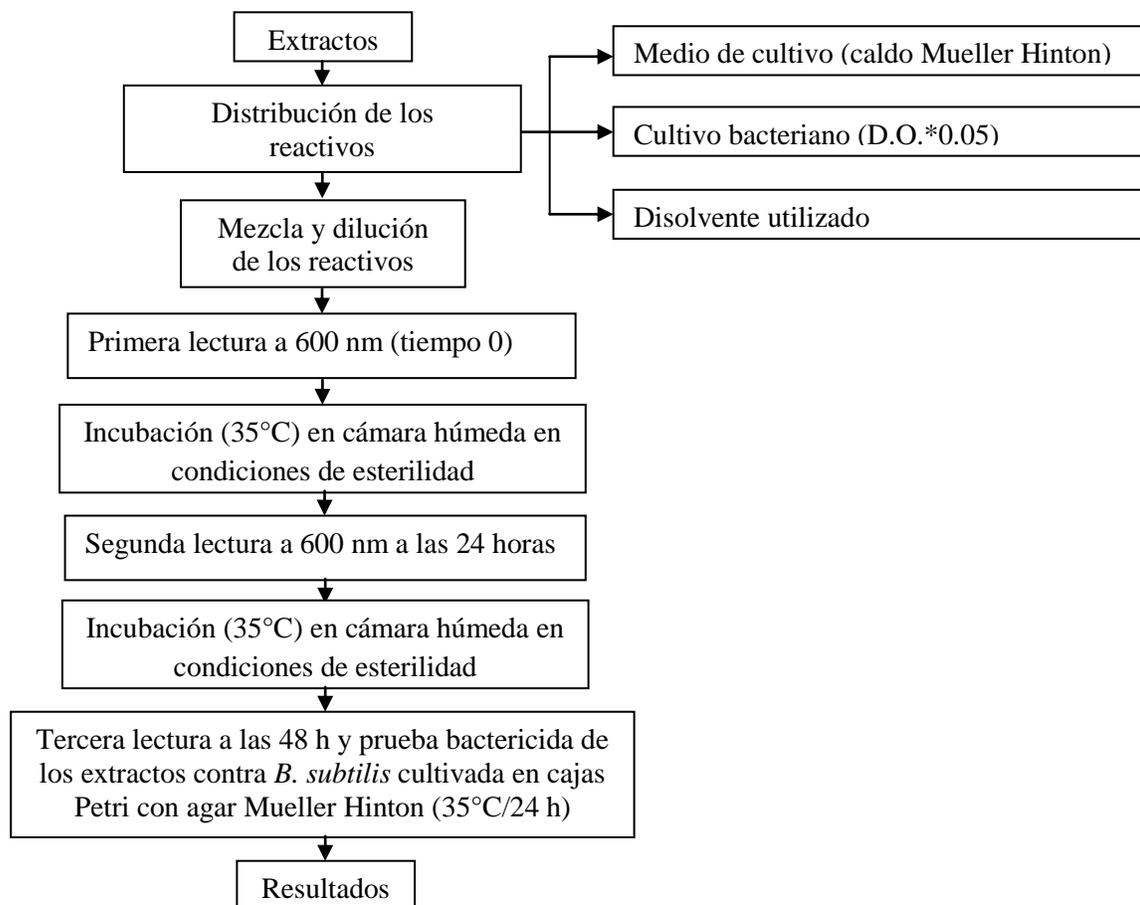
Donde, “Y” es el valor de la absorbancia y ”X” es la concentración de fenoles totales. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por 10 g de hongo seco. Posteriormente, para conocer la concentración de los fenoles totales de cada extracto, se multiplicaron por su factor de dilución.

$$X * FD$$

Donde, FD es el factor de dilución. Por último, se dividió cada concentración entre 10 para obtener los mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de hongo seco.

6.4.2 Prueba de la actividad antibacteriana

La metodología se definió en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Medicinales y Funcionales del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. Se evaluó la actividad antibacteriana de todos los extractos obtenidos de los hongos (**Figura 10**).



* Densidad óptica.

Figura 10. Bioensayo con los extractos estériles de los hongos comestibles contra *B. subtilis*.

La preparación de los reactivos utilizados se describe a continuación:

- **Gelosa especial**

Se resuspendieron 1.5 g de extracto de carne ((BIOXON) en 1000 ml de agua destilada estéril y se suplementó con 40 g de base agar sangre (BIOXON) y, 2.5 g de peptona de caseína (BIOXON). La mezcla se calentó hasta ebullición y se esterilizó a 121°C durante 20 min. Posteriormente, la gelosa se vertió en tubos de ensaye estériles con rosca y se dejó que solidificara. Por último, al medio de cultivo se le hizo la prueba de esterilidad colocándolos dentro de una incubadora a 35°C por 24 horas previo a su uso.

- **Agar Mueller Hinton**

Se suspendieron 38 g de Agar Mueller Hinton (Bioxon) en 1000 ml de agua, se calentó hasta ebullición y, se esterilizó a 121°C durante 20 min. Posteriormente, el medio se vertió en cajas Petri de 5 cm de diámetro y se dejó solidificar. También a las cajas Petri con medio se les hizo

la prueba de esterilidad colocándolos dentro de una incubadora a 35°C por 24 h previo a su uso.

- **Caldo Mueller Hinton**

Se suspendieron 21 g de caldo Mueller Hinton (DIFCO) en 1000 ml de agua, se calentó hasta la ebullición y se esterilizó a 121°C durante 20 minutos. Finalmente, se dejó enfriar y se guardó a temperatura ambiente hasta su uso.

- **Solvente tequila***

En condiciones de esterilidad, se tomaron 10 ml tequila con una jeringa y se esterilizó por filtración con un Acrodisc® Syringe Filter 0.45µm HT Tuffryn® Membrane Low Protein Binding Non-Pyrogenic PN 4184, el contenido se guardó en un matraz Erlenmeyer estéril con rosca y se guardó en refrigeración a 4°C hasta su uso. *tequila blanco ®.

- **Solvente alcohol:agua 80:20**

En condiciones de esterilidad, se tomaron 10 ml de alcohol:agua con una jeringa y se esterilizó por filtración con un Acrodisc® Syringe Filter 0.45µm HT Tuffryn® Membrane Low Protein Binding Non-Pyrogenic PN 4184, el contenido se guardó en un matraz Erlenmeyer estéril con rosca y se guardó en refrigeración a 4°C hasta su uso.

- **Solvente agua destilada**

Se esterizaron 100 ml de agua destilada a 121°C durante 20 minutos.

Mantenimiento y conservación de *Bacillus subtilis* (ATCC-6633)

Para este experimento fue necesario establecer las formas para conservar y mantener viable la cepa de *Bacillus subtilis*. Para las bacterias “stock”, se preparó gelosa especial como medio de cultivo de conservación y fueron sembradas por triplicado por estría cruzada sobre el medio en tubos de ensaye estériles e incubadas a 35°C por 24 h Después se guardaron en refrigeración a 4°C para conservarlas. La resiembra de las cepas stock se realizó cada 6 meses lo que aseguró tener en resguardo una cepa pura en caso de que se perdiera la cepa por el uso continuo o por contaminación. Las cepas bacterianas de uso continuo, se sembraron por triplicado por estría cruzada sobre agar Mueller Hinton en cajas Petri de 5 cm de diámetro e incubadas a 35°C por 24 h Posteriormente, se guardaron en refrigeración a 4°C hasta su uso. Estas cepas se utilizaron cada vez que se realizaba una prueba antibacteriana y, su resiembra para conservarlas se realizó cada dos semanas.

6.4.2.1 Cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* (ATCC-6633)

Para realizar la cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* primero se necesitó producir el inóculo “semilla”. Este inóculo se realizó tomando una asada de la bacteria crecida previamente en agar Muller Hinton (DIFCO) a 24 horas de incubación. Con la asada se inocularon 20 ml de caldo Muller Hinton (Bioxon) y se incubó la bacteria por 14 h a 34°C y 230 rpm en una incubadora orbital MaxQ4000 (Thermo Scientific). Pasado ese tiempo, se tomó 1 ml de inóculo y se sembró en un nuevo matraz con 20 ml del mismo medio estéril bajo las mismas condiciones de incubación. Posteriormente, se tomaron a las 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 25 y 50 h de incubación dos muestras de 100 µl y se depositaron en tubos Eppendorff. Una de las muestras se utilizó para medir la concentración bacteriana (D.O.) con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) y, la otra para realizar el conteo bacteriano expresado como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en la cámara de Neubauer.

6.4.2.2 Determinación del efecto de los extractos en *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)

Preparación de suspensión bacteriana

Se tomó con un asa bacteriológica una colonia a partir de un cultivo de la caja Petri con agar de la cepa de *Bacillus subtilis*, sembrada con 24 h de anterioridad, y se inocularon en 40 ml de caldo Mueller Hinton estéril en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. Finalmente, se incubó el matraz en una incubadora (New Brunswick Scientific, E.U.A.) a 230 rpm a 35°C, durante 2 h

Ajuste del inóculo para determinar la actividad antibacteriana

Para iniciar la prueba de sensibilidad bacteriana se requirió ajustar el inóculo a una densidad óptica (D.O.) de 0.05. Esto se consiguió inoculando un matraz Erlenmeyer con 10 ml de caldo Mueller Hinton estéril 5 ml de inóculo tomado de la suspensión bacteriana preparada con anterioridad y, homogeneizada con ayuda de una micropipeta de 5 ml y agitada en vortex por 1 minuto. Inmediatamente, la D.O. inicial se midió en el espectrofotómetro (Biotek, EPOCH para microplaca) a una longitud de onda (λ) de 600 nm. En la mayoría de los casos, se tuvo que adicionar más inóculo o más medio de cultivo para poder conseguir una D.O. de 0.05. Para cuantificarla, se restó el valor de la D.O. del blanco, el cual fue el caldo Mueller Hinton a la D.O. de la suspensión bacteriana. Una vez obtenida la D.O. de 0.05, se procedió a realizar la prueba antibacteriana en microplaca.

Manejo de los reactivos y volúmenes

Para determinar el efecto de los extractos se consideró incluir 6 tipos de controles dentro de la microplaca, los cuales indicaron la inhibición o el crecimiento de las bacterias que llegara a presentar el disolvente o para verificar la inhibición del extracto. También se monitoreó el crecimiento bacteriano sin contaminación en la microplaca. De esta manera se estableció un control positivo del disolvente con su respectivo control negativo, un blanco negativo del extracto, la evaluación del extracto, una prueba de esterilidad y un blanco positivo (**Cuadro 11**).

Cuadro 11. Volúmenes utilizados de cada solución para realizar la prueba de sensibilidad bacteriana de los extractos contra *B. subtilis*.

Soluciones control	Caldo Mueller Hinton	Resuspensión bacteriana ajustada (D.O. 0.05)	Extracto	Disolvente	Volumen final
	(μ l)	(μ l)	(μ l)	(μ l)	(μ l)
Control positivo del disolvente (C+)	100	30	-----	100	230
Control negativo del disolvente (C-)	130	-----	-----	100	230
Blanco negativo del extracto (BL-)	130	-----	100	-----	230
Extracto (E)	100	30	100	-----	230
Prueba de Esterilidad (PE)	130	-----	-----	-----	130
Blanco positivo (BL+)	100	30	-----	-----	130

6.4.2.3 Determinación del efecto de los extractos

Esta prueba se inició cuando se obtuvo la resuspensión bacteriana a un valor de D.O. de 0.05. Inmediatamente, se procedió a realizar la distribución de los reactivos (**Anexo 3**), seguida de la dilución y finalmente, de la incubación. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad dentro una campana de flujo laminar.

a) Distribución de los reactivos en la reacción

- Primero: se agregaron 100 μ l de caldo Mueller Hinton en los pozos de A1 a A8 hasta los pozos F1 a F8 y de H1 a H6. Después se agregaron 130 μ l de caldo Mueller Hinton en los pozos G1 a G12, de H7 a H12 y, de A9 a A12 hasta los pozos F9 a F12.
- Segundo: 30 μ l de resuspensión bacteriana en los pozos de A1 a A8 hasta los pozos F1 a F8 y de H1 a H6.

- Tercero: 100 µl del disolvente (agua, tequila o alcohol:agua 80:20) se agregaron en los pozos A1 a A4 y G7 a H7. Por último, se agregaron 100 µl del extracto en los pozos A5 a A12.

Una vez adicionados los reactivos, los pozos A1 a A12 quedaron con un volumen inicial de 230 µl. Mientras tanto en los pozos donde se colocó la prueba de esterilidad (pozos G1 a G6) y el crecimiento bacteriano (pozos H1 a H6), quedaron con un volumen final de 130 µl.

b) Dilución de los reactivos

Se inició de los pozos A1 a A8, los cuales con la ayuda de una pipeta multicanal (Pipetman, USA) se mezclaron tres veces y se tomaron 100 µl, los cuales fueron transferidos a los pozos B1 a B8 (Dilución 1 indicada como D1) hasta llegar a los pozos F1 a F8 (Dilución 5 ó D5), en esta última dilución los últimos 100 µl fueron desechados. De la misma forma se inició la dilución para los pozos A9 a A12 hasta llegar a los pozos F9 a F12, la última serie de diluciones se realizó a partir de los pozos G7-H7 hasta los pozos G12-H12 (**Anexo 4**). Una vez finalizadas las diluciones el volumen final en cada uno de los pozos en toda la microplaca fue de 130 µl. Por cada serie de diluciones se cambiaron las puntas.

c) Incubación

Preparación de la cámara húmeda para el bioensayo

Para evitar la deshidratación de la reacción debido a los volúmenes de 200 µl por reacción fue necesario incubar la reacción en una cámara húmeda. Para ello se usó un recipiente de plástico limpio y desinfectado. En condiciones de esterilidad, se colocaron 30 ml de agua destilada estéril y después una tapa de caja Petri de vidrio estéril de 10 cm de diámetro. Posteriormente, se colocó una lámina de celofán (limpia y desinfectada) del tamaño de la microplaca encima de la caja Petri, evitando que el agua tocara la microplaca. Finalmente, se tapó la cámara húmeda y se guardó hasta su uso.

Después de haber agregado todos los reactivos y hecho las diluciones, en condiciones de esterilidad, la microplaca se colocó dentro de la cámara húmeda preparada con anterioridad. Finalmente, la cámara húmeda se colocó en una incubadora a 35°C. Se leyó en un

espectrofotómetro a una longitud de onda (λ) de 600 nm en condiciones de esterilidad dentro de una cámara de flujo laminar a los tiempos 0, 24 y 48 h.

6.4.2.4 Cálculo del efecto de los extractos sobre la bacteria

El espectrofotómetro EPOCH (Biotek, USA) se programó para realizar 2 lecturas a cada réplica. Con el promedio de cada lectura, se calculó la CMI con las siguientes ecuaciones:

$$\text{CMI} = E - \text{BCO-} \text{ (D.O del extracto - D.O. del blanco -)}$$

$$\text{ES} = [\text{Control +}] - [\text{Control -}] \text{ (D.O del solvente - D.O. del control -)}$$

E= Densidad óptica del medio de cultivo, la bacteria y el extracto.

BCO - = Densidad óptica del medio de cultivo y el extracto.

ES= Efecto del solvente (utilizado como control de los extractos).

C+= Densidad óptica del solvente sobre la bacteria.

C-= Densidad óptica del solvente sin bacteria.

El blanco positivo (BCO+) sirvió para comparar el crecimiento de la bacteria contra el efecto de los extractos de los hongos.

6.4.2.5 Determinación del efecto bactericida de los extractos de las cepas en estudio

Para llevar a cabo esta prueba se prepararon dos cajas Petri con agar Mueller Hinton para observar por separado el efecto del extracto y el efecto del disolvente. Para las cepas CP-30 y CP-50 se prepararon dos cajas Petri por cepa, en este caso, la muestra fue de 10 μl los cuales se tomaron y se depositaron en forma de gota en cajas Petri con agar Mueller Hinton. En la primera caja Petri, se inocularon muestras de tres de las cuatro réplicas de MI, D1, D2, D3, D4 y D5 del extracto, tres de las seis réplicas de la prueba de esterilidad y tres muestras de las seis réplicas del blanco positivo. En la segunda caja Petri se sembraron muestras de tres de las cuatro réplicas de MI, D1, D2, D3, D4 y D5 del control positivo del disolvente (**Figura 11**), la prueba fue realizada después de la última lectura de la microplaca en el espectrofotómetro, es decir a las 48 h.

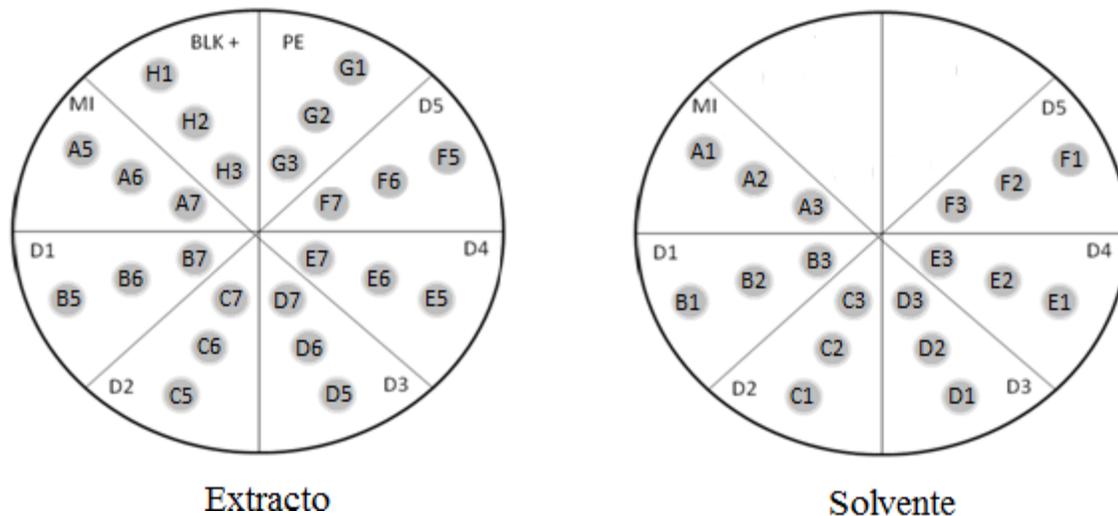


Figura 11. Prueba bactericida o letal realizada en cajas Petri con agar Muller Hinton. Los alfanúmeros sombreados representan el pozo de la microplaca del cual fue tomada la muestra y colocada en la caja Petri. Los alfanúmeros no sombreados muestran la dilución a la que pertenecen las muestras representadas por los alfanúmeros sombreados.

6.5 Análisis de resultados

La captura y manejo de los datos se llevó a cabo con el programa Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Co.).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Recursos genéticos de hongos comestibles

La identificación molecular dio como resultado que las cepas CP-30 y CP-50 corresponden a las especies *P. levis* y *P. ostreatus*, respectivamente (Morales *et al.*, 2010).

7.2 Características morfológicas y calidad de los basidiocarpos

Las características de los basidiocarpos cosechados en las diferentes formulaciones se muestran en el **cuadro 12**. El color en los basidiocarpos en la cepa CP-30 fue amarillo-crema y en la cepa CP-50 fue de crema-grisáceo, en ambas cepas se obtuvo buena apariencia y consistencia suave (**Figura 12**). En la cepa CP-30 el diámetro del estípite osciló en promedio entre 1.3 x 1.3 cm y el largo fue de 4.2 cm. Mientras que en el píleo el diámetro fue de 7.5 x 6.8 cm con pocas escamas. Las características de la cepa CP-50 fueron: el diámetro del estípite en promedio osciló entre 0.7 x 0.6 cm y el largo fue de 7.22 cm. Mientras que en el píleo el diámetro fue de 8.8 x 7.8 cm con nula presencia de escamas.

Cuadro 12. Características de los basidiocarpos de la cepa *Pleurotus levis* (CP-30) y *Pleurotus ostreatus* (CP-50) en COLPOS 17.

Cepa	Color	Morfología			
		Características de estípite (cm)		Características de píleo	
		Diámetro	Largo	Diámetro (cm)	Presencia de escamas
CP-30	Amarillo- crema	1.3x1.3	4.2	7.5x6.8	Escasa
CP-50	Crema-grisáceo	0.7x0.6	7.22	8.8x7.8	Nula

Como se puede observar la cepa CP-30 fue la que obtuvo el diámetro del estípite más grande, mientras que el largo del estípite y el diámetro del píleo lo obtuvo la cepa CP-50.

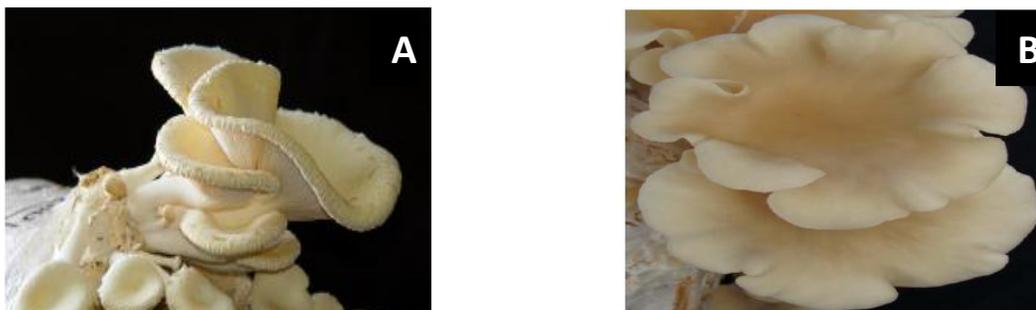


Figura 12. Cepas fructificadas en la fórmula suplementada COLPOS-17 en el módulo experimental del Colegio de Postgraduados. A= *Pleurotus levis* (CP-30). B= *Pleurotus ostreatus* (CP-50).

Características físicas presentes en los basidiocarpos

En el **cuadro 13** se observa el pH y la temperatura de los hongos comestibles cosechados al momento de su caracterización, obteniéndose resultados semejantes en ambas cepas. Por otro lado, el contenido de humedad de los basidiocarpos en *P. ostreatus* fue de 90.66% y el de *P. levis* de 89.24%. Los resultados obtenidos comparándolos entre sí, son semejantes en ambas cepas.

Cuadro 13. Características físicas de los hongos frescos de las cepas CP-30 de *Pleurotus levis* y CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivadas en la formulación COLPOS-17.

Cepa	Características físicas		
	pH	Temperatura (°C)	Humedad (%)
CP-30	6.15±0.02	26.9±0.05	89.2±1.86
CP-50	6.23±0.02	27.0±0.23	90.6±1.60

La evaluación del crecimiento micelial de las unidades de producción se llevó a cabo hasta que se tuvo un 100% de la colonización del sustrato, también se evaluó el tiempo de generación de primordios en los diferentes tratamientos y el período para la última cosecha al momento de la evaluación, desde la inoculación (TUC) (**Cuadro 14**).

Cuadro 14. Periodos de tiempo registrados en la fase de producción (1ª. Fructificación), número de cosechas y eficiencia biológica.

Cepa	Fase de producción					
	Tiempo días					
	CS*	APP*	TUC*	Cosechas	EB*(%)	TP*
CP-50	10±0.0	15±0.49	31±0.49	1	27.6±5.98	0.890±0.01
CP-30	14±0.0	28±0.0	38±0.45	1	59.4±8.25	1.563±0.02

CS= Colonización del sustrato (período desde la inoculación). APP= Aparición de primordios de fructificación (período desde la inoculación). TUC= Período para la última cosecha al momento de la evaluación, desde la inoculación. EB= Eficiencia biológica (%). TP= Tasa de producción.

Se puede observar que entre la CP-30 y la CP-50 hay una diferencia de 4 días en la colonización del sustrato, siendo la cepa CP-50 la cepa con menor tiempo de invasión del sustrato. En el período de aparición de primordio la cepa CP-50 fue la que presentó menor tiempo y en el caso de TUC la CP-30 fue la que presentó el mayor tiempo con 38 días, mientras que en la CP-50 fue la más corta, existiendo una diferencia de 7 días en ambas cepas.

7.2.1 Evaluación de la producción con base en la eficiencia biológica

La fructificación de las unidades de producción de las cepas CP-50 de *P. ostreatus* y CP-30 de *P. levis*, se llevó a cabo a una temperatura máxima de 26°C y una mínima de 15°C en el módulo experimental de Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla* (**Figura 13**).

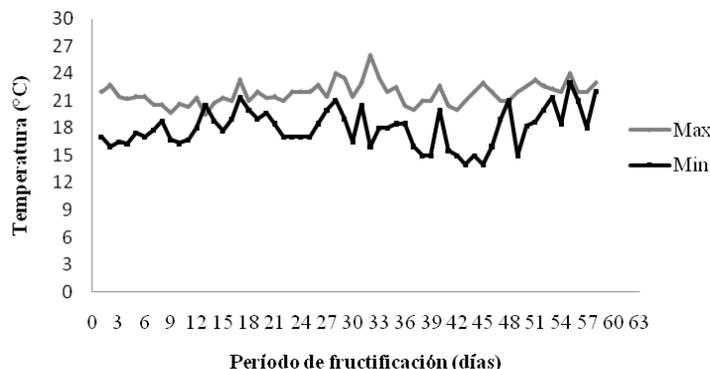


Figura 13. Condiciones ambientales de temperaturas máximas y mínimas registradas durante la fructificación de las cepas CP-30 y CP-50.

Además se mantuvo una humedad relativa promedio de 85% para evitar la deshidratación de estos basidiocarpos (**Figura 14**).

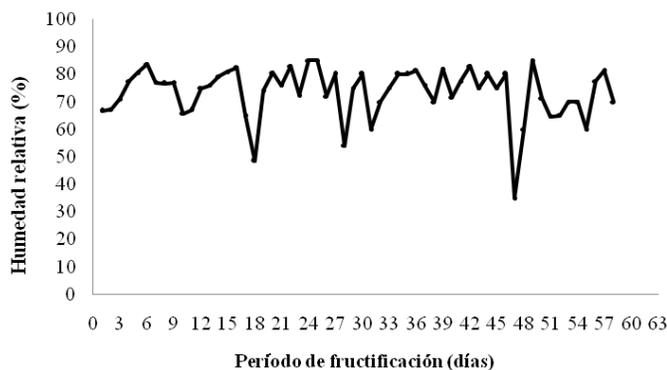


Figura 14. Humedad relativa en el módulo de producción durante la fructificación de la cepa CP-30 de *Pleurotus levis* y CP-50 de *Pleurotus ostreatus*.

Con base en una sola cosecha se calculó la eficiencia biológica (EB) de ambas cepas resultando con mejor eficiencia biológica y con mejor tasa de producción la cepa CP-30 (**Cuadro 14**). La EB de esta cepa fue del 59.4% que es parecida a la obtenida por Fernández y Del Mar (2010), quienes obtuvieron un 69% en bagazo de caña de azúcar al 100% y con una cepa de *P. ostreatus*. En otro estudio realizado por Garzón y Cuervo (2008), en una fórmula similar reportaron una eficiencia biológica para *P. ostreatus* de 29.1% que es similar a la obtenida en esta investigación.

7.3 Propiedades funcionales de las cepas en estudio

7.3.1 Fenoles totales

7.3.1.1 Fenoles totales de *P. levis* (CP-30)

Los resultados de la concentración de fenoles totales en los 6 tipos de extracciones se muestran en la **figura 15**.

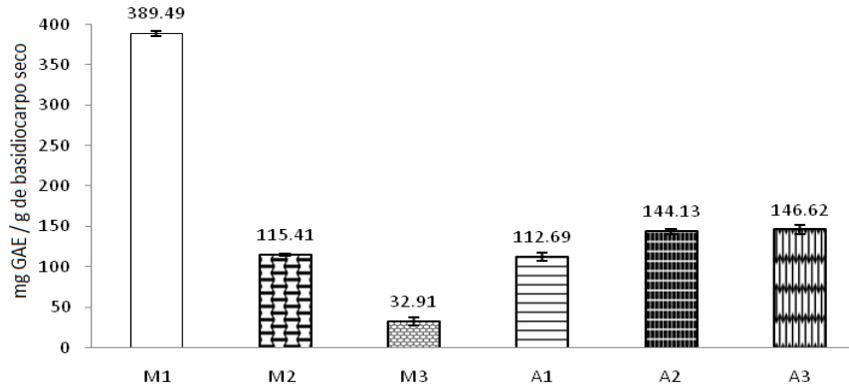


Figura 15. Concentración de fenoles presentes en extractos de la cepa de *P. levis* (CP-30).

El extracto M1 (macerado en agua) fue el que presentó la mayor concentración de fenoles con 389.49 ± 3.24 mg GAE/ g de basidiocarpio seco, mientras que la concentración más baja la presentó el extracto M3 (macerado en alcohol:agua 80:20) con 32.91 ± 5.21 mg GAE / g de basidiocarpio seco ambos bajo las mismas condiciones de extracción, pero con diferente disolvente. Estos resultados son semejantes a los reportados por Pal *et al.* (2010), donde la mayor concentración obtenida de fenoles fue en extractos acuosos, en comparación con el extracto metanólico el cual fue muy bajo. Por otra parte las concentraciones de fenoles totales en este trabajo fueron superiores en comparación con los resultados obtenidos por Pornariya y Kanok-Orn (2009), quienes reportaron que en extractos acuosos y etanólicos de basidiocarpos la concentración de fenoles totales de *Pleurotus ostreatus* fue de 42.47 ± 2.27 y 30.93 ± 1.92 mg GAE / g peso seco, respectivamente y para *Pleurotus sajor-caju* fueron de 37.98 ± 1.88 en extractos acuosos y de 29.30 ± 1.60 mg GAE / g peso seco en extractos etanólicos. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, los fenoles totales encontrados en los diferentes extractos presentaron diferencias en la concentración debido al disolvente usado para la resuspensión, al tiempo de extracción que se le dio a cada muestra, al disolvente utilizado para la extracción y a la temperatura empleada en la extracción (De Bruijn *et al.*, 2008; 2009).

7.3.1.2 Fenoles totales de *P. ostreatus* (CP-50)

Para la determinación de la concentración de fenoles totales de esta cepa sólo se reportan las extracciones por maceración M1 y M2. Los resultados de la concentración de fenoles totales en los 2 tipos de extracciones se muestran en la **figura 16**.

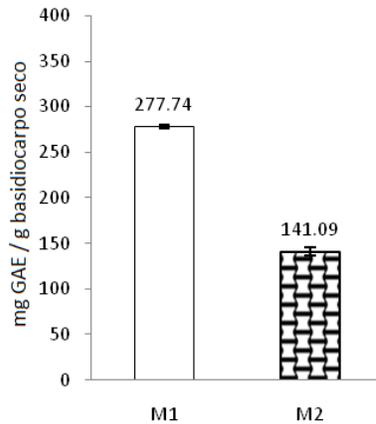


Figura 16. Concentración de fenoles presentes en extractos de la cepa de *P.ostreatus* (CP-50).

El extracto M1 (macerado en agua) fue el que presentó la mayor concentración de fenoles con 277.74 ± 2.22 mg GAE/ g basidiocarpo seco y la concentración más baja la presentó el extracto M2 (macerado en alcohol:agua 80:20) con 141.09 ± 4.68 mg GAE / g basidiocarpo seco bajo las mismas condiciones de extracción. Los resultados obtenidos demuestran que el extracto M1 tuvo mejor concentración de fenoles con respecto al extracto M2 siendo semejantes a los reportados por Lee *et al.* (2007), quienes reportan una mayor concentración de fenoles en extractos acuosos que en extractos etanólicos de *Pleurotus citrinopileatus*, aunque los resultados obtenidos con esta investigación son superiores a los reportados por estos autores.

7.3.1.3 Comparación de fenoles totales entre CP-30 de *P. levis* y CP-50 de *P. ostreatus*

En ambas cepas la mayor concentración de fenoles totales fue en M1 (macerado agua), pero la mejor fue en la cepa de *Pleurotus levis* (CP-30) con 389.49 ± 3.24 mg GAE/ g basidiocarpo seco en comparación con el de la cepa de *P. ostreatus* (CP-50) que fue de 277.74 ± 2.22 mg GAE/ g basidiocarpo seco, por lo que se puede observar que los mejores extractos para la obtención de una buena concentración de fenoles en ambas cepas son por maceración en agua en comparación con los demás extractos (**Figura 17**). De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, puede suponerse que, la diferencia obtenida en la concentración de fenoles se debe a la variación en la especie siendo una cepa comercial (CP-50) y la otra

silvestre (CP-30) y al disolvente utilizado para la extracción (Yang *et al.*, 2002; Puttaraju *et al.*, 2006). En el caso del extracto M2 (macerado en tequila) en ambas cepas, se observó que la cepa CP-50 fue la que obtuvo una mejor concentración de fenoles que la cepa CP-30, esto puede deberse a la polaridad del disolvente del extracto M2 que extrae mejor los compuestos fenólicos de la cepa CP-50 (Tsai *et al.*, 2009; Karaman *et al.*, 2010; Pornariya y Kanok-Orn, 2009) ó a otros factores como el color del hongo (Kim *et al.*, 2009).

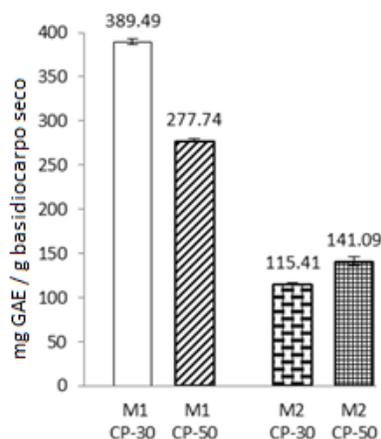


Figura 17. Comparación de fenoles totales presentes en los extractos macerados de la CP-30 de *P. levis* y la CP-50 de *P. ostreatus*.

7.3.2 Actividad antibacteriana de los extractos

7.3.2.1 Cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* (ATCC-6633)

En la **figura 18**, se muestra la curva de crecimiento de la bacteria de *Bacillus subtilis*, usando la densidad óptica (D.O.) y las unidades formadoras de colonias (UFC). Ambas curvas son semejantes y presentaron un mismo comportamiento durante el tiempo de incubación.

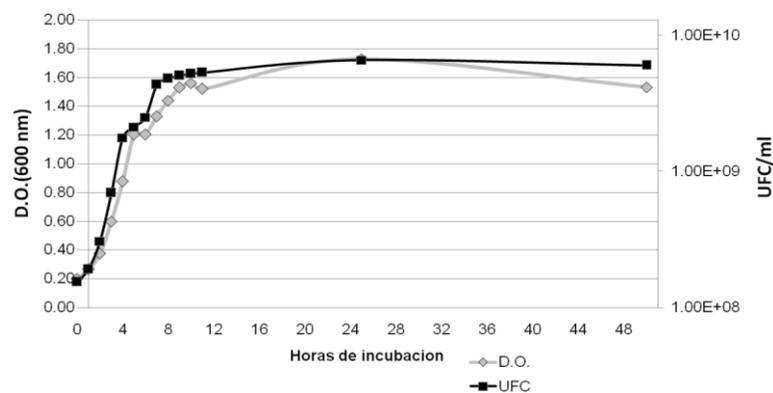


Figura 18. Cinética de crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis* (CPB-9) utilizada para evaluar las propiedades antibacterianas de los extractos de las cepas CP-30 de *Pleurotus levis* y CP-50 de *Pleurotus ostreatus*.

turbidez observada en los micropozos de cada extracto. En el extracto M2 las densidades ópticas fueron de 0.97 a 1.33 a las 24 h y de 1.38 a 1.55 a las 48 h, mientras que en el extracto M3 (a excepción de la MI) las densidades ópticas fueron de 0.97 a 1.30 a las 24 h y de 1.45 a 1.57 a las 48 h de incubación contra *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), lo que sugiere que los disolventes utilizados para extraer los compuestos antibacterianos en los extractos M2 y M3 no fueron eficaces ya que las densidades ópticas en ambos extractos son similares a las del blanco positivo y a la presencia de turbidez observada en los micropozos de cada extracto.

En las **figuras 20 y 21** se observa que los extractos de CP-30 de *Pleurotus levis* muestran diferencias en su inhibición dependiendo del disolvente utilizado y del método de extracción. Lo anterior concuerda con lo reportado por Oloke y Kolawole (1988), quienes mencionan que los compuestos bioactivos de cualquier planta medicinal pueden variar en función de su solubilidad en los disolventes utilizados para la extracción. Takazawa *et al.* (1982), sugiere que se debe de emplear una gran variedad de disolventes para realizar la extracción máxima de los fitoquímicos. Kawagishi *et al.* (1988), observaron que en *Agaricus blazei* varios polisacáridos y haptenos activos son solubles en alcohol, pero insolubles en agua. Por otra parte en un estudio realizado por Jonathan y Fasidi (2003) demostraron que la actividad antibacteriana de *Lycoperdon pusillum* y *Lycoperdon giganteum* se ve influenciada por el tipo de disolvente y por el método de extracción utilizado. Estos resultados colocan a la cepa *Pleurotus levis* como un agente antibacteriano natural, debido a los compuestos bioactivos presentes, tal como lo mencionan Anke (1989) y Brizuela *et al.* (1998), quienes señalan a los acetilenos presentes en *Pleurotus* como compuestos con actividad antibiótica. En otros estudios, se ha revelado que especies del género *Pleurotus* producen interesantes estructuras complejas, como son los antibióticos pleurotina (Turner y Aldridge, 1983) y pleuromutilina (Anchel, 1952).

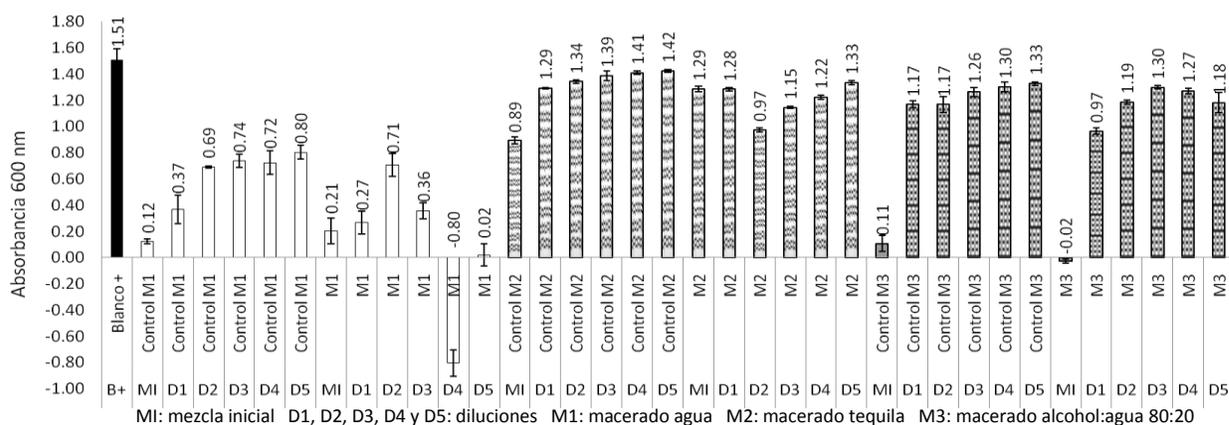


Figura 20. Actividad antibacteriana a 24 h de incubación de la bacteria CPB-9 (*Bacillus subtilis* ATCC-6633) en los extractos, M1, M2 y M3 del basidiocarpo de la CP-30 de *Pleurotus levis*.

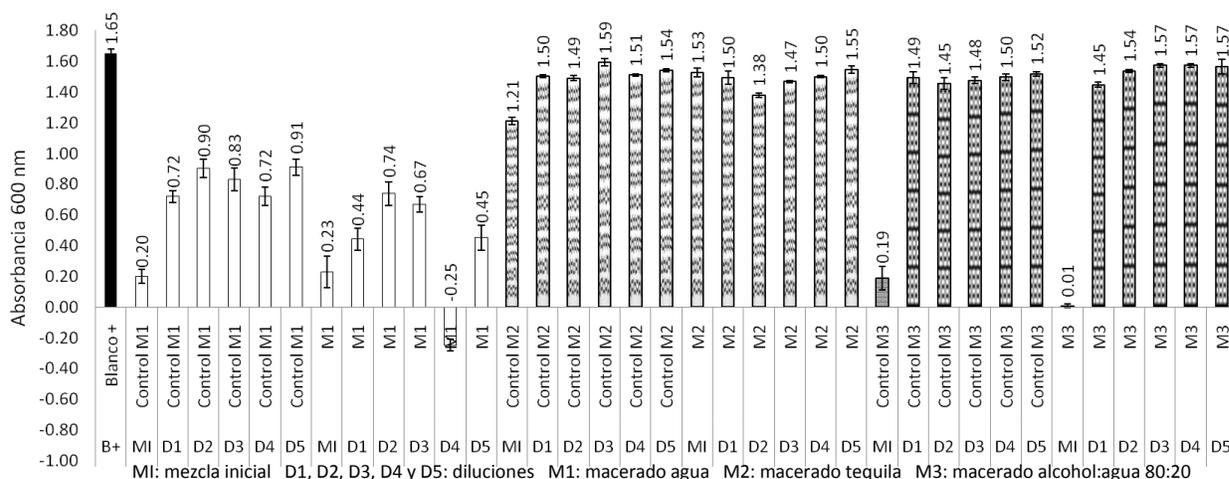


Figura 21. Actividad antibacteriana a 48 h de incubación de la bacteria CPB-9 (*Bacillus subtilis* ATCC-6633) en los extractos, M1, M2 y M3 del basidiocarpo de la CP-30 de *Pleurotus levis*.

Efecto inhibitorio de los extractos acuosos obtenidos por el Soxhlet

La **figura 22**, muestra los resultados de las lecturas de densidad óptica de los extractos acuosos a tiempo cero de la cepa CP-30 contra la bacteria CPB-9 de *Bacillus subtilis*, confirmando que los valores iniciales fueron relativamente bajos en comparación con los resultados obtenidos después de 24 y 48 h, observándose que en el extracto A1 fue de 0.00 a 0.04, en el extracto A2 de 0.01 a 0.03 y en el extracto A3 de 0.00 a 0.04. También se observó que en el blanco positivo no hubo crecimiento de la bacteria.

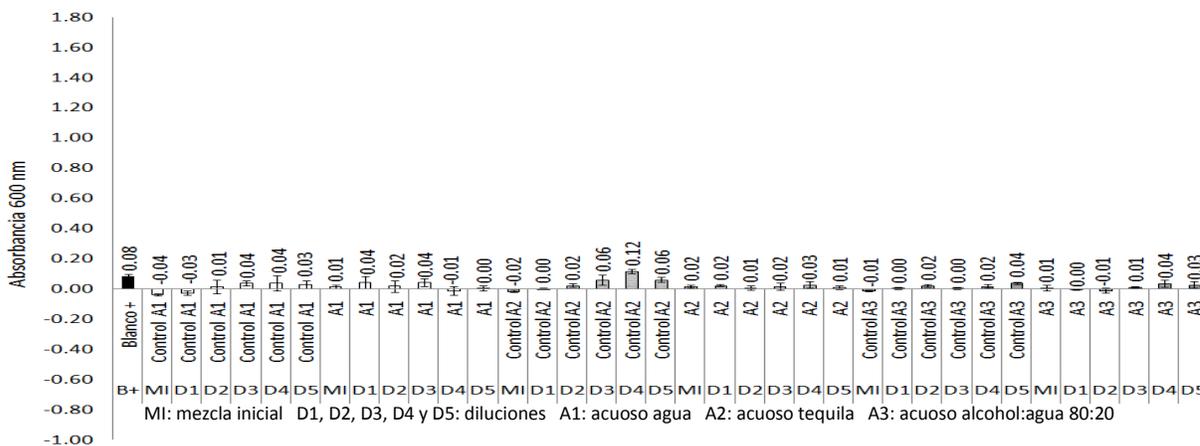


Figura 22. Lecturas obtenidas a tiempo cero en el efecto de los extractos A1, A2 y A3 del basidiocarpo de la CP-30 contra CPB-9 (*Bacillus subtilis* ATCC-6633).

La actividad bacteriostática sólo fue observada en el extracto A3 en una de sus diluciones (MI) siendo de menos 0.01 después de 24 h y de menos 0.01 después de 48 h de incubación contra *Bacillus subtilis*. Mientras que, en los demás extractos no se observó un efecto inhibitorio contra la bacteria, ya que en el extracto A1 las densidades ópticas fueron de 1.40 a 1.53 después de 24 h y de 1.46 a 1.59 después de 48 h, en el extracto A2 las densidades ópticas fueron de 1.39 a 1.59 después de 24 h y de 1.57 a 1.69 después de 48 h y en el extracto A3 (a excepción de la MI), las densidades ópticas fueron de 1.35 a 1.45 después de 24 h y de 1.45 a 1.64 después de 48 h. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que el método de extracción no fue el adecuado para extraer los compuestos antibacterianos en esta especie de hongo comestible, esta afirmación se basa por las densidades ópticas obtenidas de los extractos a prueba, comparadas con las del blanco positivo las cuales son similares entre sí, por la turbidez observada en los micropozos de cada extracto y por qué se esperaría un comportamiento parecido en el extracto A1 y M1, ya que ambos fueron extraídos en agua. Al parecer el tiempo de extracción y la temperatura fueron los principales factores que influyeron en la extracción de compuestos bioactivos como los fenoles totales (De Bruijn *et al.*, 2008), ya que estos compuestos son considerados como antibacterianos, tal como lo señalan Araujo y Salas (2008), quienes mencionan que la acción de los fenoles y polifenoles contra los microorganismos se debe a la inhibición enzimática posiblemente por acción sobre los grupos sulfhidrilos de sus aminoácidos de cisteína o por medio de reacciones más inespecíficas con proteínas bacterianas.

En las **figuras 23 y 24** se observa que los extractos acuosos de la CP-30 de *Pleurotus levis* no muestran diferencias en su grado de inhibición, ya que la mayoría tiene un comportamiento parecido.

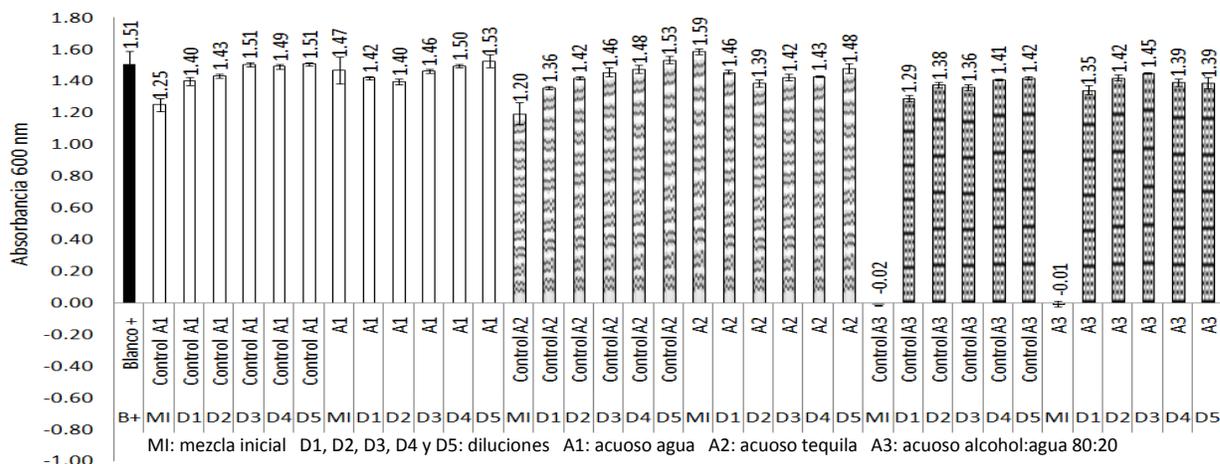


Figura 23. Actividad antibacteriana a 24 h de incubación de la bacteria CPB-9 (*Bacillus subtilis* ATCC-6633) en los extractos, A1, A2 y A3 del basidiocarpo de la CP-30 de *Pleurotus levis*.

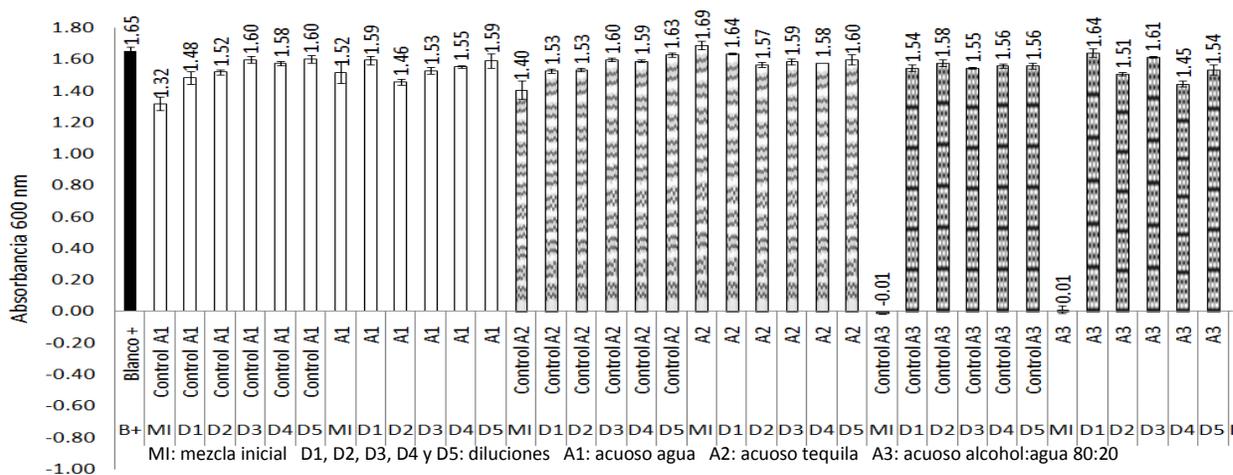


Figura 24. Actividad antibacteriana a 48 h de incubación de la bacteria CPB-9 (*Bacillus subtilis* ATCC-6633) en los extractos, A1, A2 y A3 del basidiocarpo de la CP-30 de *Pleurotus levis*.

7.3.2.3 Efecto de los extractos de la cepa CP-50 de *P. ostreatus*

Los dos tipos de extractos (M1 y M2) mostraron diferentes grados de inhibición contra *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

Efecto inhibitorio de los extractos macerados

La **figura 25**, muestra los resultados de las lecturas de densidad óptica de los macerados al tiempo cero de la cepa CP-50 contra la bacteria CPB-9 de *Bacillus subtilis*, confirmando que los valores iniciales fueron relativamente bajos en comparación con los resultados obtenidos después de 24 y 48 h, observándose que en el extracto M1 fue de 0.00 a 0.06 y en el extracto M2 de 0.02 a 0.04. También se observó que en el blanco positivo no hubo crecimiento de la bacteria.

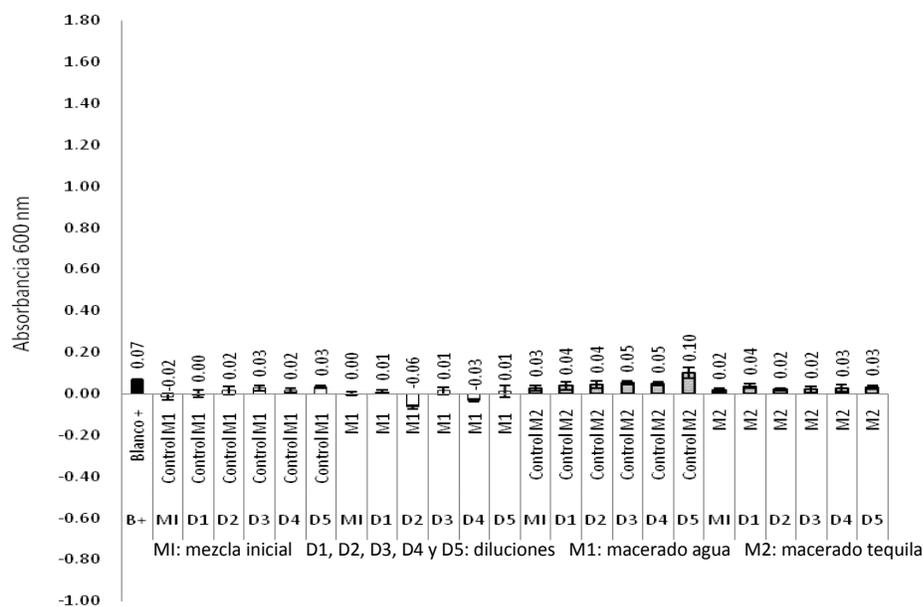


Figura 25. Lecturas obtenidas a tiempo cero en el efecto de los extractos M1 y M2 del basidiocarpo de la CP-50 contra CPB-9 (*Bacillus subtilis* ATCC-6633).

En la **figura 26 y 27** se observa que en el extracto M1 de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus* no presento actividad bacteriostática en las diluciones D2, D3, D4 y D5 contra *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), ya que se observó la presencia de turbidez en los micropozos y los valores de las densidades ópticas fueron de 0.61 a 0.97 a las 24 h y de 0.88 a 1.09 a las 48 h, las cuales fueron altas comparándolas con las del blanco positivo. Mientras que, el extracto M2 no presento actividad bacteriostática en las diluciones D2, D3, D4 y D5 contra *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), ya que se observó la presencia de turbidez en los micropozos y los valores de densidad óptica fueron de 0.78 a 0.94 a las 24 h y de 0.74 a 1.10 a las 48 h, las cuales también fueron altas comparadas con las del blanco positivo. Por otra parte, donde se observó una actividad bacteriostática contra *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) fue en el extracto M1 en la mezcla inicial (MI) siendo la densidad óptica de 0.01 a las 24 h y de 0.01 a las 48 h, también

se observó en la dilución 1 (D1) siendo la densidad óptica de 0.01 a las 24 h y de 0.01 a las 48 h El extracto M2 presentó actividad bacteriostática contra *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), en la mezcla inicial (MI) siendo la densidad óptica de 0.01 a las 24 h y de 0.01 a las 48 h, también se observó en la dilución 1 (D1) obteniendo una densidad óptica de 0.03 a las 24 h y de 0.03 a las 48 h De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que sólo en MI y D1, en ambos macerados el disolvente tuvo un efecto similar en la extracción de compuestos bioactivos esta afirmación se basa por las bajas densidades ópticas obtenidas de crecimiento bacteriano comparadas con las del blanco positivo y por la turbidez observada en los micropozos de cada extracto.

Jegadeesh *et al.* (2010), reportaron actividad antibacteriana similar en extractos de hexano y cloroformo de *Volvariella bombycina* contra cinco bacterias. Por lo que se supone que los compuestos bioactivos presentes en los diferentes extractos tuvieron un mismo grado de solubilidad en los diferentes disolventes utilizados para la extracción.

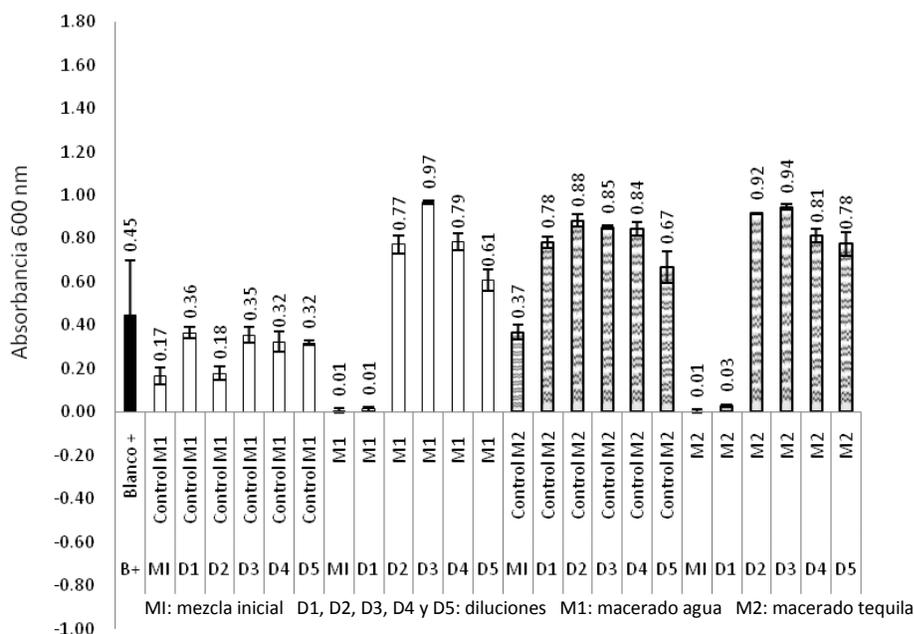


Figura 26. Actividad antibacteriana a 24 h de incubación de la bacteria CPB-9 (*Bacillus subtilis* ATCC-6633) en los extractos M1 y M2 del basidiocarpio de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus*.

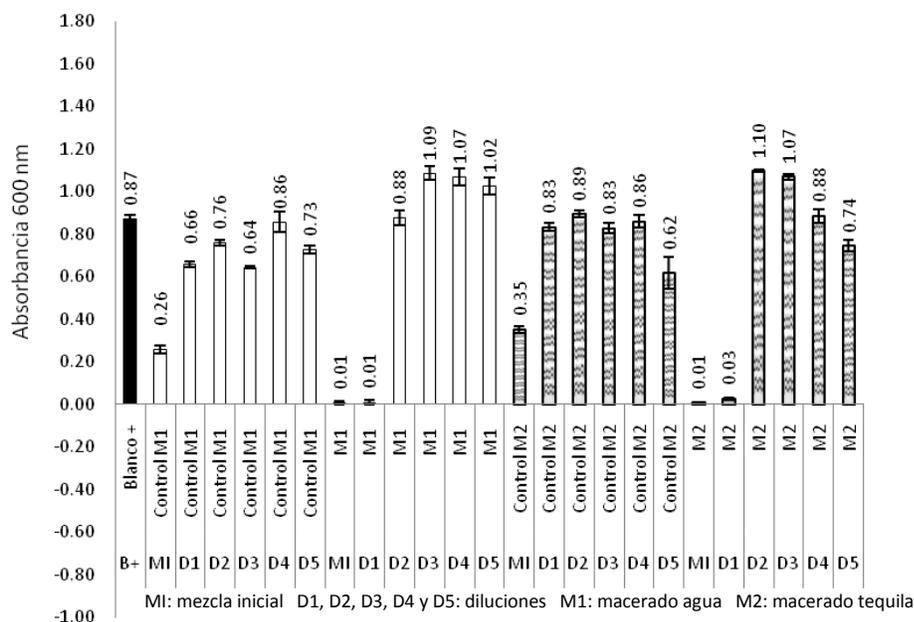


Figura 27. Actividad antibacteriana a 48 h de incubación de la bacteria CPB-9 (*Bacillus subtilis* ATCC-6633) en los extractos M1 y M2 del basidiocarpio de la CP-50 de *Pleurotus ostreatus*.

La inhibición bacteriana podría deberse a los compuestos bioactivos presentes en los extractos de la cepa *Pleurotus ostreatus*, tal como lo menciona Beltrán-García *et al.* (1997), quienes demostraron que compuestos volátiles extraídos del cuerpo fructífero como la 3-octanona, 3-octanol, 1-octen-3-ol, benzaldehído, 1-octanol, ácido benzoico y un componente sin identificar soluble en cloroformo, poseían una fuerte actividad antibacteriana frente a *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *S. typhimurium*. Además, a partir del cuerpo fructífero de este hongo también se ha extraído un péptido con capacidad antifúngica, denominado pleurostrin que inhibe el crecimiento del micelio de los hongos *Fusarium oxysporum*, *Mucosphaerella arachidicola* y *Phycalospora piricola* (Chu *et al.*, 2005).

7.3.2.4 Comparación del efecto de los extractos entre la CP-30 de *P. levis* y CP-50 de *P. ostreatus*

El extracto que presentó un mayor efecto bacteriostático en todas sus concentraciones fue el extracto M1 de la cepa CP-30 de *Pleurotus levis* (**Cuadro 15**), mientras que los extractos que presentaron un efecto bacteriostático en alguna de sus concentraciones fueron A3 y M3 de la cepa CP-30 de *Pleurotus levis*. En el caso de la CP-50 de *P. ostreatus* en los extractos M1 y M2 sólo presentaron un efecto inhibitorio en la mezcla inicial (MI) y en la dilución 1 (D1).

Por otra parte, al hacer la comparación entre ambas cepas se puede observar que se obtuvo un mayor efecto bacteriostático en los extractos por maceración en agua, esto podría ser debido a que hay una mejor solubilidad de los compuestos bioactivos en este tipo de disolvente (Jegadeesh *et al.*, 2010) lo que permitiría afirmar que el mejor disolvente para extraer los compuestos bioactivos que ocasionan una actividad bacteriostática fue el agua.

Cuadro 15. Efecto de las concentraciones de extractos obtenidos de basidiocarpos en *B. subtilis* (ATCC-6633).

Cepa	Procedencia de extracto	Extractos	Dilución	Concentraciones finales de los extractos ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Efecto en <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)
CP-30	Soxhlet	A1 y A2	MI	135,217.39	NP
			D1	58,790.17	NP
			D2	25,560.94	NP
			D3	11,113.45	NP
			D4	4,831.93	NP
			D5	2,100.84	NP
CP-30	Soxhlet	A3	MI	135,217.39	B
			D1	58,790.17	NP
			D2	25,560.94	NP
			D3	11,113.45	NP
			D4	4,831.93	NP
			D5	2,100.84	NP
CP-30	Macerado	M1	MI	434,782.61	A, B
			D1	250,574.37	B
			D2	82,189.53	B
			D3	35,734.57	B
			D4	15,536.77	B
			D5	6,755.11	B
CP-30	Macerado	M2	MI	434,782.61	NP
			D1	250,574.37	NP
			D2	82,189.53	NP
			D3	35,734.57	NP
			D4	15,536.77	NP
			D5	6,755.11	NP
CP-30	Macerado	M3	MI	434,782.61	A, B
			D1	250,574.37	NP
			D2	82,189.53	NP
			D3	35,734.57	NP
			D4	15,536.77	NP
			D5	6,755.11	NP
CP-50	Macerado	M1	MI	434,782.61	A, B
			D1	250,574.37	A, B
			D2	82,189.53	NP
			D3	35,734.57	NP
			D4	15,536.77	NP
			D5	6,755.11	NP

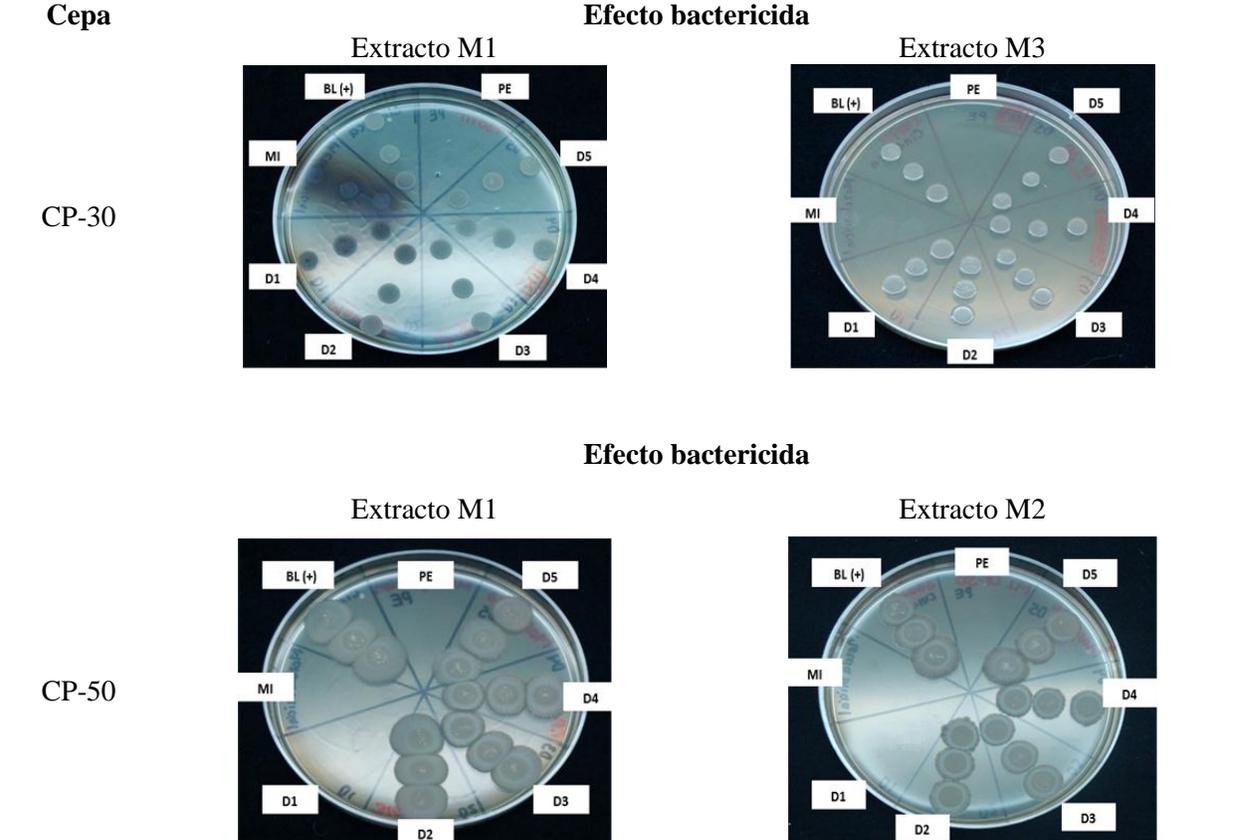
CP-50	Macerado	M2	MI	434,782.61	A, B
			D1	250,574.37	A, B
			D2	82,189.53	NP
			D3	35,734.57	NP
			D4	15,536.77	NP
			D5	6,755.11	NP

A=Efecto bactericida, B=Efecto bacteriostático, NP=no presentó.

7.3.3 Efecto bactericida de los extractos de CP-30 de *P. levis* y CP-50 de *P. ostreatus*

La ausencia de crecimiento bacteriano indicó un efecto bactericida (Taylor, 1983). Se obtuvieron 4 tipos de extractos con actividad bactericida después de 24 h contra *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Los extractos que presentaron el mejor efecto bactericida en las mezclas iniciales y en D1 fueron M1 y M2 de la CP-50 de *P. ostreatus*. Mientras que en los extractos M1 y M3 de la CP-30 de *P. levis* sólo presentaron el efecto bactericida en las mezclas iniciales (**Cuadro 16**). De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, puede suponerse que, los extractos M1 y M2 de la CP-50 de *P. ostreatus* pudieran contener una mayor cantidad de compuestos bioactivos con efecto bactericida que los M1 y M3 de la CP-30 de *P. levis*, tales compuestos podrían ser flavonoides que han sido reconocidos como metabolitos secundarios responsables de la actividad antibacteriana de extractos de los basidiomicetos comestibles *Lactarius deliciosus*, *Sarcodon imbricatus* y *Tricholoma portentosum* (Barros *et al.*, 2007), ya que el uso de los flavonoides contra infecciones bacterianas o fúngicas tiene como objetivos matar las células de los microorganismos o dificultar los efectos de difusión de las toxinas bacterianas (López, 1998). En hongos como *Pleurotus* se ha encontrado que producen sustancias bioactivas con estructuras únicas, las cuales han mostrado muchos efectos medicinales incluyendo propiedades antimicrobianas (Karaman *et al.*, 2010). Muchas de las sustancias bioactivas incluyen fenoles y flavonoides (Barros *et al.*, 2007), ergosterol (Trigos y Suárez-Medellín, 2010) y muchos otros.

Cuadro 16. Efecto bactericida de extractos obtenidos de basidiocarpos en *Bacillus subtilis* (ATCC-6633).



PE= prueba de esterilidad, BL (+) = blanco positivo, MI= mezcla inicial, D1 a D5=diluciones

8. CONCLUSIONES

- La cepa que presentó la mejor eficiencia biológica fue la CP-30 de *P. levis* con 59.4 %.
- Los macerados acuosos en ambas cepas presentaron los mejores resultados en concentración de fenoles totales.
- Los macerados acuosos fueron los que extrajeron mejor los compuestos bioactivos en *P. levis* y *P. ostreatus* ya que se obtuvo una mayor actividad antibacteriana.
- Debido a la actividad antibacteriana obtenida de los extractos por maceración de *P. levis* y *P. ostreatus* ambos hongos comestibles pueden ser recomendados como agentes antibacterianos naturales debido a los compuestos bioactivos presentes.
- No se recomienda utilizar alcohol:agua 80:20 para la obtención de extractos para *P. levis* y *P. ostreatus* ya que sus compuestos bioactivos no tienen mucha afinidad con este disolvente.
- En estudios futuros se recomienda un análisis más a profundidad de los extractos para identificar los componentes bioactivos específicos responsables de la actividad antimicrobiana.

9. ESTRATEGIA PARA APROVECHAR LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE *PLEUROTUS* EN EL MEDIO RURAL

En los últimos años se está observando cómo la demanda de ciertos productos forestales no madereros se está incrementando notablemente, tanto en México como en todo del mundo. Un ejemplo claro de esta tendencia lo constituyen los hongos comestibles, alimentos que son cada vez más apreciados por el consumidor. Aunque la cantidad de especies de hongos comestibles con aptitudes culinarias es extensa, hoy en día unas pocas especies llegan a nuestros mercados, problema de ello es debido a varios factores que evitan que el productor no pueda realizar producción masiva de nuevas especies como por ejemplo, el desconocimiento del cultivo del hongo, gente capacitada en el contexto de producción de hongos comestibles, mano de obra calificada para la producción de micelio para semilla de hongo de calidad, el uso de sustratos o fórmulas alternativas mejoradas que permitan un mayor rendimiento en la producción, etc. Pero también no sólo depende del productor el enfrentar todos los problemas mencionados anteriormente, las instituciones dedicadas a la investigación y generación de conocimiento deberían de apoyar para solucionar este tipo de dificultades, ejemplo de ello es el Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla, el cual puede apoyar a productores o aquellas organizaciones generadoras de productos alimenticios, hacia mejorar, prevenir y combatir problemas que impidan el desarrollo del sector dentro de un mercado globalizado, por medio de la identificación molecular de especies nuevas o novedosas que permita generar procesos biotecnológicos de producción con alto impacto social, satisfaciendo así la creciente demanda de los consumidores por nuevas líneas de productos y variedades de hongos comestibles y medicinales (Mayett *et al.*, 2006). Por lo que, en esta sección se plantea la metodología para el análisis de un paquete tecnológico con el propósito de explotarlo comercialmente.

La estrategia

La estrategia propuesta en esta investigación está centrada principalmente en el cultivo de *Pleurotus* spp. el cual busca como objeto principal: (a) extender el número de cepas que los productores puedan ofrecer al mercado y por ende incrementar su ingreso económico, (b) ofrecer a los consumidores y a los mismos productores un alimento funcional con propiedades benéficas para la salud, (c) disminución de la contaminación por medio de la utilización de los materiales de origen agroindustrial para el cultivo de *Pleurotus* spp., (d) apoyar al

mejoramiento de la producción comercial de hongos comestibles funcionales y medicinales, (e) generar conocimiento nuevo de interés medicinal para cepas nativas y comerciales que pueda dar más plusvalía a los hongos comestibles y (f) apoyar al sector rural para su desarrollo social y económico.

Actores de la estrategia

Los actores de la estrategia (**Figura 28**) son los siguientes:

1. Los productores que son a los que principalmente se les proporciona la estrategia.
2. Los consumidores del producto.
3. Instituciones de investigación como el Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla que por medio de sus investigaciones puedan proporcionar a los productores varios beneficios como especies nuevas con posibilidades de explotación comercial, micelio de calidad que garantice una producción segura y asesoramiento en todo lo referente a hongos comestibles.
4. El Gobierno, que a través de instituciones como SEDESOL, SAGARPA, etc. ofrezcan apoyos técnicos, financieros y administrativos a los productores de hongos comestibles.

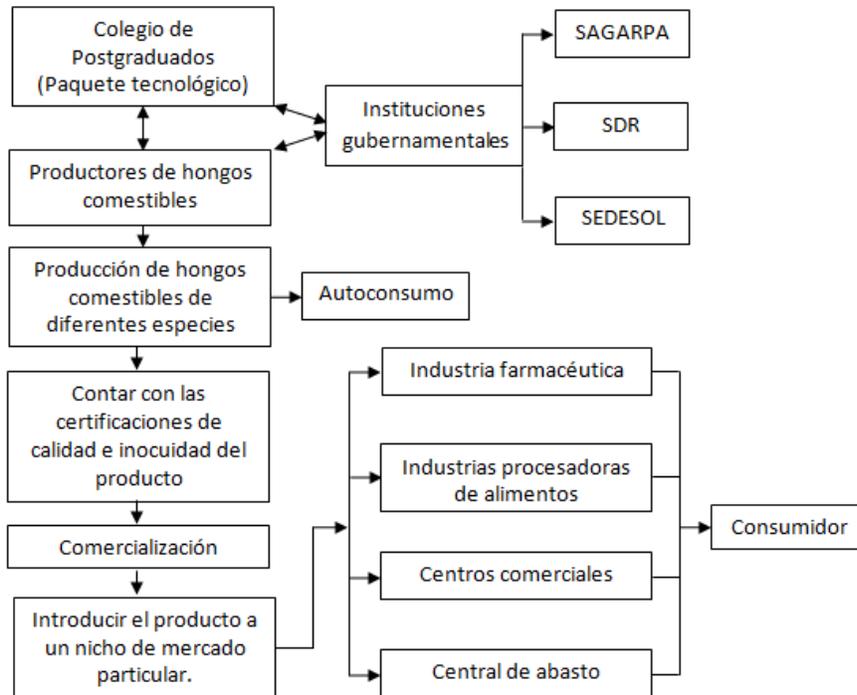


Figura 28. Mapa conceptual de la aplicación del paquete tecnológico, intervenciones y actores participantes.

Contenido del Paquete tecnológico

El objetivo es el de fomentar la transferencia de tecnología a través del paquete tecnológico para la producción de hongos comestibles, en este caso el cultivo de *Pleurotus levis* y *Pleurotus ostreatus*.

La semilla para la siembra de ambas especies se puede conseguir en el Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla en presentaciones de 5 kg y 3 kg, se sugiere que el cultivo sea en la formulación COLPOS-17 constituida por 6.43 kg de aserrín de encino, 1.23 kg de aserrín de *Bursera*, 1.28 kg de bagazo de caña de azúcar, 2.72 kg de olote de maíz, 2.97 kg de salvado de trigo, 450 g de Cal [Ca (OH)₂] y 1800 g de yeso (CaSO₄) y 26 L de agua. La formulación presenta un pH de 6.7 y una humedad de 61.6%.

Las instalaciones mínimas para el crecimiento de los hongos son 5:

Área de almacenamiento de los substratos

Las dimensiones pueden ser de 3 metros de ancho por 3 metros de largo y la altura de 3 m, el área puede ser libre o cerrada y estar libre de todo tipo de humedades y contaminantes.

Material indispensable:

- Tambos de plástico con tapa (200 L) para almacenar los diferentes ingredientes para elaborar el substrato.
- Báscula granataria capacidad mínima 1 g y máxima 20 kg.
- Tinajas de plástico con tapa de 200 litros.
- Pala de metal para tomar y combinar los ingredientes.
- Mesa plegable de plástico (122 cm x 76 cm)
- Cubetas de plástico de 12 L

Área de preparación del substrato

Las dimensiones pueden ser de 4 metros de ancho por 4 metros de largo y la altura de 3 m, el área debe de ser cerrada y libre de contaminantes como polvo.

Material indispensable:

- Un extractor de aire colocado en alguna esquina del área en la parte superior.

- Báscula granataria capacidad mínima 1 g y máxima 10 kg.
- Pala de metal para combinar los ingredientes.
- Tina de plástico de 500 litros.
- Ollas de presión de 21 litros con manómetro (All american).
- Parrilla con 3 quemadores.
- Bolsas de polipropileno con filtro de 13.5 x 80 cm con filtro (*Unicorn Imp. E.U.A.*).
- Pinzas de presión metálicas.
- Vaso graduado de 1 litro.
- Mesa plegable de plástico (244 cm x 76 cm)

Elaboración del sustrato (las cantidades que se proporcionan de la fórmula COLPOS-17 proporcionan 12 unidades de producción con 1900 gramos de sustrato): Los componentes son mezclados con la cantidad de agua recomendada en una tina, asegurando la homogenización mediante una pala, posteriormente el sustrato preparado es depositado en bolsas de polipropileno con filtro de 13.5 x 80 cm con filtro (*Unicorn Imp. E.U.A.*), cerrando levemente las bolsas con las pinzas de presión metálicas, las bolsas con sustratos son esterilizadas mediante ollas de presión por hora y media a 121°C. Una vez transcurrido el tiempo, las bolsas con sustrato estéril son enfriadas a temperatura ambiente durante 24 h antes de ser utilizadas.

Área de inoculación

Las dimensiones pueden ser de 3 metros de ancho por 4 metros de largo y la altura de 3 m, el área debe ser cerrada y libre de cualquier contaminante, corrientes de aire y tránsito de personas.

Material indispensable:

- Termosellador electrónico (*Impulse sealer UL*).
- Dosificador de alcohol etílico.
- Caja de papel absorbente (servilletas).
- Semilla de hongo.
- Tijeras.
- Plumón.

- Mesa plegable de plástico (244 cm x 76 cm)

Inoculación del sustrato y formación de las unidades de producción: las manos, la parte superior de la bolsa y las tijeras deben de estar desinfectadas con alcohol etílico antes de cualquier procedimiento. En una campana de flujo laminar las bolsas con sustrato se abren totalmente retirando las pinzas de presión metálicas. Posteriormente, el sustrato es inoculado con 250 gramos de “semilla” de *Pleurotus* spp., dispersando el inóculo por todo el sustrato, una vez homogeneizado las bolsas (unidades de producción) son selladas mediante un termo sellador electrónico y rotuladas.

Área de incubación

Las dimensiones pueden ser de 5 metros de ancho por 8 metros de largo y la altura de 3 m, el área debe ser cerrada y estar libre de humedad, corrientes de aire bruscas y polvo.

Material indispensable:

- Estantes metálicos.
- Termómetro para lectura de temperatura interior exterior

La incubación se debe realizar en un área ventilada hasta que el micelio cubra completamente al sustrato y los primordios sean visibles. Las unidades de producción no deben de tener contacto directo con el sol, la iluminación debe de ser del 50 al 80%. El área debe permanecer limpia, libre de polvo y humedad a temperatura ambiente de entre 25 a 30 °C.

Área fructificación

Las dimensiones pueden ser de 5 metros de ancho por 10 metros de largo y la altura de 3 m, el área debe ser cerrada y contener estructuras de metal con diferentes niveles y soportes para colocar las unidades de producción. El área de fructificación debe de estar limpia de lodo y de unidades de fructificación contaminadas, también se debe procurar la aireación continua a través de extractores, además del 50% de iluminación con una humedad relativa aproximada del 85%. La humedad puede conseguirse de manera manual con una mochila fumigadora o automática, mediante un sistema de nebulización y riego automatizado. El riego por ambos métodos deben ser los necesarios siempre y cuando se mantenga la humedad. A las unidades

de producción se les retirará la parte superior de la bolsa exponiendo un 10% del sustrato y se colocaran sobre los soportes en los diferentes niveles hasta que los basidiocarpos alcancen el estadio adulto.

Material indispensable:

- Estantes metálicos
- Mochila fumigadora
- Manguera de 30 metros de 1 pulgada
- Escoba
- Medidor de humedad
- Extractor de aire
- Termómetro para lectura de temperatura interior exterior

Material extra

- Campana de flujo laminar
- Caja de cerillos
- Jerga para limpiar
- alcohol etílico 1 L
- Bulto de yeso
- Bulto de cal
- Taras de plástico para cosechar
- Refrigerador comercial de 4 puertas

La siembra de las cepas presentan las siguientes características:

Pleurotus levis: la colonización del sustrato en unidades de 2 kg se presenta a los 14 días, una vez colonizado el sustrato se presenta la aparición de primordios a los 28 días en promedio. Las características favorables en el módulo para la producción de basidiocarpos fueron de una temperatura mínima de 15 y una máxima de 26°C y una humedad relativa de 85%. Con el control de estos parámetros la cepa presenta, basidiocarpos con un diámetro de píleo de 7.5x6.8 cm, 4.2 cm de largo del estípite, grosor de estípite de 1.3x1.3 cm, contenido de agua de 89.2%, pH de 6.15 y una eficiencia biológica de 59.4%.

Pleurotus ostreatus: la colonización del sustrato en unidades de 2 kg se presenta a los 10 días, una vez colonizado el sustrato se presenta la aparición de primordios a los 15 días en promedio. Las características favorables en el módulo para la producción de basidiocarpos son de una temperatura mínima de 15 y una máxima de 26°C y una humedad relativa de 85%. Con el control de estos parámetros la cepa presenta, basidiocarpos con un diámetro de píleo de 8.8x7.8 cm, 7.2 cm de largo del estípite, grosor de estípite de 0.7x0.6 cm, contenido de agua de 90.6%, pH de 6.23 y una eficiencia biológica de 27.6%.

10. LITERATURA CITADA

- Alexopoulos, C. J. 1962. *Introductory microbiology*, 2nd. Ed. John Wiley and Sons. Nueva York
- Alonso-Franch, M. y G. Castellano. 2007. Conceptos generales de nutrición. Requerimientos nutricionales. Pp. 1-11. *En: Manual práctico de Nutrición en Pediatría*. Eds. T. Muñoz Calvo y L. Suárez. Majadahonda, Madrid.
- Anchel, M. 1952. Chemical studies with pleuromutilin. *Journal of Biological Chemistry* 199: 133-139.
- Anderson, N., S.Wang and J. Schwandt. 1973. The *Pleurotus ostreatus-sapidus* species complex. *Mycologia*. 65: 28-35.
- Anke, T., 1989. Basidiomycetes: A source for new bioactive secondary metabolites. *Progress in Industrial Microbiology* 27: 51-66.
- Araujo, J. y R. Salas. 2008. Actividad antimicrobiana de plantas. *Revista Científica* 6: 4-75
- Avello, M. y M. Suwalsky. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* 494: 161-172.
- Barros, L., R.C. Calhella, J.A. Vaz, I.C.F.R. Ferreira, P. Baptista and L.M. Estevinho. 2007. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *European Food Research Technology* 225: 151-156.
- Beltrán-García, M., J. Estarrón-Espinosa and T. Ogura. 1997. Volatile compounds secreted by the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and their antibacterial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 4049-4052.
- Brizuela, M.A., L. García., L. Pérez y M. Mansur, 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología* 15: 69-74.
- Buttriss, J. 2000. Is Britain ready for FOSHU?. *Nutrition Bulletin* 25: 159-161.
- Çaglarirmak, N. 2009. Determination of nutrients and volatile constituents of *Agaricus bisporus* (brown) at different stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89, 634-638.
- Calañas-Contiente, A.T. y D. Bellido. 2006. Bases científicas de una alimentación saludable. *Revista de Medicina, Universidad de Navarra* 50 (4): 7-14.
- Capello, G.S., E.S. Lopez-Hernandez y V. Sanchez-Leon. 2006. Educación ambiental para conocimiento y uso de hongos en una comunidad chontal. Olcuatitán, Nacajuca. Tabasco. *Horizonte sanitario* 5 (2): 44-54.
- Cardona, U. 2001. Revisión: Anotaciones acerca de la bromatología y el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. *Crónica forestal y del medio ambiente*. 16: 99-119.
- Chang, S. 1984. Conversion of agricultural and industrial waste into fungal protein. *Conservation Recycling*, 7, 175-180.
- Chang, S.T. and P.G. Miles. 1989. Edible Mushrooms and Their Cultivation. *CRC Press*. 345 pp.
- Chang, S.T. and P.G. Miles. 2004. Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. *CRC Press*. 451 pp.
- Chu, K. T., L. Xia and T.B. Ng. 2005. Pleurostrin, an antifungal peptide from the oyster mushroom. *Peptides* 26: 2098-2103.
- Cohen, R., L. Persky and Y. Hadar. 2002. Biotechnological applications and potential of Wood-degradation mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiol and Biotech* 8: 37-45.
- Corner, E.J.H., 1981. The agaric genera *Lentinus*, *Panus* and *Pleurotus* with particular reference to Malaysian species. *Beihfte zur Nova Hedwigia* 69: 1-169.
- Curvetto, N. 2009. *Grifola frondosa* (Maitake): Su valor nutraceutico, nutricional, farmacéutico y cosmecéutico. Tecnología de producción. Bahía Blanca. 57
- De Bruijn, J., C. Loyola, P. Aqueveque, J. Cañumir, M. Cortéz and A. France. 2008. Influence of heat treatment on the antioxidant properties of *Grifola gargar* Hydro-Alcoholic Extracts. *Micología Aplicada Internacional* 20(1): 27-34

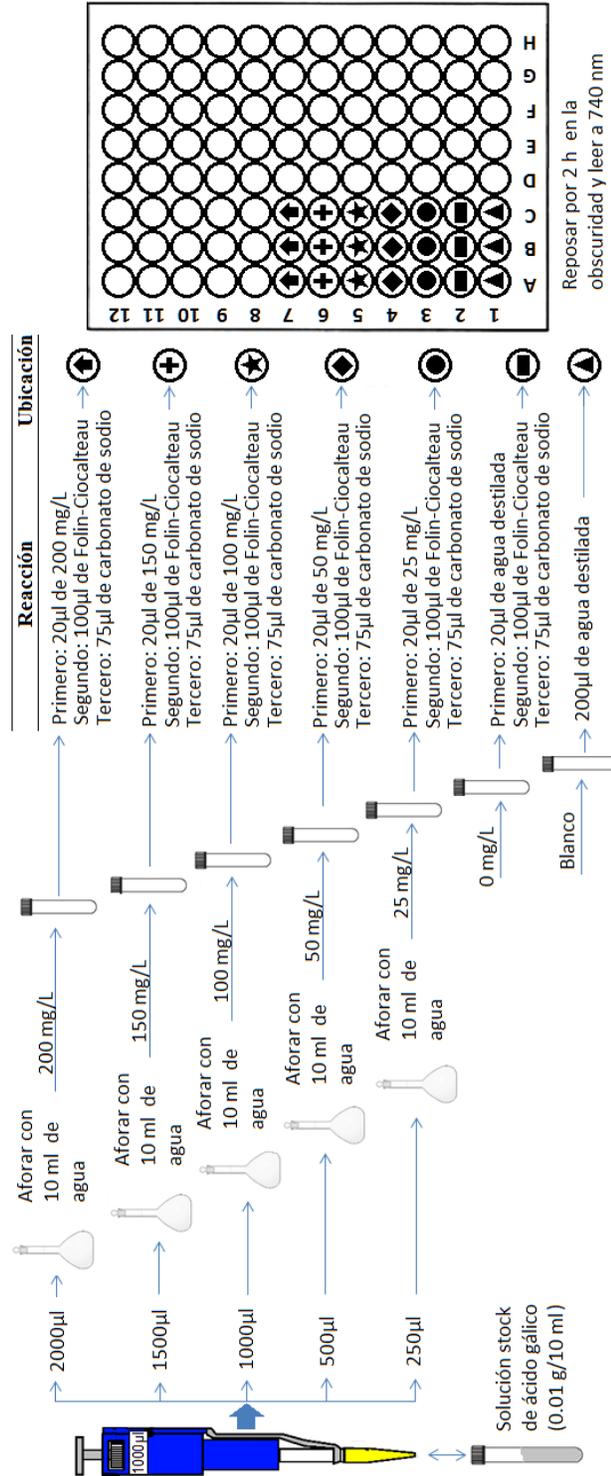
- De Bruijn, J., C. Loyola, P. Aqueveque, J. Cañumir, M. Cortéz and A. France. 2009. Antioxidant properties of extracts obtained from *Grifola gargal* mushrooms. *Micologia Aplicada Internacional* 21(1): 11-18.
- Dorado-Martinez, C., C. Rugerio-Vargas y S. Rivas-Arancibia. 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*. 46(6):229-235
- Elejalde-Guerra, J.I. 2001. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna* 18: 326-335
- FAOSTAT, 2007. En <http://faostat.fao.org/>
- Fernández, J.L. y J. Benito. 2008. Panorama actual de la Nutrigenómica. ¿Esperanza o Realidad? *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*. 28(3): 38-47
- Fernández, U. M. y M Del Mar. 2010. Productividad y eficiencia biológica de dos especies comerciales de hongos comestibles *Pleurotus* sp. en diferentes sustratos lignocelulósicos. *Agrodocs*, Universidad Nacional de Colombia.
- Fernaroli's G. 1975. *Handbook of flavor ingredients*, Volume I. Ney York: CRC Press.
- Fu, H.Y. and D.E., Shie. 2001. Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *Journal of Food Lipids* 9:35-46
- Furlani, R. P. Z. and H.T. Godoy. 2008. Vitamins B1 and B2 contents in cultivated mushrooms. *Food Chemistry* 106, 816-819.
- Garzón, J.P. y J. L. Cuervo. 2008. Producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia. *NOVA* 6 (10): 126-140
- Gboladage, J. and L. Kigigha. 2007. Antagonistic Effect of Extracts of Some Nigerian Higher Fungi Against Selected Pathogenic Microorganisms. *American-Euroasian Journal of Agricultural and Environmental*. 4: 364-368.
- Gunde-Cimerman, N. 1999. Medicinal Value Of the Genus *Pleurotus*(Fr) P. Kars. (Agaricales s.l., Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 69-80.
- Guzman, G. 2000. Genus *Pleurotus* (Jacq.:Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae): Diversity, Taxonomic Problems, and Cultural and Traditional Medicinal Uses. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2(2): 95-123.
- Herrera, T. y M. Ulloa. 1990. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. *Fondo de Cultura Económica y UNAM*. Mexico. Pp.552.
- Jayakumar, T., P.A. Thomas and P. Geraldine. 2009. *In vitro* antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Innovative Food Science Emerging Technologies* 10: 228–234.
- Jegadeesh, R., N. Raaman, K. Periyasamy, L. Hariprasath, R. Thangaraj, R. Srikumar and S.R. Ayyappan. 2010. Proximate analysis and antibacterial activity of an edible mushroom *Volvariella bombycina*. *International Journal of Microbiological Research* 1(3): 110-113
- Jonathan, S.G. and I.O. Fasidi. 2003. Antimicrobial activities of two nigerian edible macro-fungi *Lycoperdon Pusillum* (Bat. Ex) and *Lycoperdon giganteum* (Pers.). *African Journal of Biomedical Research* 6: 85-90
- Kalac, P. and L. Svoboda. 2000. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chemistry* 69: 273-281.
- Karaman, M., E. Jovin, M. Malbasa, M. Matavuly and M. Popovic. 2010. Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. *Phytotherapy Research* 24: 1473-1481.
- Kawagishi, H.A., T. Nomura, T. Yumen, T. Mizuno, A. Hagwara and T. Nakamura. 1988. Isolation and properties of lectin from the fruiting bodies of *Agaricus blazei*. *Carbohydrate Research* November 183 (1): 150-154.

- Kim, J.-H., S.-J.Kim, H.-R.Park, J.-I.Choi, Y.-C.Ju, K.-C.Nam, S.-J.Kim and S.-C. Lee. 2009. The different antioxidant and anticancer activities depending on the color of oyster mushrooms. *Journal of Medicinal Plants Research* 3 (12): 1016-1020.
- Kong, W. S. 2004. Spawn, Mushroom Growers *Handbook. Part II. Oyster Mushrooms*. 55-61 pp.
- Kuklinski, K., 2003, "Farmacognosia", Editorial OMEGA S.A., Barcelona, España, pp. 32-39.
- Lee, Y.-L., G.-W. Huang, Z.-C. Liang, and J.-L. Mau. 2007. Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *LWT* 40: 823–833
- Lindequist, U., H.J.T. Niedermeyer and J. Wolf-Dieter. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence based Complementary and Alternative Medicine* 2 (3): 285-299.
- Logan, N. A. 1988. *Bacillus* species of medical and veterinary importance. *Journal of Medicinal Microbiological* 25: 157-165
- López, N.P. 1998. Flavonoids and lignans from *Virola surinamensis* twigs and their in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Medica* 64: 667-668.
- Lopez-Rodriguez, C., R. Hernandez-Corredor, C. Suárez-Franco and M. Borrero. 2008. Evaluation of growth and production of *Pleurotus ostreatus* on different agroindustrials wastes of Cundinamarca. *Universitas scientiarum* 13 (2): 128-137.
- Mariaca-Méndez, R., L. Silva-Pérez y C. Castaño-Montés. 2001. Proceso de recolección y comercialización de hongos comestibles silvestres en el valle de Toluca, México. *Ciencia Ergo Sum*. 8 (1): 30-40.
- Martínez, A. 2010. *Propiedades nutricionales y medicinales del champiñón y otros hongos cultivados*. Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR).76 pp.
- Martínez-Carrera, D., A. Larqué-Saavedra, P. Morales, M. Sobal, W. Martínez y A. Aguilar. 1993. Los hongos comestibles en México: biotecnología de su reproducción. *Ciencia y Desarrollo* 108: 41-49.
- Martínez-Carrera, D., M. Sobal, P. Morales, W. Martínez, M. Martínez y Y. Mayett. 2004. *Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales, y su contribución a la alimentación mexicana*. COLPOS-BUAP-UPAEP-IMINAP, Puebla, México. 44pp.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales y M. Sobal, 1988. Cultivo de diversas cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus* sobre pulpa de café y paja de cebada. *Revista Mexicana de Micología* 4: 153-160.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla y W. Martínez. 2007. México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. Pp. 20. *En: El Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México*. Eds. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata y H. Leal. México, D.F.
- Matill, H.A. 1947. Antioxidants. *Annual Review Biochemistry* 16: 177–192.
- Mattila, P., K. Kónkö, M. Eurola, J.M. Pihlava, J. Astola, L. Vahteristo, V. Hietaniemi, J. Kumpulainen, M. Valtonen and V. Piironen. 2001. Contents of vitamins, mineral elements and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2343-2348.
- Mayett, Y., D. Martínez-Carrera, M. Sánchez, A. Macías, S. Mora and A. Estrada. 2006. Consumption trends of edible mushrooms in developing countries: the case of Mexico. *Journal of International Food and Agribusiness Marketing* 18: 151-176.
- Moda, M., J. Horii and M. Fillet. 2005. Edible Mushroom *Pleurotus sajor-caju* production on washed and supplemented sugarcane bagase. *Scientia Agricola* 62(2): 127-132
- Mora, V. M. y D. Martínez-Carrera. 2007. Investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas (*Pleurotus*) en México. Pp17. *En: El Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México*. Eds. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata & H. Leal. ECOSUR-CONACYT, México, D.F.
- Morales, P., M. Sobal, M. Bonilla, W. Martínez, P. Ramírez, I. Tello, T. Spezzia, N. Lira, R. De Lima, S. Villa, E. Montiel y D. Martínez-Carrera. 2010. Los hongos comestibles y medicinales en

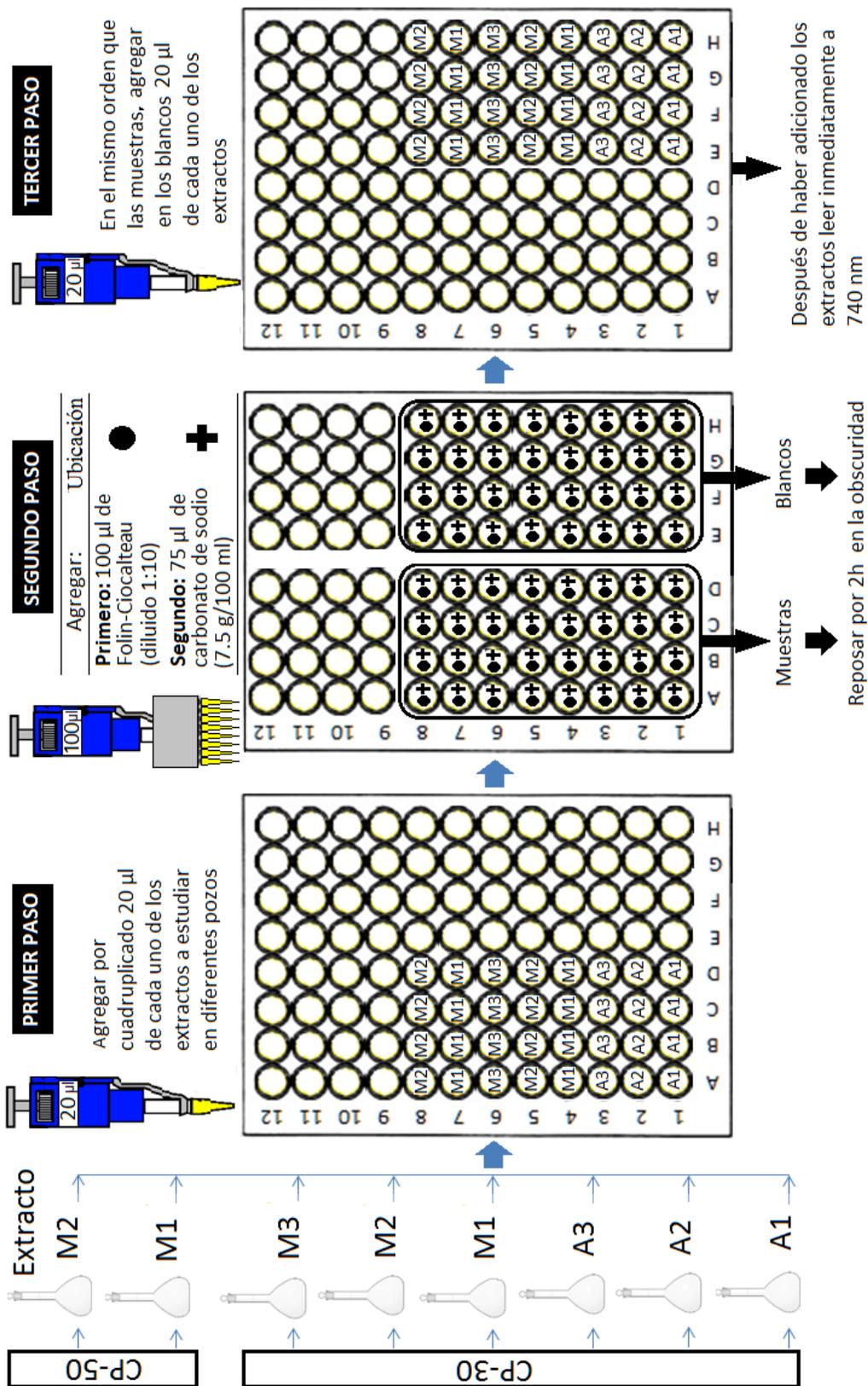
- México: recursos genéticos, biotecnología, y desarrollo del sistema de producción-consumo. Pp. 91-108. *En: Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XXI*. Eds. Martínez-Carrera, D., N. Cueto, M. Sobal, P. Morales y V.M. Mora. Puebla, México.
- Müller, L., S. Gnoyke, A.M. Popken and V. Böhm. 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT* 43: 992-999.
- O.P.S. Organización Panamericana de la Salud. 2004. Guía para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Washington, D.C., E.U.A. 20037-2895.
- Okuda, T., Y. Yoshioka, T. Ikekawa, G. Chihara and K. Nishioka. 1972. Anticomplementary activity of antitumor polysaccharides. *Nature: New Biology*. 238(12): 59-60
- Oloke, J.O., and D.O. Kolawole. 1998. The antibacterial and antifungal activities of certain components of *Aframomum melegueta* fruits. *Fitoterapia* 59 (5): 384-388.
- Pal, J., S. Ganguly, K. S. Tahsin and K. Acharya. 2010. *In vitro* free radical scavenging activity of wild edible mushroom, *Pleurotus squarrosulus* (Mont.) Singer. *Indian Journal of Experimental Biology* 47: 1210-1218.
- Pantone. 2011. Cartas de color marca "Pantone".
- Pornariya, Ch. and I. Kanok-Orn. 2009. Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. *Science Asia* 35: 326-331.
- Puttaraju, N. G., S.U. Venkateshaiah, S.M. Dharmesh, S.M.N. Urs and R. Somasundaram. 2006. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 9764-9772.
- Ribeiro, B., J. Rangel, P. Valentão, P. Baptista, R.M. Seabra and P.B. Andrade. 2006. Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried portuguese wild edible mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry* 54, 8530-8537
- Rodríguez, M.J., J.R. Mendez- Lopez y Y. Trujillo-Lopez. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana Medica Militar* 30 (1): 36-44.
- Rojas-Herrera, A y T. González-Flores. 2006 Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica* 31 (2): 69-76.
- Royse, D. J. 1985. Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of the shiitake mushroom. *Mycologia* 77 (5): 756-762.
- Sánchez, J. y D. Royse. 2002. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. *Editorial Limusa*, 290 p. Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Chiapas, México, D. F.
- Sharapin, N., Machado, L., Souza, E., Rocha, E., Valverde, E., Lopez y J, CAB. 2000. Fundamentos Tecnológicos de Productos Fitoterapéuticos", Editorial Azucena Martínez, Santafé de Bogotá D.C., Colombia, pp. 40-66.
- Shimizu, T. 2002. Newly established regulation in Japan: foods with health claims. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 11(2): 94-96.
- Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 82 (2): 291-5.
- Singer, R. 1978. *The Agaricales in modern taxonomy*. 3rd ed. Cramer, Vaduz. 912 p.
- Singleton, V.L. and J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
- Sobal, M., D. Martínez-Carrera, P. Morales, and S. Roussos. 2007. Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of Mexico. *Micología Aplicada Internacional* 19 (1): 15-23.
- Sobal, M., P. Morales, M. Bonilla, W. Martínez, F. Galván, D. Sihuanca, F. Quiriz, M. Juárez y D. Martínez-Carrera. 2010. Formulaciones para la producción intensiva de *Lentinula edodes* y *L. boryana* en México. Pp. 179-183. *En: Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en latinoamérica: Avances y perspectivas en*

- el siglo XXI*. Eds. Martinez-Carrera, D., N. Cueto, M. Sobal, P. Morales y V.M. Mora. Puebla, México.
- Stamets, P. 1993. *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Ten speed Press, Berkeley, CA. Pp 551
- Strasburger, E. F., H. Schenck y A.F. Schimper. 1986. *Tratado de botánica numero 11*. Editorial Marín. Barcelona.
- Takazawa, H., F. Tajima and C. Miyashita. 1982. An antifungal compound from Shiitake (*Lentinus edodes*). *Yakugaku Zasshi* 102: 489-491.
- Taylor, P.C., F.D. Schoenkecht, J.C. Sherris and E.C. Linner. 1983. Determination of minimum bactericidal concentrations of oxacillin for *Staphylococcus aureus*: influence and significance of technical factors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 23: 142-150.
- Trejejo-Chávez E. y M. Maury. 2002. Extracción y caracterización del aceite de *Poraqueiba sericea* Tulasne (UMARÍ). *Revista Amazónica de Investigación. Alimentaria* 2 (2): 1-18.
- Trigos, A. y J. Suárez-Medellín. 2010. Los hongos como alimentos funcionales y complementos alimenticios. Pp. 59-76. En: *Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XXI*. Eds. Martinez-Carrera, D., N. Cueto, M. Sobal, P. Morales y V.M. Mora. Puebla, México.
- Tsai, S.-Y., S.-J. Huang, S.-H. Lo, T.-P. Wu, P.-Y. Lian and J.-L. Mau. 2009. Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. *Food Chemistry* 113: 578-584
- Turner, W. B. and D. C. Aldridge. 1983. *Fungal Metabolites II*. Academic Press. 631 pp.
- Wang, H. X. and T.B. Ng. 2000. Isolation of a novel ubiquitin-like protein from *Pleurotus ostreatus* mushroom with Anti-Human Immunodeficiency Virus, Translation-Inhibitory, and Ribonuclease Activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276, 587-593
- Wang, H., and T.B. Ng. 2004. Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides* 25: 1-5.
- Yang, H. J., C.H. Lin. and L.J. Mau. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry* 77: 229-235.
- Zadrazil, F., 1978. *Cultivation of Pleurotus ostreatus*. Pp 521-557, London: Academic Press.
- Zervakis, G., J. Sourdís and C. Balis. 1994. Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus* species based on isozyme analysis. *Mycological Research* 98: 329-341

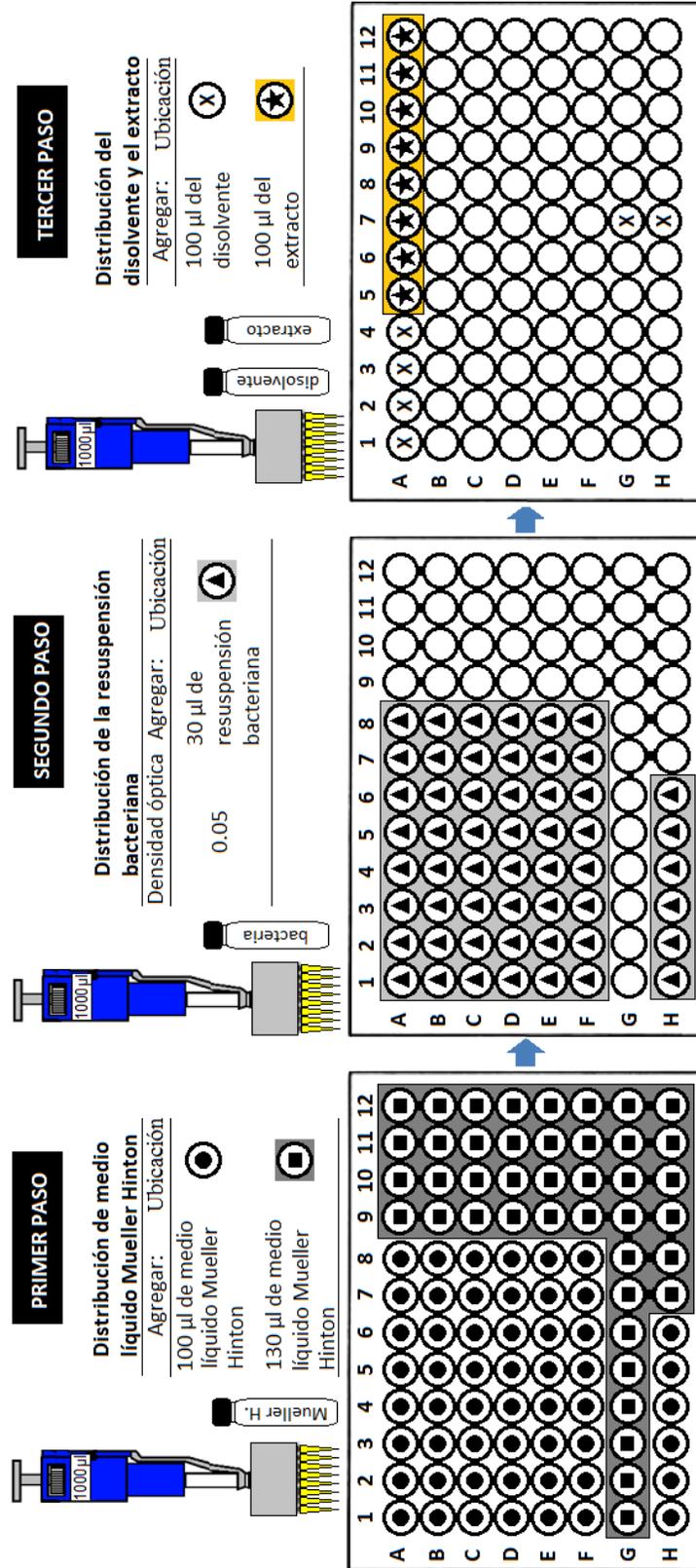
11. ANEXOS



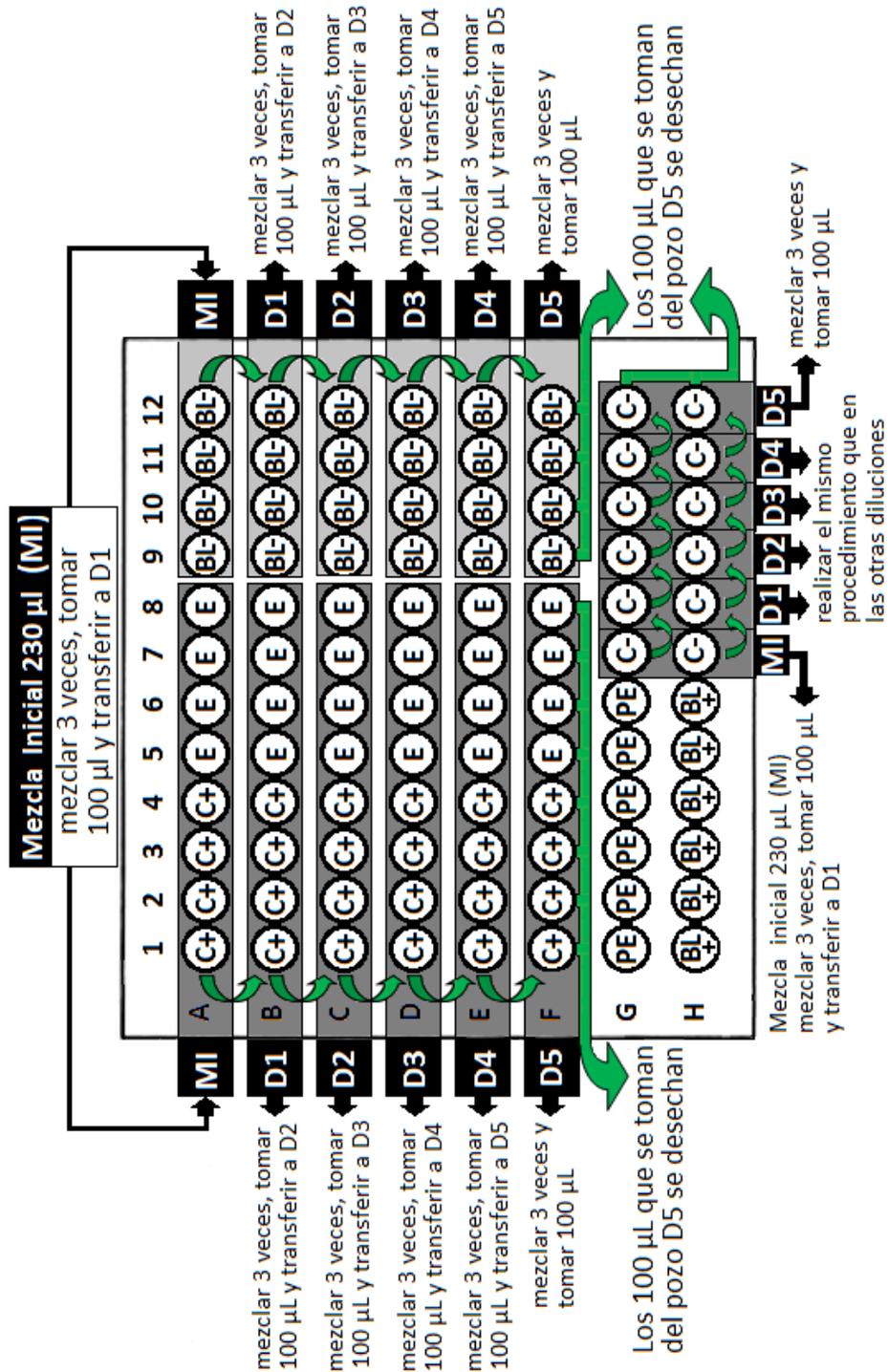
Anexo1. Curva de calibración de ácido gálico en microplaca (n=3).



Anexo 2. Método para la cuantificación de fenoles totales.



Anexo 3. Distribución de los reactivos para la determinación de la actividad antibacteriana.



Anexo 4. Distribución de la microplaca de 96 pozos para realizar pruebas de sensibilidad antibacteriana. De A1 a A4 hasta F1 a F4: Control positivo (C+) del disolvente. De A5 a A8 hasta F5 a F8: Extracto (E). De A9 a A12 hasta F9 a F12: Blanco negativo (BL-) del extracto. De G1 a G6: Prueba de esterilidad (PE). De H1 a H6: Crecimiento bacteriano (BL+). De G7 a H7 hasta G12 a H12: Control negativo (C-) del disolvente. MI: mezcla inicial. D1, D2, D3, D4 y D5 diluciones realizadas.

Anexo 5

Costo de inversión para el cultivo de hongos

La propuesta es cultivar y producir el hongo *Pleurotus levis* y *Pleurotus ostreatus* para ofrecerlo directamente en estado fresco, para su consumo. *Pleurotus* es un hongo conocido en varios países que se suelen consumirlo, por lo que comercializarlo fresco es una oportunidad de negocio. Para llevar a cabo este proceso se requiere una serie de materiales, en el **cuadro 1** se presenta una lista.

Cuadro 1. Inversión aproximada de material necesario para la producción de *Pleurotus levis* y *Pleurotus ostreatus* en formulación COLPOS 17.

Concepto	Cantidad	Precio por unidad (\$)	Total
Área de almacenamiento de los substratos			
Tambo de plástico con tapa de 200 L	10	210	1,050
Báscula granataria de 20 kg	1	2,500	2,500
Tinas de plástico con tapa 200 L	6	200	1,200
Pala de metal	1	70	70
Mesa plegable de plástico (122 cm x 76 cm)	1	800	800
Cubetas de plástico de 12 L	5	20	100
Área de preparación se substrato			
Extractor de aire de 127/220 volts (3/4 HP)	1	6,000	6,000
Báscula granataria de 10 kg	1	980	980
Tina de plástico de 500 L	1	750	750
Pala de metal	1	70	70
Ollas de presión de 21 litros	10	5,000	50,000
Parrillas con 3 quemadores	4	3,000	12,000
Bolsas de polipropileno con filtro de 13.5 x 80 cm	7,200	6	43,200
Pinzas de presión metálicas.	160	3	480
Vaso graduado de 1 litro	1	35	35
Mesa plegable de plástico (244 cm x 76 cm)	2	1,300	2,600
Área de inoculación			
Termosellador electrónico	1	1,000	1,000
Dosificador de alcohol etílico	1	30	30
Caja de papel absorbente (servilletas).	2	180	360
Semilla de hongo de <i>Pleurotus levis</i>	720 kg	30	21,600
Semilla de hongo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	720 kg	30	21,600
Tijeras.	1	25	25
Plumón.	2	15	30

Mesa plegable de plástico (244 cm x 76 cm)	2	1,300	2,600
Área de incubación			
Estantes metálicos.	75	400	30,000
Termómetro para lectura de temperatura interior exterior	1	200	200
Área de fructificación			
Estantes metálicos	75	400	30,000
Mochila fumigadora	1	850	850
Manguera de 30 metros de 1 pulgada	1	1,200	1,200
Escoba	1	30	30
Medidor de humedad	1	1,500	1,500
Extractor de aire 127 volts (1/4 HP)	1	1,500	1,500
Termómetro para lectura de temperatura interior exterior	1	200	200
Material extra			
Campana de flujo laminar	1	20,000	20,000
Caja de cerrillos	4	2	8
Jerga para limpiar	4	10	40
alcohol etílico 1 L	10	20	200
Bulto de yeso	60	50	3,000
Bulto de cal	15	30	450
Taras de plástico para cosechar	5	40	200
Refrigerador comercial de 4 puertas	1	10,000	10,000
Total=			268,458

Los precios sugeridos en la inversión son aproximados y pueden cambiar. La cantidad total de la inversión está calculada para un volumen de producción de 80 unidades de producción (UP) diarias por 90 días.

Volumen de producción

Con la formulación COLPOS-17 constituida por 6.43 kg de aserrín de encino, 1.23 kg de aserrín de *Bursera*, 1.28 kg de bagazo de caña de azúcar, 2.72 kg de olote de maíz, 2.97 kg de salvado de trigo, 450 g de Cal [Ca (OH₂)] y 1800 g de yeso (CaSO₄) y 26 L de agua, se pueden producir 12 unidades de producción con 1900 g de sustrato cada una.

En base a los resultados obtenidos, se puede proyectar lo siguiente:

Para la producción de *Pleurotus ostreatus*

Si de 7 unidades de producción se obtuvo 1 kg con 528 g de basidiocarpos frescos, entonces: Si se sembraran 40 unidades de producción, de las cuales cada una se prepararía de la siguiente manera: A una bolsa de polipropileno con filtro de 13.5 x 80 cm, se le agregaría 1900 g de la formulación COLPOS-17 y 200 g de semilla de *Pleurotus ostreatus*. La producción promedio diaria de basidiocarpos de cada unidad de producción una vez cosechadas sería de 218.33 g, por lo que la producción total promedio diaria de las 40 unidades sería de 8 kg con 730 g de basidiocarpos frescos. Entonces si el kilo de hongo se vendiera a \$ 45 pesos, se estaría recaudando en total \$392.8 pesos de venta.

Para la producción de *Pleurotus levis*

Si de 5 unidades de producción se obtuvo 2 kg con 466 g de basidiocarpos frescos, entonces: Si se sembraran 40 unidades de producción, de las cuales cada una se prepararía de la siguiente manera: A una bolsa de polipropileno con filtro de 13.5 x 80 cm, se le agregaría 1900 g de la formulación COLPOS-17 y 200 g de semilla de *Pleurotus levis*. La producción promedio diaria de basidiocarpos de cada unidad de producción una vez cosechadas sería de 493.26 g, por lo que la producción total promedio diaria de las 40 unidades sería de 19 kg con 720 g de basidiocarpos frescos. Entonces si el kilo de hongo se vendiera a \$ 45 pesos, se estaría recaudando en total \$887.4 pesos de venta.

De esta manera, si los gastos de inversión total para producir 80 UP diarias (40 UP de *Pleurotus levis* y 40 UP de *Pleurotus ostreatus*) por 3 meses es de \$268,458 pesos aproximadamente, entonces el volumen de producción diario y la recuperación del capital se describe en el **cuadro 2**.

Cuadro 2. Recuperación del capital diario en la producción de basidiocarpos

Hongo comestible	Volumen de producción diario (UP)	Basidiocarpos producidos diariamente (kg)	Capital recuperado diario (\$)	Total (\$)
<i>Pleurotus levis</i>	40	19.72	887.4	1,280.2
<i>Pleurotus ostreatus</i>	40	8.73	392.8	

Recuperación del capital

Si quisiéramos recuperar el capital invertido, se tendrá que seguir produciendo más de 3 meses y seguir sumando los costos extras del material que se va terminando. La recuperación del capital si se vendieran diariamente \$1,280.2 pesos por 90 días (3 meses) sería de \$115,218 pesos netos. Si tomamos en cuenta que a los 90 días se termina el material para hacer las unidades de producción, entonces se tendría que invertir de nuevo en la compra del material necesario para producir por otros 90 días la misma cantidad de basidiocarpos (**Cuadro 3**).

Cuadro 3. Inversión nueva de material para la producción de basidiocarpos por otros 90 días

Concepto	Cantidad	Precio por unidad (\$)	Total
Semilla de hongo de <i>Pleurotus levis</i>	720 kg	30	21,600
Semilla de hongo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	720 kg	30	21,600
Bolsas de polipropileno con filtro de 13.5 x 80 cm	7,200	6	43,200
Caja de papel absorbente (servilletas).	2	180	260
Caja de cerrillos	4	2	8
Bulto de yeso	60	50	3,000
Bulto de cal	15	30	450
alcohol etílico 1 L	10	20	200
Plumón.	2	15	30
Total=			90,348

Entonces calculamos la inversión total y la recuperación del capital del 1 año (**Cuadro 4**)

Cuadro 4. Cálculos de inversión total y recuperación del capital del 1 año

Primera inversión (3 meses)	Segunda inversión (3 meses)	Tercera Inversión (3 meses)	Cuarta Inversión (3 meses)	Total de la inversión (12 meses)
\$268,458	\$90,348	\$90,348	\$90,348	\$539,502
Primera recuperación del capital (3 meses)	Segunda recuperación del capital (3 meses)	Tercera recuperación del capital (3 meses)	Cuarta recuperación del capital (3 meses)	Total de capital recuperado (12 meses)
\$115,218	\$115,218	\$115,218	\$115,218	\$460,872
Total de la inversión del primer año	Total de capital recuperado del primer año	Total de capital que falta por recuperar en el primer año		
\$539,502	-	\$460,872	=	\$78,630

Ahora calculamos la inversión total y la recuperación del capital del 2 año (**Cuadro 5**)

Cuadro 5. Cálculos de inversión total y recuperación del capital del 2 año

Primera inversión (3 meses)	Segunda inversión (3 meses)	Tercera Inversión (3 meses)	Cuarta Inversión (3 meses)	Total de la inversión (12 meses)
\$90,348	\$90,348	\$90,348	\$90,348	\$361,392
Primera recuperación del capital (3 meses)	Segunda recuperación del capital (3 meses)	Tercera recuperación del capital (3 meses)	Cuarta recuperación del capital (3 meses)	Total de capital recuperado (12 meses)
\$115,218	\$115,218	\$115,218	\$115,218	\$460,872
Total de la inversión del segundo año	Total de capital que faltaba por recuperar en el primer año	Total invertido al segundo año y faltante del primer año		
\$361,392	\$78,630	\$440,022		
Total de capital recuperado del segundo año	Total invertido al segundo año y faltante del primer año	Recuperación del capital invertido y primera ganancia		
\$460,872	\$440,022	\$20,850		

Como se puede observar la recuperación del capital total invertido es a los dos años de trabajo, teniendo las primeras ganancias en el mes 24 de \$20,850 pesos. La ganancia total para el tercer año será de \$99,480 pesos.