



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

**POSTGRADO EN
ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL**

**CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA
ENZIMÁTICO DE LOS HONGOS
COMESTIBLES (*PLEUROTUS*) COMO UNA
ESTRATEGIA DE SELECCIÓN DE CEPAS
PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPRODUCTOS**

ROSA MARÍA DE LIMA PERALTA

**T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRA EN CIENCIAS

**PUEBLA, PUEBLA
2009**

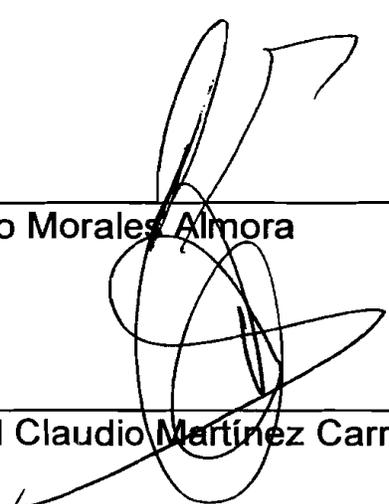
La presente tesis intitulada: CARACTERIZACION DEL SISTEMA ENZIMATICO DE LOS HONGOS COMESTIBLES (*PLEUROTUS*) COMO UNA ESTRATEGIA DE SELECCION DE CEPAS PARA LA PRODUCCION RURAL; realizada por la alumna: ROSA MARIA DE LIMA PERALTA; bajo la direcci6n del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRICOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

Consejero

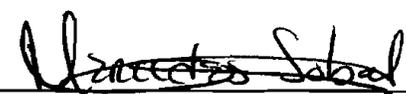


Dr. Porfirio Morales Almora

Asesor

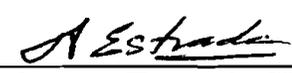
Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera

Asesor



Dra. Mercedes Sobal Cruz

Asesor



Dr. Arturo Estrada Torres

Puebla, Pue., a 30 de noviembre, 2009

CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA ENZIMÁTICO DE LOS HONGOS
COMESTIBLES (*Pleurotus*) COMO UNA ESTRATEGIA DE SELECCIÓN DE CEPAS
PARA LA PRODUCCIÓN RURAL

Rosa María De Lima Peralta, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2009

En el presente trabajo se investigo la producción extracelular de celulasas en medio líquido con 12 cepas nativas mexicanas y una comercial de *Pleurotus*. También se determino el contenido de proteína en los extractos y el peso seco de las colonias. Y se determino el coeficiente de correlación entre las variables producción de celulasa y proteína. Se encontró que el mejor medio de cultivo líquido para la producción de celulasas fue el sugerido por Elisashvili *et al* (2008a), con algunas modificaciones. Todas las cepas de *Pleurotus* crecieron sobre el medio de cultivo líquido con celulosa (Solka Floc) como fuente de carbono debido a que pudo producir enzimas celulolíticas para degradar el sustrato. Los resultados muestran que la actividad enzimática se incremento hasta llegar a un máximo a los 28 días en la mayoría de las cepas, a excepción de las cepas CP-50 y CP-328, donde el máximo se alcanzo a los 14 y 21 días, respectivamente. La cepa CP-328 de *P. pulmonarius* fue la que produjo la mayor cantidad de celulasa (8.1752 UI) a los 21 días de incubación. En cuanto a la producción de proteína la primera en alcanzar su óptima producción fue la cepa CP-50 (6.7869 µg/ml) a los 14 días, y el resto de las cepas al final de la cinética en estudio (28 días), siendo la cepa CP-98 la que mostró la mayor producción (18.4710 µg/ml). Se obtuvo una correlación significativa entre estas variables ($r^2= 0.661$), al día 28 de incubación. En referencia a la producción de biomasa, la cepa CP-171 exhibió la mayor producción con 9.8639 mg/ml, seguida de la cepa CP-267 con 9.5778 mg/ml, a los 28 y 14 días de incubación respectivamente.

Palabras clave: Especies de *Pleurotus*, Fermentación líquida, Actividad enzimática, Producción de proteína, Producción de biomasa.

CHARACTERIZATION OF THE ENZYMATIC SYSTEM OF EDIBLE MUSHROOMS
(*Pleurotus*) AS A STRATEGY FOR SELECTION OF STRAINS FOR RURAL
PRODUCTION

Rosa María De Lima Peralta, Ms. C.

Colegio de Postgraduados, 2009

In this paper the extracellular production of cellulases on liquid medium with 12 Mexican native and one commercial strains was studied. We also determined the protein content in the extracts and dry weight of the colonies. The coefficient of correlation between cellulase and protein production was also determined. It was found that the best liquid medium for cellulase production was that suggested by Elisashvili *et al* (2008a) with some modifications. All strains of *Pleurotus* grown on liquid culture medium with cellulose (Solka Floc) as the carbon source because it could produce cellulolytic enzymes to degrade the substrate. The results showed that the enzyme activity increased up to a maximum at 28 days in most strains, except strains CP-50 and CP-328, where the maximum was reached at 14 and 21 days, respectively. The CP-328 strain of *P. pulmonarius* was the one that produced the greatest amount of cellulase (8.1752 IU) at 21 days of incubation. For protein production the first to reach its optimal production was strain CP-50 (6.7869 µg/ml) at 14 days and the rest of the strains at the end of the kinetic study (28 day), being the CP-98 strain which showed the highest production (18.4710 µg/ml). There was a significant correlation between these variables ($r^2 = 0,661$), at day 28 of incubation. In relation to biomass production, CP-171 strain showed the highest production with 9.8639 mg/ml, followed by the strain CP-267 with 9.5778 mg/ml, at 28 and 14 days of incubation, respectively.

Keywords: *Pleurotus* species, liquid fermentation, enzyme activity, protein production, biomass production.

DEDICATORIAS

A Dios por todo lo que me ha dado en la vida, por ser esa luz divina que me guió a través de este difícil camino.

A mis padres

Olga Peralta Martínez y José De Lima Muñoz, de quienes aprendí a luchar por lo que deseo con responsabilidad, honestidad y humildad.

A mis hermanos

Guadalupe, Javier y Daniel, por confiar en mí y por el apoyo que me brindaron para culminar esta etapa de mi vida.

A mis sobrinas

Mary Cruz y Marianita por que en momentos de tristeza y estrés con sus sonrisas alegraban aquellos momentos tan difíciles.

A Víctor Pérez Tómax por su amor, comprensión y apoyo incondicional.

Y a todas aquellas personas que contribuyeron en la elaboración de esta tesis que hoy llega a su fin y que sin duda alguna no hubiese sido posible sin su ayuda y apoyo incondicional. Gracias a todos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), que hizo posible la continuación de mis estudios de Postgrado.

Al Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla por haberme admitido en el Programa en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional, para estudiar la maestría en Ciencias y brindarme los conocimientos para realizar la presente tesis.

Al Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla, por darme el apoyo requerido, en el transcurso de la presente investigación.

Al Dr. Porfirio Morales Almora, deseo expresarle mis más sinceros agradecimientos por todos los conocimientos que me transmitió, por estar siempre en el momento adecuado para supervisar mi trabajo de investigación, por alentarme en los momentos difíciles, para seguir con mayor ímpetu, por su paciencia y por sus críticas constructivas, en la realización de la presente tesis de investigación.

Al Dr. Daniel Martínez Carrera, por sus observaciones y recomendaciones durante la presente investigación.

A la Dra. Mercedes Sobal Cruz, mi agradecimiento por sus observaciones, asesoría y consejos de la presente tesis de investigación.

Al Dr. Arturo Estrada Torres, por la revisión de esta tesis y las correcciones pertinentes hizo a la misma, para mejorarla.

Al Dr. Mario Tornero Campante y al M.C. Isaac Tello Salgado, por su valiosa asesoría en el aspecto estadístico.

A la M.C. Patricia Ramírez Carrasco, mi agradecimiento por enseñarme la metodología para determinar la producción de proteína por la cepas en estudio.

A todos los profesores de la especialidad que contribuyeron en mi formación académica.

A los encargados del resguardo y mantenimiento del cepario, y elaboración de semilla en el laboratorio: M. C. Myrna Bonilla Quintero y Biól. Wilfrido Martínez Sánchez, respectivamente, quienes siempre me brindaron su apoyo en la realización de esta tesis.

A todos mis compañeros del laboratorio: M.C. Leticia Calderón Fernández, M.C. Katia Reyes Quintanar y M.C. Daniel Sihuanca Mendoza, les agradezco su gran amistad y todo lo que aprendí de cada uno de ellos.

ÍNDICE

Página

LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO DE REFERENCIA	3
2.1. Antecedentes históricos sobre el cultivo de los hongos comestibles...	3
2.2. Reseña histórica del cultivo de hongos comestibles en México.....	4
2.3. Producción comercial de hongos comestibles en México.....	5
2.4. Desarrollo.....	6
2.4.1. Desarrollo rural sostenible.....	7
2.5. Importancia de la biotecnología de los hongos comestibles en México.....	7
2.6. Los hongos y la agricultura sostenible.....	8
2.7. Importancia de las estrategias en el sector agrícola.....	9
2.8. Cultivo de <i>Pleurotus</i>	12
2.8.1. Contaminantes, plagas y enfermedades en el cultivo de <i>Pleurotus</i>	16
2.9. Aspectos biológicos del género <i>Pleurotus</i>	17
2.9.1. Ecología y distribución.....	17
2.9.2. Morfología.....	17
2.9.3. Taxonomía.....	18
2.9.4. Nutrición de los hongos.....	19
2.9.5. Valor nutricional de los hongos.....	21
2.9.5.1. Propiedades medicinales de las especies de <i>Pleurotus</i>	23
2.9.6. Reproducción de <i>Pleurotus</i>	24
2.9.7. Ciclo de vida de <i>Pleurotus</i>	24
3. MARCO TEÓRICO	26
3.1. Degradación de los sustratos agrícolas.....	26
3.2. Composición química de la lignocelulosa.....	28
3.3. Implicación de las enzimas en la degradación de los sustratos.....	31
3.4. Mecanismos de biodegradación de la lignocelulosa.....	34
3.5. Importancia industrial de las enzimas.....	35
3.6. Antecedentes de investigaciones relacionadas con la actividad enzimática de diversas cepas de hongos.....	37
4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	43
5. HIPÓTESIS	45
6. OBJETIVOS	45
7. MATERIALES Y MÉTODOS	46
7.1. Material biológico.....	46

7.2. Investigaciones preliminares para determinar el medio de cultivo que promueva la actividad de la enzima celulasa.....	47
7.3. Inoculación de los medios de cultivo.....	48
7.4. Muestreo.....	48
7.5. Obtención del extracto enzimático.....	48
7.6. Análisis de las variables.....	49
7.6.1. Determinación de la actividad de la enzima celulasa.....	49
7.6.2. Determinación de la producción de biomasa.....	53
7.6.3. Determinación de proteína.....	53
7.7. Caracterización macroscópica de las colonias.....	55
7.8. Análisis estadístico.....	55
8. RESULTADOS.....	56
8.1. Análisis de las variables.....	56
8.1.1. Curva estándar para celulasa.....	56
8.1.2. Curva estándar para proteína.....	56
8.2. Caracterización del material biológico cultivado en medio de cultivo	
Líquido.....	57
8.2.1. Cepa CP-18 (<i>Pleurotus cystidiosus</i>).....	57
8.2.2. Cepa CP-30 (<i>P. levis</i>).....	59
8.2.3. Cepa CP-44 (<i>P. djamor</i>).....	61
8.2.4. Cepa CP-50 (<i>P. ostreatus</i>).....	63
8.2.5. Cepa CP-98 (<i>P. sp.</i>).....	66
8.2.6. Cepa CP-120 (<i>P. djamor</i>).....	68
8.2.7. Cepa CP-171 (<i>P. djamor</i>).....	70
8.2.8. Cepa CP-194 (<i>P. sp.</i>).....	72
8.2.9. Cepa CP-253 (<i>P. djamor</i>).....	75
8.2.10. Cepa CP-257 (<i>P. djamor</i>).....	77
8.2.11. Cepa CP-261 (<i>P. djamor</i>).....	79
8.2.12. Cepa CP-267 (<i>P. ostreatus</i>).....	81
8.2.13. Cepa CP-328 (<i>P. pulmonarius</i>).....	83
8.3. Comparación de la actividad enzimática y proteína entre todas las cepas a diferentes días de incubación	85
8.3.1. A tiempo cero.....	85
8.3.2. A los 14 días de incubación.....	87
8.3.3. A los 21 días de incubación.....	88
8.3.4. A los 28 días de incubación.....	90
8.4. Estudio comparativo de cepas con mayores capacidades de degradación de sustratos a los 28 días de incubación.....	94
8.5. Caracterización de las cepas en estudio, en el medio de cultivo líquido Solka Floc.....	97
9. DISCUSIÓN.....	99
10. CONCLUSIONES.....	104
11. DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA DE SELECCIÓN DE CEPAS.....	105
12. LITERATURA CITADA.....	109
13. ANEXOS.....	115

LISTA DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Composición de aminoácidos esenciales (g de aminoácidos/100 g de proteína cruda corregida) en <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Lentinula edodes</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Volvariella volvacea</i>	22
Cuadro 2	Antecedentes relacionados con la actividad de celulasas por diferentes cepas de hongos mediante fermentación líquida.....	38
Cuadro 3	Comparación de la EB mostrada por cepas de <i>Pleurotus</i> en diversas fórmulas.....	39
Cuadro 4	Comparación de la EB mostrada por cepas de <i>Pleurotus</i> en diversas fórmulas.....	39
Cuadro 5	Antecedentes relacionados con la actividad de celulasas por diferentes cepas de hongos comestibles mediante fermentación sólida.....	40
Cuadro 6	Cepas del género <i>Pleurotus</i> empleadas en esta investigación...	47
Cuadro 7	Diluciones de glucosa y sus respectivas concentraciones ($\mu\text{Mol/ml}$), para realizar la curva estándar.....	52
Cuadro 8	Preparación de las concentraciones de la solución estándar de seroalbúmina bovina.....	54
Cuadro 9	Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-18 de <i>Pleurotus cystidiosus</i> , a 28 días de incubación a 25°C, usando medio líquido Solka Floc.....	58
Cuadro 10	Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-18 de <i>Pleurotus cystidiosus</i> , a 28 días de incubación a 25°C usando medio líquido Solka Floc y, la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.....	58
Cuadro 11	Actividad específica de la celulasa por la cepa CP-18 de <i>Pleurotus cystidiosus</i> , a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	59
Cuadro 12	Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-30 de <i>Pleurotus levis</i> , a 28 días de incubación a usando medio líquido Solka Floc.....	60
Cuadro 13	Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-30 de <i>Pleurotus levis</i> , a 28 días de incubación a 25°C usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.....	60
Cuadro 14	Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-30 de <i>Pleurotus levis</i> , a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	61

Cuadro 15	Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-44 de <i>Pleurotus djamor</i> , a 28 días de incubación a 25°C usando medio líquido Solka Floc.....	62
Cuadro 16	Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-44 de <i>Pleurotus djamor</i> , a 28 días de incubación a 25°C usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.....	62
Cuadro 17	Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-44 de <i>Pleurotus djamor</i> , a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	63
Cuadro 18	Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , a 28 días de incubación a 25° usando medio líquido Solka Floc.....	64
Cuadro 19	Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , a 28 días de incubación a 25°C usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.....	65
Cuadro 20	Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , a 28 días de incubación usando medio líquido solka floc.....	66
Cuadro 21	Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-98 de <i>Pleurotus</i> spp., a 28 días de incubación a 25°C usando medio líquido Solka Floc.....	66
Cuadro 22	Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-98 de <i>Pleurotus</i> spp., a 28 días de incubación a 25°C usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.....	67
Cuadro 23	Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-98 de <i>Pleurotus</i> spp., a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	68
Cuadro 24	Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-120 de <i>Pleurotus djamor</i> , a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	69
Cuadro 25	Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-120 de <i>Pleurotus djamor</i> , a 28 días de incubación a 25°C usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.....	69

Cuadro 26	Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-120 de <i>Pleurotus djamor</i> , a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	70
Cuadro 27	Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-171 de <i>Pleurotus djamor</i> , a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	71
Cuadro 28	Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-171 de <i>Pleurotus djamor</i> , a 28 días a 25°C de incubación usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.....	71
Cuadro 29	Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-171 de <i>Pleurotus djamor</i> , a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	72
Cuadro 30	Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-194 de <i>Pleurotus</i> spp., a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	73
Cuadro 31	Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-194 de <i>Pleurotus</i> spp., a 28 días a 25°C de incubación usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.....	74
Cuadro 32	Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-194 de <i>Pleurotus</i> spp., a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	75
Cuadro 33	Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-253 de <i>Pleurotus djamor</i> , a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	75
Cuadro 34	Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-253 de <i>Pleurotus djamor</i> , a 28 días a 25°C de incubación usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.....	76
Cuadro 35	Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-253 de <i>Pleurotus djamor</i> , a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	77
Cuadro 36	Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-257 de <i>Pleurotus djamor</i> , a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	77

Cuadro 37	Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-257 de <i>Pleurotus djamor</i> , a 28 días a 25°C de incubación usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.....	78
Cuadro 38	Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-257 de <i>Pleurotus djamor</i> , a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	79
Cuadro 39	Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-261 de <i>Pleurotus djamor</i> , a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	79
Cuadro 40	Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-261 de <i>Pleurotus djamor</i> , a 28 días a 25°C de incubación usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.....	80
Cuadro 41	Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-261 de <i>Pleurotus djamor</i> , a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	81
Cuadro 42	Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasas proteína y biomasa para la cepa CP-267 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	81
Cuadro 43	Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-267 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , a 28 a 25°C días de incubación usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.....	82
Cuadro 44	Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-267 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	83
Cuadro 45	Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-328 de <i>Pleurotus pulmonarius</i> , a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	83
Cuadro 46	Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-328 de <i>Pleurotus pulmonarius</i> , a 28 días a 25°C de incubación usando medio líquido solka floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.....	84
Cuadro 47	Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-328 de <i>Pleurotus pulmonarius</i> , a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.....	85

Cuadro 48	Análisis de varianza 13 cepas pertenecientes al género <i>Pleurotus</i> al tiempo cero de incubación, usando medio líquido Solka Floc.....	86
Cuadro 49	Comparación de medias por el método de Duncan y formación de grupos homogéneos de 13 cepas pertenecientes al género <i>Pleurotus</i> a tiempo cero de incubación en fermentación líquida.....	86
Cuadro 50	Análisis de varianza 13 cepas pertenecientes al género <i>Pleurotus</i> a los 14 días de incubación, usando medio líquido Solka Floc.....	87
Cuadro 51	Comparación de medias por el método de Duncan y formación de grupos homogéneos de 13 cepas pertenecientes al género <i>Pleurotus</i> a los 14 días de incubación en fermentación líquida.....	88
Cuadro 52	Correlación entre la producción de celulasa y proteína de las cepas en estudio a los 14 días de incubación en medio líquido Solka Floc.....	88
Cuadro 53	Análisis de varianza 13 cepas pertenecientes al género <i>Pleurotus</i> a los 21 días de incubación, usando medio líquido Solka Floc.....	89
Cuadro 54	Comparación de medias por el método de Duncan y formación de grupos homogéneos de 13 cepas pertenecientes al género <i>Pleurotus</i> a los 21 días de incubación en fermentación líquida.....	90
Cuadro 55	Correlación entre la producción de celulasa y proteína de las cepas en estudio a los 21 días de incubación en medio líquido Solka Floc.....	90
Cuadro 56	Análisis de varianza 13 cepas pertenecientes al género <i>Pleurotus</i> a los 28 días de incubación, usando medio líquido Solka Floc.....	91
Cuadro 57	Comparación de medias por el método de Duncan y formación de grupos homogéneos de 13 cepas pertenecientes al género <i>Pleurotus</i> a los 28 días de incubación en fermentación líquida.....	92
Cuadro 58	Correlación entre la producción de celulasa y proteína de las cepas en estudio a los 28 días de incubación en medio líquido Solka Floc.....	92
Cuadro 59	Análisis de varianza 6 cepas pertenecientes al género <i>Pleurotus</i> a los 28 días de incubación, usando medio líquido Solka Floc.....	95
Cuadro 60	Comparación de medias por el método de Duncan y formación de grupos homogéneos de 6 cepas pertenecientes al género <i>Pleurotus</i> a los 28 días de incubación en fermentación líquida.....	96

Cuadro 61	Correlación entre la producción de celulasa y proteína de las cepas elegidas a los 28 días de incubación en medio líquido Solka Floc.....	97
Cuadro 62	Comparación de la EB mostrada por cepas de <i>Pleurotus</i> en diversas fórmulas.....	108
Cuadro 63	Comparación de la EB mostrada por cepas de <i>Pleurotus</i> en diversas fórmulas.....	108

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Partes principales de <i>Pleurotus</i> spp.....	18
Figura 2	Ciclo biológico de <i>Pleurotus</i> a) basidiospora; b) germinación y formación del micelio homocarión; c) fusión de dos micelios homocarióticos compatibles; d) formación del micelio dicarión; e) formación de primordios; f) desarrollo del carpóforo; g) himenio; h) formación de los basidios; i) basidio diferenciado y basidiosporas.....	25
Figura 3	Diferentes capas que forman la pared de una célula vegetal adulta.....	27
Figura 4	Estructura química de la celulosa.....	29
Figura 5	Estructura de la hemicelulosa.....	30
Figura 6	Estructura de la lignina.....	31
Figura 7	Representación esquemática que muestra la formación del complejo enzima-sustrato y su conversión en productos.....	32
Figura 8	Representación esquemática, donde se muestra la hidrólisis de la celulosa microcristalina y amorfa, por el sistema de celulasas.....	34
Figura 9	Esquema general que muestra la metodología propuesta en este trabajo de investigación.....	46
Figura 10	Diagrama general de la metodología utilizada para determinar la actividad enzimática, producción de la biomasa y de proteínas, así como la caracterización macroscópica de las cepas de <i>Pleurotus</i> en medio de cultivo líquido con Solka Floc, como fuente de carbono.....	49
Figura 11	Diagrama para determinar la actividad de la enzima celulasa en las cepas cultivadas en medio de cultivo líquido con Solka Floc, como fuente de carbono.....	50
Figura 12	Curva estándar para la determinación de la actividad de la celulasa.....	56
Figura 13	Curva estándar para determinar la cantidad de proteína producida por las cepas en estudio.....	57
Figura 14	Colonización de <i>P. cystidiosus</i> (CP-18), sobre medio de cultivo líquido Solka Floc, a 28 días de incubación.....	57
Figura 15	Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-18 de <i>Pleurotus cystidiosus</i> , creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.....	59
Figura 16	Colonización de <i>P. levis</i> (CP-30), sobre medio de cultivo líquido Solka Floc, a 28 días de incubación.....	59
Figura 17	Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-30 de <i>Pleurotus levis</i> , creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.....	61

Figura 18	Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-44 de <i>Pleurotus djamor</i> , creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.....	63
Figura 19	Colonización de <i>P. ostreatus</i> (CP-50), sobre medio de cultivo líquido Solka Floc, a 28 días de incubación.....	64
Figura 20	Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-50 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.....	65
Figura 21	Colonización de <i>P. sp.</i> (CP-98), sobre medio de cultivo líquido Solka Floc, a 28 días de incubación.....	66
Figura 22	Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-98 de <i>Pleurotus sp.</i> , creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.....	67
Figura 23	Colonización de <i>P. djamor</i> (CP-120), sobre medio de cultivo líquido Solka Floc, a 28 días de incubación.....	68
Figura 24	Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-120 de <i>Pleurotus djamor</i> , creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.....	70
Figura 25	Colonización de <i>P. djamor</i> (CP-171), sobre medio de cultivo líquido Solka Floc, a 28 días de incubación.....	70
Figura 26	Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-171 de <i>Pleurotus djamor</i> , creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.....	72
Figura 27	Colonización de <i>P. spp.</i> (CP-194), sobre medio de cultivo líquido Solka Floc, a 28 días de incubación.....	73
Figura 28	Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-194 de <i>Pleurotus spp.</i> , creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.....	74
Figura 29	Colonización de <i>P. djamor</i> (CP-253), sobre medio de cultivo líquido Solka Floc, a 28 días de incubación.....	75
Figura 30	Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-253 de <i>Pleurotus djamor</i> , creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.....	76
Figura 31	Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-257 de <i>Pleurotus djamor</i> , creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.....	78
Figura 32	Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-261 de <i>Pleurotus djamor</i> , creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.....	80
Figura 33	Colonización de <i>P. ostreatus</i> (CP-267), sobre medio de cultivo líquido solka floc, a 28 días de incubación.....	81

Figura 34	Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-267 de <i>Pleurotus ostreatus</i> , creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.....	82
Figura 35	Colonización de <i>P. pulmonarius</i> (CP-328), sobre medio de cultivo líquido Solka Floc, a 28 días de incubación.....	83
Figura 36	Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-328 de <i>Pleurotus pulmonarius</i> , creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.....	84
Figura 37	Comparación de la producción de biomasa por las cepas en estudio a diferentes días de incubación en el medio de cultivo Solka Floc.....	85
Figura 38	Comparación de la actividad enzimática entre todas las cepas a diferentes días de incubación en el medio de cultivo Solka Floc.....	93
Figura 39	Comparación de la producción de proteína de las cepas en estudio a diferentes días de incubación en el medio de cultivo Solka Floc.....	94
Figura 40	Actividad enzimática (A) y producción de proteína (B) de las cepas elegidas, creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.....	96
Figura 41	Comparación de la apariencia del medio de cultivo líquido Solka Floc inoculado con la cepa CP-253 de <i>P. djamor</i> y CP-328 de <i>P. pulmonarius</i> (B), al término de la cinética en estudio (28 días).....	98
Figura 42	Cinética de la producción de la celulasa de las 13 cepas de <i>Pleurotus</i> cultivadas en medio líquido con Solka Floc como fuente de carbono. Los números de las cepas corresponden a los del cuadro 4.....	100
Figura 43	Cinética de la producción de la proteína de las 13 cepas de <i>Pleurotus</i> cultivadas en medio líquido con Solka Floc como fuente de carbono. Los números de las cepas corresponden a los del cuadro 4.....	101

1. INTRODUCCIÓN

En México una de las mejores alternativas para producir alimentos de contenidos altos en proteínas y vitaminas a partir de materiales de desecho, es el cultivo de hongos comestibles, ya que se obtienen grandes cantidades en pequeñas áreas mediante técnicas sencillas, de bajo costo y en cortos períodos de tiempo (Sobal, 1988). Las especies comestibles cultivadas en orden de importancia son: *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, *Pleurotus*, *Auricularia*, *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. y *Volvariella volvacea* (Bull.: Fr) Sing. (Chang, 1996).

El género *Pleurotus* (hongos ostra) comprende algunos de los hongos comestibles más populares debido a sus propiedades organolépticas favorables y medicinales, a su crecimiento vigoroso y a las condiciones de cultivo (Gregori, 2007). Estos hongos pueden ser cultivados en una amplia variedad de desechos lignocelulósicos disponibles, tales como: pajas de cereales, bagazo de caña, aserrín, desechos de algodón, hojas de plátano y pulpa de café, entre otros (Mora y Martínez-Carrera, 2007), con la finalidad de producir alimento humano y animal, enzimas y compuestos medicinales, o para la degradación y detoxificación de compuestos xenobióticos presentes en la mayoría de residuos industriales.

La habilidad de estos hongos para degradar materiales lignocelulósicos se debe a su eficiente sistema enzimático, el cual produce hidrolasas (celulasas y hemicelulasas), que son responsables de la degradación de polisacáridos; así como oxidasas que degradan la lignina (lignolíticas) y abren los anillos fenílicos (Sánchez, 2009). Por lo tanto las cepas con alta producción de estas enzimas podrían mostrar ventajas durante la etapa de colonización, biodegradación de los sustratos y serían una parte determinante en la producción de los hongos. (Buswell *et al.*, 1996).

En el caso particular del género *Pleurotus*, las actividades de lacasas y endoglucanasas han sido asociadas con las etapas de colonización y fructificación de estos hongos (Salmones y Mata, 2002). Por tal motivo, el objetivo de este trabajo de investigación es conocer a través de métodos bioquímicos la relación entre la

producción de celulasa, proteína y biomasa de diversas cepas pertenecientes al género *Pleurotus*, en fermentación líquida, con la finalidad de que estos métodos permitan llevar a cabo una preselección de las cepas en estudio a nivel de fase de laboratorio. Y de esta manera sugerir las cepas que presenten la mayor producción de celulasa en medio de cultivo, para cultivarlas en sustratos lignocelulósicos; ya que esto sería un indicador de cepas que invadan en menor tiempo el sustrato y produzcan eficiencias biológicas altas; y como resultado de este proceso de selección, los productores, al contar con las cepas adecuadas, obtendrían mayores beneficios económicos.

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1. Antecedentes históricos sobre el cultivo de los hongos comestibles

Los hongos han estado ligados al hombre desde tiempos inmemoriales. Los estudios realizados sobre estos organismos señalan su amplia distribución en diversos nichos ecológicos y su papel es relevante en relación con los hábitos alimenticios del hombre y por sus propiedades toxicológicas (Guzmán *et al.*, 1993a).

El consumo de hongos comestibles desde épocas remotas se encuentra localizado en tres regiones principales del mundo: en el sureste de Asia, Europa y Mesoamérica (Martínez-Carrera *et al.*, 1993). El cultivo de hongos comestibles en estas regiones, se registra por primera vez en los siglos VII y X en China con *Auricularia* spp. y *Flammulina* spp., respectivamente. En el siglo XI se cultivó *Lentinula edodes* (Berk.) Sing. conocido como shiitake. Y en Francia en el año 1600, se cultiva por primera vez el champiñón (*Agaricus bisporus*).

El cultivo empírico de los hongos comestibles pertenecientes al género *Pleurotus* tuvo sus inicios en Alemania, alrededor de 1917, empleando micelio silvestre para la inoculación de troncos. Sin embargo el primer cultivo a gran escala empleando troncos como sustrato, sólo fue posible hasta 1969 en Hungría. A partir de entonces, el cultivo de *Pleurotus* a pequeña y gran escala se ha desarrollado rápidamente en diversas partes del mundo, empleando los subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales disponibles regionalmente. Actualmente aunque el champiñón (*Agaricus*) ocupa el primer lugar, tanto *Pleurotus* como el Shiitake (*Lentinula edodes*) compiten por el segundo y tercer lugar en la producción comercial de hongos comestibles a nivel mundial. Es probable que la producción comercial de *Pleurotus* continúe incrementándose en el corto plazo, por las siguientes razones: 1) existen un gran número de especies potencialmente cultivables; 2) las tecnologías de producción son relativamente sencillas y de bajo nivel de inversión; 3) se han desarrollado cepas comerciales con amplio rango de temperaturas de fructificación y sustratos de cultivo; y 4) las fructificaciones son bien aceptadas por los consumidores en muchos países (Mora y Martínez-Carrera, 2006).

2.2. Reseña histórica del cultivo de hongos comestibles en México

El cultivo comercial de hongos en nuestro país se inició en el año de 1933 (Martínez-Carrera *et al.*, 1991), con los llamados comercialmente champiñones, que pertenecen al género *Agaricus*. El cultivo de estos hongos comestibles inicio en un rancho cercano a Texcoco, Estado de México, propiedad del Sr. José Leven Zdravie (Martínez-Carrera *et al.*, 1991). Esto convirtió al país en tercer lugar de América, donde se emprendía dicho cultivo, solo antecedido por E.U.A (1880) y Canadá (1912) (Martínez-Carrera *et al.*, 2000).

En 1939 después de notables esfuerzos y ensayos constantes, Leven Zdravie logró establecer en el rancho Tonalco la primera planta productora de hongos en México. La semilla utilizada en este caso provenía de Francia. Sin embargo, dicha planta era muy rústica y todavía funcionaba en un plan experimental. La primera cosecha verdadera y estable se logró hasta 1941, a partir de camellones de sustrato formados debajo de una tejavana. En 1947, Leven Zdravie se asocio con los señores Víctor Cano Faro, José Cano y Antonio Pacheco, esta sociedad cultivó champiñón durante más o menos dos años y también realizó a pequeña escala los primeros enlatados de hongos comestibles en México. Posteriormente esta sociedad se disolvió y Víctor Cano decidió continuar en la producción del Champiñón y, a finales de 1949, fundó en Cuajimalpa, D.F., la planta “Hongos de México, S.A. de C.V.” En 1954 en esta planta se construyó el primer lugar de producción de inóculo o semilla en México. Su construcción permitió eliminar la seria dependencia que se tenía del extranjero en el suministro de semilla. También en este año Cano Faro invitó nuevamente a Leven Zdravie a trabajar como técnico encargado del proceso de producción en su empresa. En 1974 por primera vez en México, se cultivó en Cuajimalpa una especie de hongo comestible diferente al champiñón, cuyo nombre científico corresponde a la especie *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kumm. al importar de Europa pacas de trigo previamente inoculadas con micelio de esta especie. Inicialmente como había ocurrido antes con el champiñón, la venta de este hongo era bastante difícil, ya que poca gente lo conocía. Sin embargo en la actualidad su distribución en el mercado es bastante amplia y se le comercializa con el nombre de setas (Martínez-Carrera *et al.*, 1991).

2.3. Producción comercial de hongos comestibles en México

Actualmente la producción de hongos comestibles en México ofrece notables ventajas sociales, económicas y ecológicas. Se estima que la producción comercial en fresco es de aproximadamente 28,895 toneladas anuales. Nuestro país es el mayor productor de Latinoamérica, ya que genera alrededor del 56% de la producción total de esa región y lo ubica como el 18º productor a nivel mundial. El monto actual de las operaciones comerciales supera los 73 millones de dólares, generando alrededor de 15 mil empleos directos e indirectos, y la importancia ecológica de esta actividad económica radica en la utilización y reciclaje de más de 280,000 toneladas anuales de subproductos agrícolas (Martínez-Carrera *et al.*, 2000).

A diferencia de otros países donde el cultivo de hongos comestibles es un negocio privado, su evolución en México ha tenido dos vertientes principales: el desarrollo industrial privado y la producción rural por el sector social. Con respecto al primero, el sector industrial mexicano se encuentra diversificado y en pleno desarrollo, ya han logrado establecerse no tan solo diversas empresas productoras de hongos comestibles, sino también empresas distribuidoras, exportadoras, importadoras e incluso generadoras de fertilizantes orgánicos. Existen siete grandes empresas productoras de hongos comestibles, las cuales son: “Hongos Leben S.A.”, “Hongos de México S.A.”, “*Monterey Mushrooms, Inc*”, “Alimentos Selectos de Tlaxcala, S.A.”, “Champiñones Los Altos, S.A.”, “Hongos del Monte, S.A.”, “Champiñones el Riojal, S.A.”, estas empresas producen principalmente champiñones (*Agaricus*), setas (*Pleurotus*) y shiitake (*Lentinula*). Por otro lado la producción rural de hongos comestibles ha dado lugar a un gran número de pequeños productores, principalmente de setas dada la sencillez y bajo costo de implementación de su sistema de cultivo. Este tipo de producción es generalmente temporal, por la forma en que la unidad de producción campesina ha integrado el cultivo de hongos como una actividad adicional (Martínez-Carrera *et al.*, 2000).

El cultivo de setas se realiza en la mayoría de los estados de la República Mexicana. Actualmente se observan cultivos a diferentes niveles en 21 de las 32 entidades

federativas: Aguascalientes, Chiapas, Chihuahua, Colima, D.F., Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Edo. de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Tabasco, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (Sánchez-Vázquez *et al.*, 2007). Esto indica la importancia económica, social y ecológica que tiene su cultivo.

2.4. Desarrollo

En el lenguaje ordinario, el desarrollo describe un proceso a través del cual se liberan todas las potencialidades de un objeto u organismo, hasta que alcanza su forma natural, completa hecha y derecha. El término desarrollo ha recibido diferentes connotaciones a través del tiempo; inicialmente el desarrollo o evolución de los seres vivos en biología se refirió al proceso a través del cual los organismos logran realizar su potencialidad genética: la forma natural del ser prevista por el biólogo. El desarrollo se frustra siempre que la planta o el animal no logran cumplir su programa genético, o lo sustituyen por otro.

Entre 1759 (Wolff) y 1859 (Darwin), el desarrollo evolucionó de una noción de transformación que supone un avance hacia la forma apropiada de ser a una concepción de cambio que implica encaminarse hacia una forma cada vez más perfecta. Por otro lado Justus Moser, un conservador que fundó la historia social, empleó la palabra *Entwicklung* para aludir al proceso gradual de cambio social. Posteriormente el desarrollo se convirtió en la categoría central del trabajo de Marx: lo mostró como un proceso histórico que se desenvuelve con el mismo carácter necesario de las leyes naturales.

Un acontecimiento importante ocurrió el 20 de enero de 1949, el día en el que el presidente Truman tomó posesión, se abrió una era para el mundo, la era del desarrollo. En su informe Truman empleó la palabra subdesarrollo para referirse a los países con menor grado de avances científicos, progreso industrial y calidad de vida. Ese día dos mil millones de personas se volvieron subdesarrolladas. Posteriormente, en el aspecto económico este término se empobreció más en las manos de los primeros promotores de lo mencionado anteriormente por Truman, el desarrollo se

redujo a crecimiento económico. El desarrollo económico consistía simplemente en el crecimiento del ingreso económico por persona en las áreas económicamente subdesarrolladas.

Finalmente el Consejo económico y social de naciones unidas (ECOSOC) recomendó en 1962 la integración de los aspectos social y económico en el desarrollo. Ese mismo año, las Propuestas de Acción de la Primera Década del Desarrollo de Naciones Unidas (1960-1970) establecieron que: *“El problema de los países subdesarrollados no es mero crecimiento, si no desarrollo... El desarrollo es crecimiento más cambio. El cambio a su vez es social y cultural tanto como económico... El concepto clave debe ser mejorar la calidad de la vida de la gente”* (Casas, 2001)

2.4.1. Desarrollo rural sostenible

Desarrollo sostenible De acuerdo con la Comisión Mundial del Medio Ambiente y Desarrollo, 1988, se requiere que todas las naciones persigan un tipo de desarrollo que integre la producción con la preservación y aumento de los recursos y que garantice la disponibilidad de un medio de vida conveniente y un acceso equitativo a los recursos. Bajo esta premisa la Comisión mencionada introdujo el concepto de desarrollo sostenible como aquel que satisface las necesidades de la generación presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras (Vargas y Blandón, 1996).

2.5. Importancia de la biotecnología de los hongos comestibles en México

La biotecnología de la producción de hongos comestibles constituye una alternativa para la obtención de alimento sin daño del entorno ecológico, por lo que esta ha adquirido gran relevancia social, económica y ecológica a nivel mundial. En el aspecto social y económico, se generan fuentes de empleo al llevar a cabo la producción de hongos comestibles ya sea a pequeña o gran escala, y como resultado de este proceso biotecnológico se obtiene un excedente en su ingreso económico; además de producir: 1) Alimento humano de buena calidad nutricional y con propiedades medicinales (anticancerígenas, antibióticas, que reducen el nivel del

colesterol, y la hipertensión, antitrombóticas, antidiabéticas); 2) Suplementos dietéticos; y 3) Enzimas y productos metabólicos con amplio potencial de utilización en la industria. Por otro lado, en el aspecto ecológico, el sustrato residual degradado después de la producción de hongos comestibles, constituye un subproducto que tiene diversas aplicaciones, tales como: 1) Abono orgánico para la industria hortícola y de floricultura; 2) Sustrato nematicida; y 3) Sustrato para la bioremediación *in situ* de agua y suelo en regiones contaminadas por hidrocarburos o residuos orgánicos similares a la lignina. Este sustrato parcialmente degradado contiene una gran variedad de enzimas extracelulares y sustancia nutritivas, las cuales al aplicarse directamente a zonas contaminadas permiten la degradación de compuestos contaminantes y favorecen el desarrollo de otros microorganismos (Mora y Martínez-Carrera, 2006).

2.6. Los hongos y la agricultura sostenible

La sociedad ha obtenido la mayor parte de los satisfactores alimentarios necesarios para su desarrollo gracias a la agricultura, sin embargo la satisfacción de esta demanda se logra cada vez más a costa de la mayor degradación ecológica del ambiente. Este fenómeno ha provocado todo un movimiento para desarrollar sistemas agrícolas más eficientes, productivos y rentables, que no perjudiquen tanto la salud del consumidor como la del ambiente y sobre todo que sean sostenibles en el largo plazo.

Producción *versus* conservación constituye uno de los grandes conflictos y dilemas de la agricultura sostenible. En las circunstancias actuales donde los procesos agrícolas modernos tienen balances negativos por ser básicamente extractivos, ambos objetivos pueden contraponerse fácilmente. Por ejemplo no puede incrementarse la producción agrícola en un área dada sin afectarla gravemente desde el punto de vista ecológico y sin elevar de manera significativa los costos para su conservación. En este sentido la producción de hongos comestibles constituye una alternativa que puede contribuir a manejar dicho conflicto, aprovechando su gran capacidad para la degradación eficiente de lignina y celulosa. Se trata de una biotecnología compatible con el medio físico, económico y social, si se aplica

apropiadamente. Permite un aumento en el rendimiento económico por unidad de área, sin aumentar la presión sobre los recursos naturales disponibles y los costos de conservación a largo plazo, toda vez que se recicla el subproducto degradado por acción del hongo (Martínez–Carrera *et al.*, 1993).

Otro aspecto importante, en comparación con otros cultivos comerciales y agroindustrias, es la marcada eficiencia del proceso biotecnológico de producción de hongos comestibles para utilizar y convertir el agua y la energía en alimento humano. Se ha estimado que para producir 1 kg de hongos comestibles (*Pleurotus*) empleando tecnologías rústicas se requieren 28 L de agua, en un período de 28-30 días después de la inoculación. Esta cantidad y período de producción son mucho menores que las estimaciones para otros alimentos y forrajes, tales como la papa (500 L/Kg), trigo y alfalfa (900 L/Kg), sorgo (1,110 L/Kg), maíz (1,400 L/Kg), arroz (1,912 L/Kg), soya (2,000 L/Kg), carne de pollo (3,500 L/Kg), y carne de res (100,000 L/Kg). Por consiguiente se requieren 3,571 veces más agua para producir 1 Kg de carne res que para obtener 1 Kg de hongos comestibles (Martínez–Carrera *et al.*, 2000).

Es indudable que la biotecnología de hongos comestibles en México es fundamental para fortalecer la sostenibilidad agrícola mediante el aprovechamiento y reciclaje de subproductos agroindustriales y forestales; para obtener alimento humano con alto valor medicinal, proteínico, y comercial, para mejorar la calidad nutricional del alimento para ganado; y para aumentar la rentabilidad de los cultivos agrícolas.

2.7. Importancia de las estrategias en el sector agrícola

La estrategia como término y objeto de estudio, es desarrollada desde tiempos atrás en las actividades militares (Tset-tung, 1936) y retomada posteriormente por las actividades comerciales (Mintzberg, 1991). En la agricultura es incluida por primera vez de acuerdo a la información documental, hace 25 años en el Plan Puebla; de hecho es el primer Proyecto de Desarrollo Agrícola Regional que involucra el concepto de estrategia como guía de sus acciones y decisiones (Casas, 1994).

Todos los planes y programas de desarrollo tienen una estrategia que es considerada la columna vertebral de estos planes y programas y que sin las estrategias es casi imposible obtener buenos resultados. Por ello las estrategias son acciones que se realizan en forma ordenada, sistemática y dirigida para conseguir el fin deseado (Baltazar, 2002).

El concepto de estrategia ha sido objeto de múltiples interpretaciones, de modo que no existe una única definición. Sin embargo en el caso específico de las estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional existen definiciones citadas por numerosos autores, en donde podemos encontrar algunos elementos que son característicos de este tipo de estrategias. A continuación se analizarán algunas definiciones relacionadas con el concepto Estrategia: Para Matus (1972), la estrategia viene a ser, un análisis y un propósito de futuro donde se integra lo económico y lo político-social mediante un modelo abstracto del proceso material de desarrollo y donde se supone que ese modelo responde y reacciona como si fuera la realidad misma frente a la simulación de los hechos y perturbaciones que el analista desea explorar en sus consecuencias, con el objeto de encauzarlas hacia objetivos determinados.

La formulación de una estrategia parte de una síntesis entre realidad y proyecto y constituye una imagen preliminar resultante de una exploración de los problemas fundamentales de una economía. El diagnóstico tiene como telón de fondo esa imagen preliminar y ésta surge a su vez de una determinada interpretación y visión de la realidad. Esa imagen preliminar es el marco de referencia fundamental para elaborar el diagnóstico que ubica históricamente la situación inicial de la cual parte el análisis de la estrategia; es su punto de comparación y patrón de referencia para seleccionar lo importante y descartar lo secundario. Para formular un patrón de desarrollo nuevo o de ideas nuevas, se requieren principalmente imaginación y capacidad técnica; para formular una estrategia se requieren además un análisis riguroso de la viabilidad.

El plan no puede limitarse a trazar una meta o modelo ideal inmutable. El plan no puede ser un simple proceso normativo; la vitalidad, el dinamismo y la impredecibilidad del proceso práctico-real, exigen también un dinamismo y flexibilidad del plan. Es decir el plan debe modificarse según la situación para que se lleve a cabo y cumpla su objetivo (Matus, 1980).

García- Herrera (2004) propone como elementos fundamentales para la operación de la estrategia la vinculación de tres sectores identificados; cada uno con tareas específicas interrelacionadas y complementarias: 1) los productores y sus familias; 2) los equipos humanos técnicos y científicos; 3) representantes y miembros de instituciones de apoyo a la producción y el desarrollo agrícola y rural. La acción coordinada de éstos es lo que da fuerza a la operación de la estrategia, teniendo como resultado logros económico-sociales. Los componentes de la estrategia que se vinculan e interrelacionan para lograr los objetivos planteados, son: investigación agronómica, divulgación tecnológica, crédito, insumos, seguro agrícola, mercados atractivos y accesibles, que exista la organización para la producción, lograr una relación aceptable entre costos de producción y precios del producto.

La estrategia agrícola debe tener presente “el propósito, objetivos y metas, los recursos disponibles y la problemática, así como el conjunto de acciones a implementar, con el objeto de cambiar de una situación actual a una diferente”. La estrategia agrícola tiene el objetivo de mejorar el proceso agrícola para realizar acciones de forma oportuna, eficiente y suficiente que permita mejorar la producción y productividad haciendo un uso racional de los recursos, sin llegar a deteriorar el medio ambiente (Rodríguez, 1995).

Las estrategias en el sector agrícola son parte fundamental para promover el desarrollo agrícola y rural de una región. Entendiéndose como desarrollo lograr las condiciones en las cuales la mayoría de la gente tenga acceso a los recursos necesarios para satisfacer sus necesidades fundamentales y alcanzar niveles de vida aceptables de bienestar relacionados con la alimentación, educación, seguridad, distracción, salud mental e integración social.

Esto puede lograrse a través del desarrollo agrícola regional, el cual es un proceso integrado al desarrollo social cuya acción se concentra en el uso racional y permanente de los recursos de los sistemas agrícolas, concebidos, formulados, manejados y perfectibles por el hombre, para incrementar la productividad de esos recursos y en consecuencia la producción, con lo cual, a través de los mecanismos de intercambio, se han de obtener beneficios económico-sociales para los productores, sus familias, sus comunidades y la sociedad en general.

Todo lo anteriormente citado, se conseguirá con las estrategias adecuadas, implementadas a una región según las necesidades y problemas que presente.

En el caso particular de la producción de hongos comestibles, se ofrece la oportunidad de conjuntar, en un proceso rentable, conocimiento tradicional y tecnología apropiada, sin dañar el ambiente, los métodos agrícolas tradicionales y los valores culturales de los grupos campesinos organizados. Estos proyectos deberán planificarse adecuadamente y con enfoque multidimensional es decir se debe: 1) Identificar el sector social, y analizar el lugar donde se desea poner en práctica, 2) Idear la estrategia de transferencia de tecnología y su correcta ejecución económica y financiera, y 3) programar una evaluación periódica que permita la optimización del proceso.

2.8. Cultivo de *Pleurotus*

El cultivo de *Pleurotus* se ha destacado por una rápida aceptación en el mercado y crecimiento igualmente rápido de la agroindustria relacionada. Actualmente, el cultivo de este género disputa con *L. edodes* el segundo lugar en la producción mundial, solo después de *A. bisporus*.

La razón de este crecimiento es que las especies de este género tienen una calidad organoléptica excelente, crecen sobre una gran diversidad de sustratos en un amplio rango de temperaturas, son fáciles de cultivar, además de que para la instauración de naves para su cultivo se precisa poco capital inicial. El hecho de que para la preparación del sustrato no se requiere un proceso de composteo complejo y prolongado, ni de la aplicación de tierra de cobertura al final del crecimiento micelial

como lo demanda el champiñón, o que tampoco se necesite una fase de oscurecimiento ni de inmersión en agua como en el caso del shiitake, hacen que su cultivo sea tal vez el más sencillo de todos los macromicetos conocidos (Sánchez y Royse, 2001).

Actualmente, debido a diversas investigaciones y adaptaciones tecnológicas desarrolladas, el interés por cultivar las especies del género *Pleurotus* se ha difundido en todos los ámbitos del país. Esto ha dado lugar a un innumerable grupo de pequeñas iniciativas de producción, a baja escala, aún de economía familiar, las cuales comercializan el producto en fresco. Según Martínez-Carrera (1997), con este cultivo se observan dos tipos de tecnologías: una de tipo industrial que requiere de un composteo aerobio con pasteurización por vapor en túnel; y otra más rústica, que se utiliza en pequeñas plantas de tipo familiar. Esta última, de producción limitada y no contabilizada en la economía regional, emplea la inmersión del sustrato en agua caliente para la eliminación de la microbiota concurrente.

Debido a que las especies de *Pleurotus* tienen la capacidad de degradar la celulosa y lignina presentes en diversos esquilmos agrícolas y desechos agroindustriales, los sustratos utilizados en este país suelen variar, aunque los más frecuentes son el olote, el tamo, el rastrojo de maíz, las pajas (de trigo, cebada, centeno, avena, arroz y sorgo), y la pulpa de café, entre otras. En la elección del tipo de sustrato para el cultivo de los hongos, es necesario conocer en primer lugar los requerimientos del hongo, la disponibilidad y abundancia en la región (Quirarte, 1985).

Requerimientos físicos

El crecimiento micelial y la fructificación de los hongos comestibles es afectada por una gran variedad de factores físicos, químicos, biológicos y ambientales. Entender su respuesta fisiológica a dichos factores es primordial para escalar el cultivo y diseñar las tecnologías apropiadas para su producción comercial (Martínez-Carrera *et al.*, 1993).

Entre los factores físicos, la temperatura es la más importante. La temperatura afecta el metabolismo de las células. Influye tanto en la capacidad enzimática del organismo, como en la fluidez de los lípidos de la membrana celular. La sensibilidad a la temperatura no solo varía entre cepas sino también para una misma cepa según su etapa de desarrollo.

Pleurotus es un hongo cuyo micelio puede crecer en un rango amplio de temperaturas, sin embargo las temperaturas frecuentemente reportadas como óptimas, fluctúan entre los 15 °C a 28 °C. Por regla general, las temperaturas óptimas para la fructificación de las especies de *Pleurotus* son ligeramente inferiores que las temperaturas óptimas para crecimiento micelial (Sánchez y Royse, 2001).

La humedad relativa y la humedad del sustrato son también importantes, lográndose resultados óptimos a 80-90 % y de 70- 80 % respectivamente (Martínez-Carrera *et al.*, 1993).

Humedad en el sustrato

El contenido de humedad influye directamente sobre el desarrollo de los hongos porque afecta la disponibilidad de nutrientes y de oxígeno, debido a que el agua ocupa espacios que pueden ser ocupados por el aire. A niveles excesivos esto se vuelve una limitante para la respiración del hongo (Sánchez y Royse, 2001).

Humedad del aire

Este es un factor de suma importancia para la adecuada fructificación de las especies de *Pleurotus*. Dado que los cuerpos fructíferos están formados por un alto contenido de agua y su estructura hifal no les permite retener la humedad en condiciones adversas, un balance adecuado entre la humedad ambiental y el contenido de humedad del hongo es necesario. Debido a esto, la humedad relativa del ambiente donde crece el hongo debe ser suficiente para evitar que tanto el sustrato como los cuerpos fructíferos se deshidraten (Sánchez y Royse, 2001).

Tamaño de partícula

El tamaño de partícula afecta el crecimiento y la fructificación por que se relaciona con la accesibilidad a los nutrientes, al agua y al aire por parte de las hifas del hongo. Los tamaños de partícula muy pequeños dificultan la aireación necesaria para la respiración de los hongos y los tamaños muy grandes son inadecuados por que dificultan la compactación del sustrato y el acceso del hongo a los nutrientes, por lo cual se recomienda que las pajas o rastrojos se corten en segmentos de 5 a 10 cm (Gaitán-Hernández *et al.*, 2002)

Aireación

El oxígeno es un elemento de gran importancia para el crecimiento de los basidiomicetes por que son organismos aerobios. Para el caso de *Pleurotus*, se ha notado que la concentración alta en CO₂ estimula la germinación de las esporas y el crecimiento micelial pero inhibe la fructificación (Aguilar, 1993).

Luz

Según Eger (1974), *P. ostreatus* no puede fructificar en oscuridad continua; sin embargo la sensibilidad tanto de la cantidad como de la calidad de la luz depende de las especies (Sánchez y Royse, 2001).

Factores químicos

pH

El potencial de hidrógeno del medio de cultivo donde crece un hongo tiene una influencia directa sobre éste, por que incide sobre el carácter iónico del medio e influye directamente sobre las proteínas de la membrana y sobre la actividad de las enzimas ligadas a la pared celular; es decir afecta directamente su metabolismo. Si el pH del sustrato donde crece el hongo no es el adecuado, aunque las condiciones de temperatura y nutrientes sean óptimos, el crecimiento se verá afectado, ya que los niveles de salinidad o alcalinidad pueden detener, inhibir o estimular procesos vitales. En general los hongos comestibles prefieren un pH poco ácido a neutro (pH 5-7) (Martínez-Carrera *et al.*, 1993)

2.8.1. Contaminantes plagas y enfermedades en el cultivo de *Pleurotus*.

Este es uno de los principales problemas a los que se enfrentan los productores de setas. Los contaminantes aparecen por lo general en la fase de incubación y esto es debido principalmente a la mala pasteurización del sustrato, al mal manejo del mismo o a la falta de higiene en el momento de la siembra.

Los contaminantes son hongos (mohos), bacterias y levaduras, siendo los de mayor importancia los hongos como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Mycogone* y *Coprinus*, entre otros. Estos hongos aparecen en forma de manchas verdes, amarillentas, negras y/o anaranjadas sobre el sustrato invadiendo de forma rápida y evitando el crecimiento micelial de las setas. Su presencia se ve favorecida por la alta humedad en el ambiente y en el sustrato, así como por la alta temperatura y sustrato mal pasteurizado, entre otros.

Las plagas la constituyen insectos que atacan a los cultivos tanto en incubación como en el área de producción, atraídos por el olor del sustrato, estos insectos se llaman moscas de los hongos. Algunos de estos insectos son dípteros del género *Lycoriella* que ponen sus huevecillos en el sustrato donde en un principio se alimentan del micelio del hongo y después de las fructificaciones adultas. Otros insectos comunes en los cultivos de las setas son las llamadas catarinas, pequeños insectos de los géneros *Mycotretus* y *Pseudyschirus* que se comen los hongos en desarrollo.

Las enfermedades que se manifiestan en las fructificaciones son causadas en gran medida por bacterias y virus. Estos microorganismos se propagan rápidamente a través del agua, de insectos o utensilios sucios.

Las enfermedades se favorecen por la humedad excesiva, el calor y una escasa ventilación, provocando que en los púleos de los hongos, aparezcan zonas de color amarillo, anaranjado o café, que se pudren con rapidez y despiden un mal olor, afectando los rendimientos de producción. Una de las principales bacterias que causan estas manchas en las fructificaciones son las *Pseudomonas* (Soler Rivas *et al.*, 1999).

2.9. Aspectos biológicos del género *Pleurotus*

2.9.1. Ecología y distribución

El género *Pleurotus* presenta distribución Pantropical, ha sido citado en África, América, Europa, Asia y Australia. En México comúnmente se encuentra en zonas tropicales y subtropicales. Este género crece durante todo el año en las zonas de alta humedad y en algunas regiones fructifican preferentemente en la época de lluvias en los meses de junio a septiembre (Guzmán *et al.*, 1993b).

Los nombres vernáculos o comunes con que se les conoce varían lógicamente, dada su amplia distribución y según la ubicación geográfica en la que se encuentre. Así tenemos que en el Estado de Morelos, en Tepoztlán, se le conoce con el nombre de “Oreja de Cazahuate”, “Hongo de Cazahuate”. En el Estado de México en Laguna Zempoala, y Huautla de Jiménez Oaxaca, como “Oreja Blanca”, En Calacuya y San Lorenzo Zacamulpa, Estado de México, como “Hongo de Maguey”. En Tehuacan, Puebla como “Hongo de Encino” y en la parte central de Puebla (Atlixco) se le conoce como “Hongo de Cazahuate”. En Xalapa Veracruz, se le conoce como “Hongo de Patancán”. En Perote y Totalco, Veracruz, como “Hongo de Maguey” y en el Estado de Quintana Roo como “Kushun-che”. En Coatepec, Veracruz y alrededores como “Hongo del Bagazo” (Martínez-Carrera, 1984).

Casi todos los nombres comunes asignados tienen que ver directamente con el sustrato, en este caso madera en descomposición en el cual el hongo crece. Esto es importante por que nos da una idea clara del gran número de sustratos en los que el hongo puede desarrollarse.

El género *Pleurotus* crece de manera cespitosa y gregaria sobre troncos, tocones o ramas de diversos árboles y arbustos se han encontrado en diversas especies de plantas tales como *Dendropanax arborea* (L.) Sarg., *Ricinus comunis* L., *Yucca elephantipes* Regel y *Y. filifera* Hort: Engelm (Guzmán *et al.*, 1993b).

2.9.2. Morfología

Los hongos del género *Pleurotus* están formados por una serie de filamentos llamados hifas, que en conjunto forman lo que se denomina micelio este es

funcionalmente similar al sistema reticular de los vegetales ya que la absorción de nutrientes se realiza por su conducto y otra función es la de sostener el basidioma al suelo. En la naturaleza y bajo condiciones favorables de humedad y temperatura, este micelio extendido sobre un sustrato adecuado, se transforma en pequeños botones que van aumentando de tamaño hasta formar la típica seta.

El cuerpo fructífero está formado por un sombrero o píleo, un pie o estípite y el himenio (Figura 1), que en conjunto tienen la función de producir esporas cuya misión es perpetuar la especie. El sombrero o píleo es más o menos circular, y tiene la finalidad de proteger el himenio que es una estructura que se encuentra en la cara inferior del sombrero, el cual está formado por unas laminillas verticales que se extienden desde la parte superior del pie hasta el borde del sombrero; el propósito del himenio es producir las esporas ya que en el himenio se encuentran los basidios, estructuras formadoras de esporas. El pie o estípite, es quien sostiene el sombrero; es corto, de forma cilíndrica; en el caso de las setas este pie es más lateral que céntrico por lo que su desarrollo se da en forma de una ostra u oreja, de hecho a este hongo técnicamente se le llama *Pleurotus*, término que deriva del griego pleurá o pleurón que significa costado o lado y del latín otus, oreja (Gaitán-Hernández *et al.*, 2002).

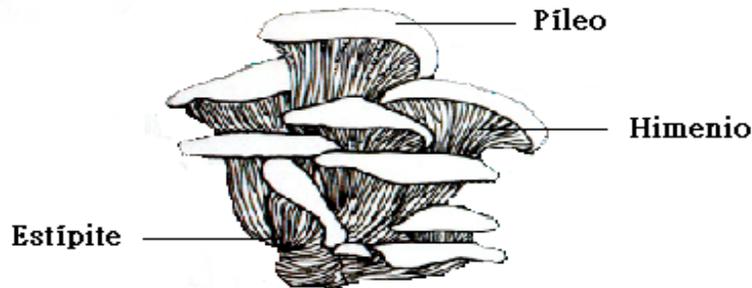


Figura 1. Partes principales del hongo *Pleurotus*.

2.9.3. Taxonomía

El género *Pleurotus*, se encuentra ubicado en la clase Basidiomycetes, Orden Agaricales, Familia Tricholomataceae.

Reino: Fungi
División: Eumicota
Subdivisión: Basidiomycotina
Clase: Holobasidiomycetes
Subclase: Hymenomycetidae
Orden: Agaricales
Familia: Tricholomataceae
Género: *Pleurotus*
Especies: *cystidiosus, djamor, levis, ostreatus* y *pulmonarius*.

(Guzmán 1980; Herrera & Ulloa 1990)

2.9.4. Nutrición de los hongos

Los hongos del genero *Pleurotus*, como todos los hongos se alimentan por absorción, son organismos heterótrofos ya que obtienen energía y carbono de la oxidación de los sustratos orgánicos, con la producción simultanea de CO₂, H₂O y de energía no asimilada que se manifiesta en incremento de la temperatura; son saprófitos es decir crecen en el suelo, y en otros sustratos como: troncos o sobre desechos agrícolas o agrícola-industriales, como la pulpa de café, bagazo de caña de azúcar y diversas pajas de cereales, etc., en general se alimentan de materia orgánica muerta, la cual degradan para nutrirse de ella, a través de la gran cantidad de enzimas extracelulares que liberan en el medio y que degradan diversos tipos de moléculas, tales como la celulosa, hemicelulosa, lignina, proteínas, entre otras (Zadrazil, 1974).

Para el buen crecimiento del hongo es necesario que en el sustrato en donde se desarrolle se encuentren todas las sustancias que se necesita como son fuentes de carbono, y nitrógeno, además de otros elementos como el fósforo, materiales que absorbe con la degradación del sustrato en donde crece. En el caso del cultivo de hongos, los sustratos empleados se hacen más digeribles mediante procesos de fermentación o se mezclan entre sí, para suplementar alguna deficiencia en nutrimentos.

Carbono

El carbono es necesario para los hongos porque es la fuente directa de energía para su metabolismo y para la formación de las diferentes partes y estructuras celulares. Dada la importancia que tiene para la vida de la célula, este elemento es el que requiere en mayores cantidades. El carbono puede ser utilizado por el hongo a partir de diferentes fuentes como polímeros, carbohidratos, lípidos, etc.

- a) Azúcares: Los carbohidratos se encuentran entre las fuentes de carbono preferidas por los hongos de las especies de *Pleurotus*. Según Raypeck (1977), la glucosa, la manosa y la galactosa son buenos sustratos para esta especie, mientras que la xilosa y la arabinosa producen un crecimiento deficiente.
- b) Polímeros: La mayoría de los basidiomicetos son considerados “degradadores de madera” por que son capaces de crecer sobre la biomasa proveniente de las plantas leñosas. Las especies de *Pleurotus* son consideradas de pudrición blanca por que son capaces de degradar materiales ricos en lignina, celulosa y hemicelulosa (Cullen, 2002).
- c) Lípidos: la adición de aceites vegetales tiene un efecto benéfico para el crecimiento micelial de *P. sapidus* y *P. ostreatus*. Según Kurtzman (1974 y 1976), los productos de la hidrólisis de aceites (glicerol, ácidos grasos y saponinas) deprimen el crecimiento, pero la adición de triglicéridos y metil ésteres de ácidos grasos generalmente promueven el crecimiento.

Nitrógeno

El nitrógeno lo necesita el hongo para la elaboración de sus proteínas, purinas, pirimidinas y para formar quitina, un polisacárido que se encuentra en la pared celular de muchos hongos. Las principales fuentes de nitrógeno se obtienen a partir de la degradación de los aminoácidos, peptona, caseína y otros, y de la urea o por medio de sulfatos y nitratos de amonio, sodio, potasio, calcio y fósforo (Guzmán *et al.*, 1993a). Los sustratos sobre los que suelen fructificar las especies de *Pleurotus*

pueden contener valores bajos de nitrógeno, además estas especies tienen la capacidad de crecer sobre fuentes inorgánicas de nitrógeno como el nitrato de potasio o la urea, aunque se observa que prefieren las fuentes orgánicas para un crecimiento óptimo (Sánchez y Royse, 2001).

2.9.5. Valor nutricional de los hongos

Desde tiempos muy antiguos, los hongos han sido tratados como un tipo de alimento especial. Los griegos creían que estos organismos tenían la propiedad de brindar fuerza a los guerreros en las batallas. Los faraones apreciaban a los hongos como un manjar exquisito y los romanos consideraban que eran un muy buen alimento, los cuales se servían solo en ocasiones festivas. Los chinos valoraban a los hongos como un alimento saludable a los cuales llamaban el “elixir de la vida”. Los indígenas mexicanos usaron los hongos como alucinógenos y en ceremonias religiosas; así como con propósitos terapéuticos (Chang y Miles, 1989).

Actualmente, el hongo seta se ha considerado como un complemento alimenticio de aceptable valor nutricional (Cuadro 1), ya que sus proteínas contienen todos los aminoácidos esenciales para el hombre, por lo que debe de ser incluido en la dieta diaria. Este hongo es rico en carbohidratos, vitaminas, fibra, minerales, además de que posee un bajo contenido de grasas.

Proteínas

Los valores del contenido de proteína, en los principales hongos (*Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp. y *Volvariella volvacea*) van de 1.75 a 3.63 % en base al peso seco, aunque este valor puede ser hasta de 5.9%; sin embargo el valor promedio más representativo es de 3.5 a 4%. El promedio del contenido de proteínas en hongos comestibles en general es dos veces mayor que en el espárrago y col y cuatro y doce veces mayor que la naranja y manzana, respectivamente. En peso seco, los hongos normalmente contienen del 19 a 35% de proteínas comparado con el 7.3% presente en el arroz, 13.2% en el trigo, 39.1% en la soya y 25.2% en la leche (Crisan y Sand, 1978). Por lo tanto en proteína cruda, los

hongos cuentan con un rango por debajo de la carne animal pero por arriba de otros alimentos, incluyendo la leche, el cual es un producto de origen animal.

Aminoácidos esenciales

Las proteínas presentes en los hongos comúnmente cultivados contienen los nueve aminoácidos esenciales (lisina, metionina, triptófano, treonina, valina, leucina, isoleucina, histidina, y fenilalanina) para el hombre. El aminoácido esencial más abundante es la lisina y entre los aminoácidos esenciales que se presentan en niveles bajos se encuentran el triptófano y la metionina (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición de aminoácidos esenciales (g de aminoácidos / 100 g de proteína cruda corregida) en *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* y *Volvariella volvacea*.

Aminoácidos	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Lentinula edodes</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Volvariella Volvacea</i>
Leucina	7.5	7.9	6.8	4.5
Isoleucina	4.5	4.9	4.2	3.4
Valina	2.5	3.7	5.1	5.4
Triptófano	2.0	Nd	1.3	1.5
Lisina	9.1	3.9	4.5	7.1
Treonina	5.5	5.9	4.6	3.5
Fenilalanina	4.2	5.9	3.7	2.6
Metionina	0.9	1.9	1.5	1.1
Histidina	2.7	1.9	1.7	3.8
Total de aminoácidos esenciales	38.9	36.0	33.4	32.9

Chang y Miles, 1989

Grasa

El contenido de grasa va de 0.9 a 1.8% en base a su peso seco (Chang y Quimio, 1982).

Vitaminas

Se ha reportado que los hongos comestibles son una buena fuente de diversas vitaminas que incluyen a la tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina, biotina y ácido ascórbico (vitamina C) (Gaitán-Hernández *et al.*, 2002).

Carbohidratos

Las pentosas, hexosas, metil pentosas, así como los disacáridos, amino azúcares, alcoholes azúcares, y ácidos azúcares son constituyentes de los carbohidratos en los hongos. *Pleurotus* spp. cuenta con rangos de carbohidratos de 46.6 a 81.8 %, mientras que *A. bisporus* presenta 60% en base a su peso (Crisan y Sands, 1978). Recientemente ha surgido el interés por caracterizar los componentes de los polisacáridos hidrosolubles, que se encuentran en los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* ya que tienen la habilidad de inhibir el crecimiento de tumores.

Fibra

El contenido de fibra varía de 7.4 a 27.6 % en especies de *Pleurotus*, mientras que en *A. bisporus* 10.4 % y de 4 a 20% en *V. volvacea*. La fibra es considerada como un ingrediente muy importante para mantener una dieta balanceada y saludable. Estudios recientes mostraron que la comida de pacientes diabéticos con un alto contenido de fibra reduce los requerimientos diarios de insulina y estabiliza la glucosa en la sangre (Chang y Miles, 1989).

Minerales

Entre los minerales presentes en altas cantidades se encuentra el potasio seguido del fósforo, sodio, calcio y magnesio. También existen otros minerales en menor cantidad tales como el cobre, zinc, hierro, manganeso, molibdeno y cadmio (Chang y Quimio, 1982).

2.9.5.1. Propiedades medicinales de las especies de *Pleurotus*

Por mucho tiempo los hongos han sido conocidos, especialmente por las culturas orientales, en el sudeste de Asia, particularmente en China y Japón, por sus propiedades medicinales además de su agradable sabor y valor nutricional. En la actualidad, mediante técnicas modernas, se han mostrado numerosos componentes

bioactivos de los hongos, los cuales han mostrado actividades anticancerígenas, antitumorales, antivirales, inmunomoduladoras, hipocolesterolémicas y hepatoprotectivas (Rodríguez, 2003).

En el aspecto medicinal las especies de *Pleurotus* han sido recomendadas en México para combatir diversas enfermedades por las características medicinales que presentan, de esta manera contribuyen a reducir los niveles de colesterol, controlan la diabetes, también ayudan a combatir la presión alta en la sangre, desordenes nerviosos, promueven una buena memoria, es un antiparasitario, retarda el envejecimiento, es un laxante, es un antiinflamatorio intestinal. (Guzmán, 2000).

2.9.6. Reproducción de *Pleurotus*

Pleurotus presenta un patrón de sexualidad heterotálico, es decir es autoincompatible debido a que para su reproducción requiere de la unión de dos micelios monocarióticos compatibles y por lo tanto, el micelio producido por la germinación de una basidiospora no puede dar origen al desarrollo del cuerpo fructífero y la producción de esporas. Además, es tetrapolar ya que forma cuatro esporas en cada basidio, cada una con un par de factores A_1B_1 ó A_2B_2 , debido a esto también es bifactorial, ya que la compatibilidad de los individuos esta gobernada por un par de factores, de tal forma que al fusionarse por el proceso de plasmogamia, los micelios que se producen forman un micelio tetrafactorial resultando las siguientes combinaciones para cada gen: $A_1 B_1$, $A_2 B_2$, $A_1 B_2$ y $A_2 B_1$ (Alexopoulos, 1996).

2.9.7. Ciclo de vida de *Pleurotus*

El ciclo de vida de *Pleurotus* empieza cuando las basidiosporas (a), liberadas por el hongo germinan, iniciando el desarrollo de un micelio homocariótico haploide (b) de contenido genético-nuclear idéntico y capaz de propagación independiente e indefinida. El micelio podría seguir la vía asexual o la sexual. El micelio homocariótico (también llamado primario o monocarión) haploide, al encontrarse con otro micelio compatible ocurre la plasmogamia o fusión de dos micelios homocarióticos (c), dando origen a un micelio fértil el cual es usualmente un

heterocarión especializado (también llamado micelio secundario ó dicarión) (d). Los dos núcleos sexualmente compatibles siguen como núcleos haploides, formando hifas con dos núcleos; un par por célula por todo el micelio; en cada septo usualmente se forma una conexión hifal a manera de puente llamado fibula a través de la cual uno de los dos núcleos pasa al otro extremo de la célula mientras que el otro núcleo se divide para pasar por el poro o tabique; (e) bajo condiciones ambientales apropiadas, el micelio dicariótico forma agrupaciones las cuales darán origen a los cuerpos fructíferos que tienen formas especializadas. (f) Los cuerpos fructíferos presentan tres estructuras, el píleo, el estípite y el himenio el cual esta formado por láminas y es en esta estructura donde se lleva a cabo la formación de basidios y basidiosporas. (g) Los basidios son estructuras especializadas en donde ocurre la fusión de los núcleos haploides a través de un proceso llamado cariogamia, formando así un núcleo diploide en la célula. (h) Posteriormente dicho núcleo diploide sufre el proceso de meiosis, en el cual el material genético parental se recombinaran y se segregaran, originando cuatro células haploides, las cuales viajaran hasta los esterigmas del basidio donde formaran a las basidiosporas que son típicamente cuatro esporas uninucleadas en cada basidio. (i) Las esporas son liberadas; y después de la germinación de estas, continúa una división mitótica del núcleo; punto en el cual el ciclo de vida es reiniciado (Figura 2).

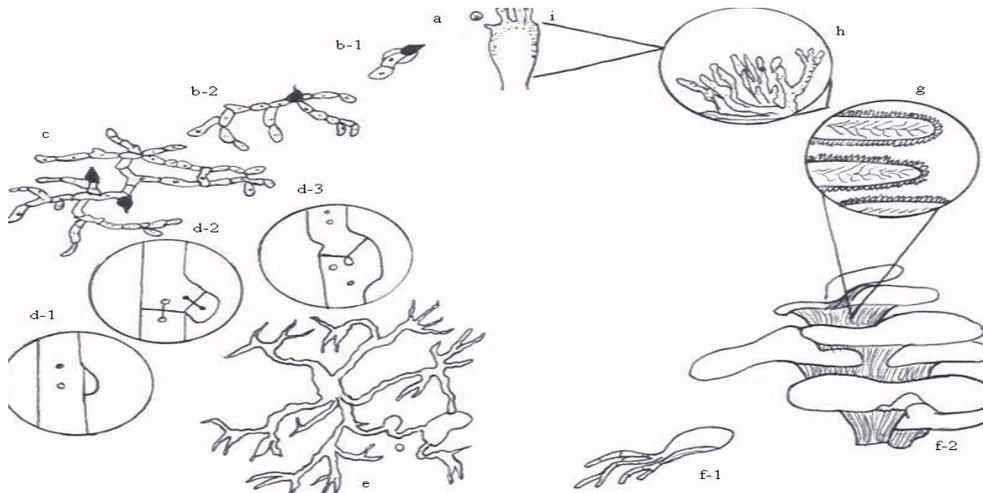


Figura 2. Ciclo de vida de *Pleurotus* a) basidiospora; b) germinación y formación del micelio homocarión; c) fusión de dos micelios homocarióticos compatibles; d) formación del micelio dicarión; e) formación de primordios; f) desarrollo del carpóforo; g) himenio; h) formación de los basidios; i) basidio diferenciado y basidiosporas (Sánchez y Royse, 2001).

3. MARCO TEÓRICO

En la mayoría de los cultivos agrícolas cerca de la mitad de la biomasa permanece desaprovechada, lo que resulta en la acumulación periódica de cantidades considerables de desperdicios vegetales a causa del carácter intensivo periódico de la agricultura, lo que ha llegado a convertirse en un peligro para el equilibrio ecológico.

La implantación de tecnologías que usen estos materiales de desecho para incrementar la producción de alimentos básicos es de interés primordial. Esto no resolvería únicamente los problemas ecológicos mencionados sino que también aumentaría el rendimiento económico de la agricultura (Quirarte, 1985), el cultivo de hongos, principalmente del género *Pleurotus* representa una alternativa biotecnológica para solucionar dicha problemática, ya que posee diversas ventajas. Esto debido a que pueden usar los residuos agroindustriales como sustratos para su cultivo, ya que estos microorganismos tienen la capacidad de desintegrar las estructuras rígidas de las paredes celulares de las plantas principalmente de lignina, para obtener nutrientes y asimilarlos para su nutrición. Por lo que por un lado se aprovechan los desechos agroindustriales que ocasionan contaminación ambiental y se emplean para obtener otro alimento rico en nutrientes como son los hongos comestibles.

Pleurotus ostreatus tiene una amplia adaptación a diversos sustratos lignocelulósicos como son: aserrín de varias clases de maderas, pajas de casi todo tipo de cereales como arroz, avena, cebada centeno, mijo, maíz (olotes) y trigo, y desperdicios de la industria papelera, entre otro

3.1. Degradación de los sustratos agrícolas

El sustrato es el material sobre el cual crecen los hongos y es degradado para su asimilación. Por su naturaleza química está en relación directa con las necesidades de crecimiento de los hongos. Las especies de *Pleurotus* degradan el complejo lignina celulosa para absorber sus nutrientes, por lo que crecen en madera o en

productos relacionados con ella. La pared celular de los tejidos vegetales está compuesta de celulosa y lignina, que son sustancias químicas muy complejas, difíciles de degradar y que solamente los hongos y las bacterias descomponen, debido a que poseen enzimas que rompen esas moléculas y liberan a la celulosa y a la hemicelulosa de la lignina (Ávila, 2005). El complejo lignocelulolítico en la madera se localiza en una matriz con concentraciones variables de lignina, celulosa y hemicelulosa. Las diferencias químicas y morfológicas pueden variar considerablemente en maderas de diferentes especies de arboles (Blanchette, 1995).

El contenido de celulosa va de 40 a 60 %, el de hemicelulosa de 15 a 50 % y el de lignina de 10 a 30 %, dependiendo del tipo de vegetal, del tejido y edad del mismo. La organización celular es bastante regular; una pared regular típica de un tejido vegetal está constituida por una laminilla media, una pared primaria y otra secundaria; está última compuesta a su vez, por tres capas: S_1 , S_2 y S_3 (Figura 3). Por lo regular la capa S_2 es la de mayor espesor comparada con las otras.

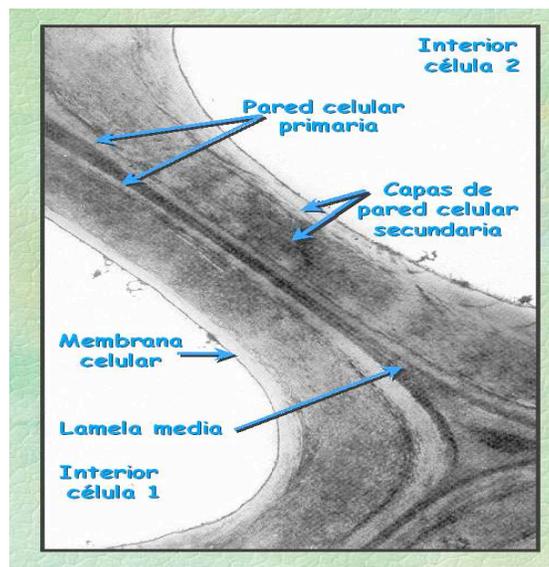


Figura 3. Diferentes capas que forman la pared de una célula vegetal adulta.

En la laminilla media se encuentra casi toda la lignina; la pared secundaria contiene muy poca lignina, está constituida principalmente por polisacáridos. A cada capa de la pared secundaria se adhieren la celulosa y cantidades mínimas de otros constituyentes formando estructuras longitudinales llamadas microfibrillas, dentro de cada una de las cuales se encuentran las moléculas lineales de celulosa unidas lateralmente por puentes de hidrógeno y por fuerzas de Van der Waals. Los grados de ordenamiento de las moléculas de celulosa difieren; cuando están altamente ordenadas se les conoce como cristalinas, mientras las regiones con menor grado de ordenamiento se denominan amorfas. Esta íntima asociación física se considera responsable de su resistencia a la degradación biológica. En las regiones amorfas, entre cristales de celulosa, se encuentra también hemicelulosa, minerales y otros materiales como grasas, ceras, aceites esenciales, taninos, resinas, carbohidratos solubles y proteínas (Quirarte, 1985).

3.2. Composición química de la lignocelulosa

La lignocelulosa es producida como resultado de la actividad fotosintética, donde interviene la energía solar, agua y dióxido de carbono atmosférico. La asimilación fotosintética en plantas conduce a la formación de carbohidratos, los cuales son metabolizados para producir: (a) celulosa, (b) hemicelulosa y (c) lignina (Abdullah y Zafar, 1999).

a) La **celulosa** es la sustancia más abundante en el reino vegetal, debido a que es el mayor componente estructural de la pared celular de las plantas; es un polisacárido de alto peso molecular formado por unidades de D-glucosa con uniones 1-4 β -glucosídicas en la posición ecuatorial estable (Figura 4). La molécula es alargada y plana, sin ramificaciones, identificándose químicamente tres tipos de celulosa: alfa-, beta- y delta celulosa.

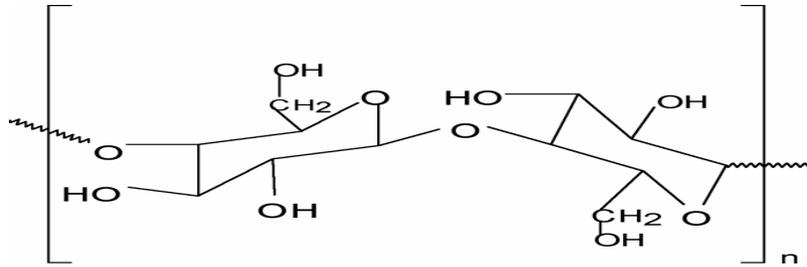


Figura 4. Estructura química de la celulosa

En la naturaleza es encontrada casi exclusivamente en las paredes celulares de las plantas, aunque también la producen algunos animales (por ejemplo, los tunicados) y algunas bacterias. A pesar de las grandes diferencias en la composición y estructura anatómica de las paredes celulares de las plantas, estas presentan un alto contenido de celulosa, que constituye aproximadamente del 35-50% del peso seco de la planta. Una característica importante de la celulosa, relativamente inusual en los polisacáridos, es su estructura cristalina. La naturaleza cristalina de la celulosa implica un orden estructural en el cual todos los átomos están arreglados, uno con respecto al otro. Una característica importante de la cristalinidad es que las moléculas de las micro fibras individuales están lo suficientemente cerradas para impedir la penetración no solo de enzimas, sino también de moléculas de agua. Sin embargo, las fibras de celulosa contienen varios tipos de irregularidades, tales como: enrollamientos de las micro fibras; ó huecos en la superficie, como son: microporos y capilares. Dada la heterogeneidad estructural dentro de las fibras, es que estas son parcialmente menos hidratadas por el agua cuando son sumergidas en un medio acuoso. No obstante, existen algunos microporos y capilares lo suficientemente espaciosos para permitir la penetración de moléculas relativamente grandes, incluyendo en algunos casos enzimas celulósicas. Por tal motivo, cuando se realizan estudios sobre hidrólisis y utilización microbiana son usadas celulosas purificadas, que varían considerablemente en su estructura fina, y la elección del sustrato para tales estudios afectarán sin duda alguna los resultados obtenidos. Las holocelulosas, tales como el Solka Floc, son producidas por la deslignificación de la madera u otros materiales. Estos materiales contienen cantidades considerables de varias

hemicelulosas y frecuentemente presentan pesos de baja densidad, lo cual provoca el levantamiento de algunas fibras de celulosas (Lynd *et al.*, 2002).

Por otro lado las celulosas microcristalinas (por ejemplo Avicel y Sigmacel) son casi celulosas puras y el tratamiento de dilución ácida usado en su preparación remueve las hemicelulosas y el exceso de regiones amorfas de las fibras de celulosa. La diferencia de las celulosas microcristalinas comerciales, radica principalmente en la distribución del tamaño de partícula, el cual tiene implicaciones significativas en el índice de hidrólisis y utilización. Debido a la complejidad estructural de la celulosa pura y a la dificultad de trabajar con sustratos insolubles, se recomienda ampliamente, usar celulosas altamente solubles, tal como la carboximetilcelulosa (CMC), como sustrato para estudiar la producción de endoglucanasas (Lynd *et al.*, 2002).

b) **Hemicelulosa:** Esta constituida por un grupo de polisacáridos no tan homogéneo como el de la celulosa, a saber: xilanos, beta-mananos, galactanos y L- arabianos (Figura 5); los xilanos son los más abundantes en el material lignocelulósico. A diferencia de la celulosa cada molécula de hemicelulosa comprende más de un tipo de unidades de azúcares, los cuales presentan ramificaciones más cortas (Abdullah y Zafar, 1999).

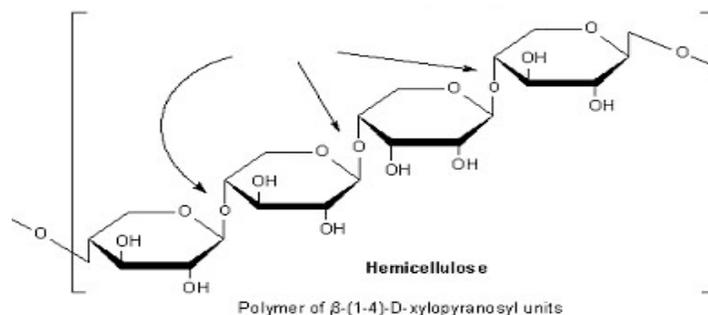


Figura 5. Estructura de la hemicelulosa.

c) **Lignina:** Es el segundo polímero natural más abundante después de la celulosa, se encuentra en la pared celular de las plantas y es la encargada de darle una estructura rígida, así como de constituir una barrera física para los agentes

patógenos. Por tanto es considerada como un polímero de baja digestibilidad. La lignina se encuentra en plantas leñosas como mazorca, cáscara, porciones fibrosas de raíces tallo, hojas y rastrojos. Las maderas contienen más lignina que cualquier otra planta, su contenido aumenta conforme la planta madura, y sus ligaduras químicas, en especial de celulosa y hemicelulosa, reducen la digestibilidad de esta última (Ávila, 2005). La estructura de la lignina varía no solo de especie a especie, también de árbol a árbol dentro de la misma especie (Abdullah y Zafar, 1999).

La lignina es un polímero estructural de las plantas vasculares, formada por unidades de fenil propano; proporciona a las plantas rigidez y unión entre sus células, además de disminuir la permeabilidad del agua a través de las paredes celulares y proteger a las células de invasiones por microorganismos. La molécula de la lignina presenta una estructura ramificada e irregular (Figura 6).



Figura 6. Estructura de la lignina (Kirk y Farrell, 1987).

3.3. Implicación de las enzimas en la degradación de los sustratos

Químicamente las enzimas son mediadoras del metabolismo encargadas prácticamente de toda reacción que transcurra en una célula; sin ellas las reacciones metabólicas ocurrirían tan lentamente que serían imperceptibles; por tanto en ausencia de enzimas la vida sería imposible. Las enzimas poseen una extraordinaria potencia catalítica, que es generalmente mayor que la de los catalizadores sintéticos

o inorgánicos. Un catalizador es una sustancia que aumenta la rapidez o velocidad de una reacción química. Cabe mencionar que las enzimas reciben el nombre y se clasifican de acuerdo a las reacciones que catalizan. La mayor parte de estas tiene un nombre que se forma adicionando el sufijo “asa” al nombre del sustrato sobre el cual actúan o a un término que describe las reacciones que catalizan.

La sustancia sobre la que actúa una enzima se denomina sustrato de esa enzima. Las enzimas reúnen los sustratos en un lugar especial de la superficie denominado centro activo o centro catalítico para formar un complejo enzima-sustrato y posteriormente su conversión en otros productos (Melo *et al.*, 2007) (Figura 7).

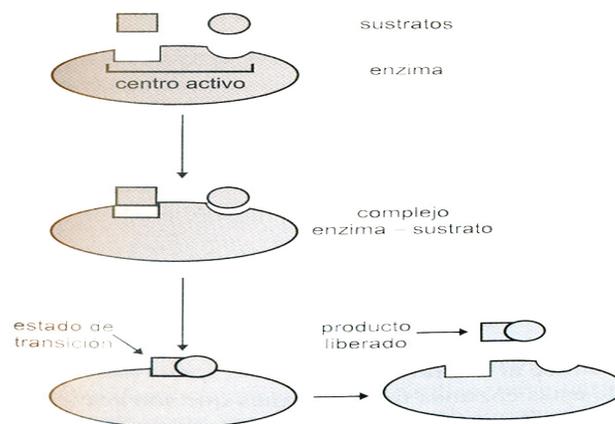


Figura 7. Representación esquemática que muestra la formación del complejo enzima-sustrato y su conversión en productos (Melo *et al.*, 2007).

La utilización de los sustratos lignocelulósicos por los hongos comestibles depende de su capacidad para sintetizar enzimas extracelulares oxidativas (lignolíticas) e hidrolíticas (celulasas y hemicelulasas) para convertir compuestos individuales (celulosa, hemicelulosa y lignina) en compuestos de bajo peso molecular, que puedan ser asimilados para su nutrición. Por tal motivo, la producción de estas enzimas por los hongos es una parte crucial en el proceso de colonización y determinante en la producción de cuerpos fructíferos (Buswell *et al.*, 1996). Las celulasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos β -1,4 presentes en los polisacáridos (celulosa). Las celulasas son

producidas por una gran variedad de microorganismos entre los que se encuentran hongos y bacterias (Ponce y Pérez, 2002).

Los microorganismos que pueden degradar celulosa cristalina producen un sistema complejo de enzimas que es denominado en forma general celulasa; cada sistema o complejo celulasa está compuesto de una variedad de enzimas con diferentes especificidades y modos de acción, que actúan en sinergismo para hidrolizar la celulosa. Los componentes del sistema de celulasas, fue clasificado primero en base a su modo de acción catalítica y más recientemente se ha clasificado con base a sus propiedades estructurales (Lynd *et al.*, 2002).

Existen tres tipos de enzimas que actúan en la degradación de la celulosa, a saber: (1) endoglucanasas o 1-4- β -D-glucan-4-glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4), (2) exoglucanasas, que incluye a las 1-4- β -D-glucan-4-glucanohidrolasas (también conocidas como celodextrinasas) (EC 3.2.1.7.4) y 1-4- β -D-glucan-4-celobiohidrolasas (celobiohidrolasas) (EC 3.2.1.9.1), y (3) β -glucosidasas ó β -glucosido glucohidrolasas (EC 3.2.1.2.1). Las endoglucanasas rompen en forma aleatoria los enlaces internos de la molécula (celulosa) en las regiones amorfas, generando oligosacáridos de varias longitudes y consecuentemente nuevos terminales de cadena. Las exoglucanasas atacan gradualmente las moléculas de celulosa de los terminales no reductores liberando subunidades de glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasa) como productos principales. Y las β -glucosidasas hidrolizan a las celodextrinas solubles y celobiosa, producidas por las actividades anteriores, originando como producto final a la glucosa (Figura. 8) (Lynd *et al.*, 2002).

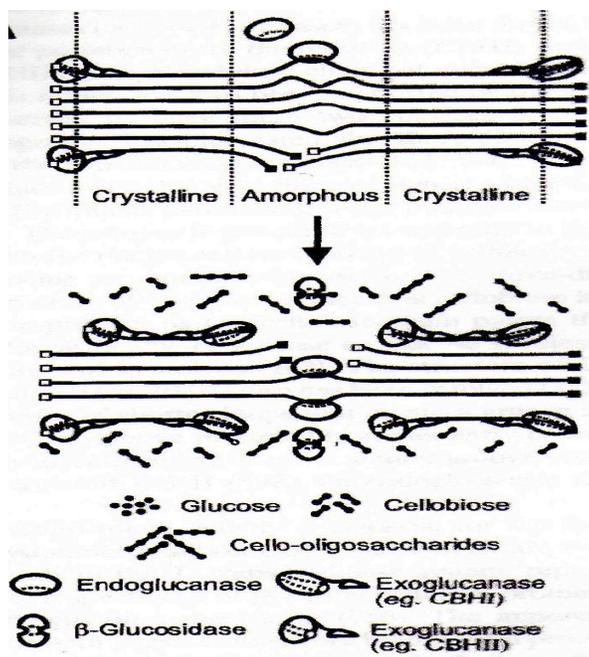


Figura 8. Representación esquemática, donde se muestra la hidrólisis de la celulosa microcristalina y amorfa, por el sistema de celulasas (Lynd *et al.*, 2002).

Un aspecto importante y crucial de los hongos filamentosos celulíticos es que tienen la capacidad de penetrar en los sustratos celulósicos a través de sus extensiones hifales, de esta manera pueden confinar su sistema celulasas en el interior de las partículas celulósicas (Lynd *et al.*, 2002).

3.4. Mecanismos de biodegradación de lignocelulosa

Químicamente y morfológicamente existen distintos tipos de degradación del sustrato por hongos. La degradación de madera por hongos se puede separar en tres grupos principales (cuya denominación es basada en los cambios físicos causados en la madera por su acción): de pudrición blanca, blanda y café.

Pudrición blanca

Los organismos que ocasionan la pudrición blanca son un grupo de hongos, en donde se encuentran los basidiomicetes y son caracterizados por su habilidad para degradar todos los componentes de la pared celular, incluyendo la lignina. *Pleurotus ostreatus* se sitúa en este tipo de pudrición. La razón por la que atacan la pared

celular de los sustratos es incierta; sin embargo se relaciona con las enzimas oxidativas producidas por los hongos.

Los hongos de pudrición blanca que deslignifican la madera presentan un gran interés de investigación, debido a la capacidad que estos tienen de modificar o degradar la lignina y por la transformación de los sustratos lignocelulósicos para la alimentación de rumiantes con altas cualidades.

Pudrición blanda

Este término fue usado por primera vez por Savory (1954), que describe el ataque de la madera en ambientes húmedos por hongos. Este tipo de pudrición la llevan a cabo principalmente los Ascomicetes y Deuteromicetes. Estos microorganismos atacan a la lignina en menor grado. Los bordes de la madera por la desintegración de esta tienen una apariencia húmeda, café, blanda y presenta grietas.

Pudrición café

La lignocelulosa en la madera es drásticamente alterada por los hongos de pudrición café. Una característica distintiva de los hongos de pudrición café, es su capacidad para despolimerizar la celulosa rápidamente en el proceso de desintegración causando pérdidas sustanciales en las propiedades de rigidez de la madera (Blanchette, 1995).

3.5. Importancia industrial de las enzimas

Las pectinasas fueron empleadas en 1930 por primera vez en la industria alimentaria. Posteriormente en las siguientes dos décadas, el uso de celulasas, xilanasas, hemicelulasas y pectinasas se incremento considerablemente especialmente en la industria textil, alimentaria, cervecera y de vino; así como en la industria de la pulpa y papel. Actualmente, estas enzimas constituyen el 20 % del mercado en el mundo, y son producidas principalmente por *Trichoderma* y *Aspergillus* (Bhat, 2000).

Aplicaciones

En la industria textil las celulasas juegan un papel muy importante en el desteñido de la mezclilla, ya que se usan para remover el color azul índigo y dar una apariencia de desteñido o deslavado.

Por otro lado, las celulasas también se añaden a los detergentes quita pelusas, debido a que la enzima degrada las microfibrillas que se separan parcialmente de las fibras principales, restituyendo a las fibras una superficie suave y a la prenda su color original. Dentro de la industria alimentaria, las celulasas se usan para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos, extracción de aceites comestibles, etc. Así mismo, se usan en la hidrólisis principalmente de materiales lignocelulósicos para mejorar la digestión de rumiantes (Ponce y Pérez, 2002).

Otras enzimas de igual importancia que las mencionadas anteriormente, son las xilanasas, donde una de sus aplicaciones más importantes es en la industria de la pulpa y del papel. El pulpeo Kraft involucra el cocimiento alcalino de la pulpa para remover el 95% de la lignina presente en la madera. El 5% del remanente le confiere a la pulpa el color café pardo oscuro. Por razones estéticas y para mejorar las propiedades del papel es necesario un paso de blanqueo, el cual tradicionalmente se hacía por un proceso multietapas, que utiliza cloro o dióxido de cloro. Los productos alternos de estos compuestos químicos son sustancias cloradas, algunas de las cuales son tóxicas, mutagénicas, persistentes y bioacumulativas que causan numerosos daños en los sistemas biológicos. En los últimos diez años, la industria de la pulpa y el papel utiliza mezclas de xilanasas en el proceso de bioblanqueo, con esto se ha logrado realzar la brillantez de las pulpas y disminuir la cantidad de cloro utilizado, además de resultar muy efectivas con respecto a los costos (Ponce y Pérez, 2002).

3.6. Antecedentes de investigaciones relacionadas con la actividad enzimática de diversas cepas de hongos

Se ha estudiado la producción de enzimas celulíticas en diversas especies de hongos comestibles pertenecientes al género *Pleurotus*, tanto en fermentación sólida como líquida (o sumergida). En ambos casos se han examinado diversos factores que afectan o favorecen la producción de estas enzimas.

En cuanto a los factores de los que depende la producción extracelular de celulasas durante la fermentación líquida, tenemos: fuente de carbono, por lo que se han usado partículas de paja de trigo y viruta de madera (Inglis *et al.*, 2000), extractos de paja de trigo y tabaco (Garzillo *et al.*, 1994), ó algún tipo de celulosa comercial como Solka Floc, celulosa microcristalina (Lynd *et al.*, 2002) y CMC (Buswell *et al.*, 1996), con la finalidad de inducir la producción de celulasas en los medios de cultivo; así como también es importante un pH óptimo del medio, el cual se ha reportado de 6 a 6.5 (Elisashvili *et al.*, 2008a; Inglis *et al.*, 2000; Buswel *et al.*, 1996; Garzillo *et al.*, 1994) y la temperatura (Inglis *et al.*, 2000) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Antecedentes relacionados con la actividad de celulasas por diferentes cepas de hongos mediante fermentación líquida.

Investigación	Organismos	Sustrato para determinar la producción de celulasas	Método para la detección de azúcares reductores	Autor
Efecto de la composición del medio de cultivo en la morfología de <i>Trichoderma reesei</i> 's y la producción de celulasas	<i>Trichoderma reesei</i> 's	Papel filtro	Ghose (1987)	Ahamed y Vermette, 2009.
Lacasas de <i>P. ostreatus</i> observadas en diferentes fases de su crecimiento en fermentación sumergida: producción de nuevas isoformas de lacasas	<i>P. ostreatus</i>	2,6-dimetoxi fenol (DMP)		Tecuitl-Berestain <i>et al.</i> , 2008.
Estudios sobre la fermentación sumergida de <i>Pleurotus tuber-regium</i> (Fr.) Singer- Parte 1: factores físicos y químicos que afectan el rango de crecimiento micelial y la eficiencia de bioconversión	<i>Pleurotus tuber-regium</i> (Fr.)			Wu <i>et al.</i> , 2003.
Producción de celulasas y xilanasas por basidiomicetes de temperaturas-bajas (LTB)	4 cepas agrupadas en el taxón, <i>Coprinus psychromordibus</i>	Papel filtro (7 mm de diámetro; Whatman No.1), CMC y avicel	Del ácido dinitroftalico.	Inglis <i>et al.</i> , 2000.
Perfiles de enzimas lignocelulíticas de hongos comestibles	<i>Lentinula edodes</i> (L54) <i>P. sajor-caju</i> (PI-27) <i>V. Volvacea</i> (V14)	La Actividad de endoglucanasas (CMC) y para las exoglucanasas, Avicel	Nelson-Somogyi (Somogyi, 1954).	Buswell <i>et al.</i> , 1996.
Propiedades hidrolíticas de celulasas extracelulares de <i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i> "florida"	CMC, p-nitrophenyl- β -D-celobiosida (pNPL) o celobiosa	Nelson (1944).	Garzillo <i>et al.</i> , 1994.

Por otro lado, en lo que se refiere al estudio de la producción enzimática por fermentación sólida de diferentes cepas del género *Pleurotus*, se han empleado una gran variedad de desechos lignocelulósicos disponibles, tales como: paja de trigo (Elisashvili *et al.*, 2008a; Lechner y Papinutti, 2006), bagazo de caña de azúcar (Membrillo *et al.*, 2008; Márquez-Araque *et al.*, 2007;), pulpa de café (Velázquez-Cedeño *et al.*, 2002; Salmones y Mata, 2002), rastrojo de maíz (Ávila, 2005),

desechos de plátano (Reddy *et al.*, 2003), entre otros; con la finalidad de evaluar la producción de cuerpos fructíferos y la actividad enzimática de dichas cepas.

Con respecto a la producción de cuerpos fructíferos por especies de *Pleurotus*, es importante mencionar los resultados obtenidos por Sihanca, 2009; acerca de las Eficiencias Biológicas alcanzadas por algunas de las cepas estudiadas en este trabajo de investigación. En el cuadro 3, se observa que las cepas 30, 98, 253 y 257, presentaron variación en cuanto a su EB en las diferentes fórmulas de sustrato usadas, sin embargo, la cepa CP-30 mostró la mayor EB en la fórmula 22 con 104.95 %, seguida de la cepa CP-98, en la fórmula 20 con 63.31 %.

Cuadro 3. Comparación de la EB mostrada por cepas de *Pleurotus* en diversas fórmulas.

Cepa	Especie	Eficiencia biológica				
		Fórmula C17	Fórmula C18	Fórmula C19	Fórmula C20	Fórmula C22
CP-30	<i>P. levis</i>	81.21±9.28 bc	83.38±5.93 c	72.48±14.72 c	101.51±25.02 ab	104.95±11.90 a
CP-98	<i>Pleurotus spp</i>	NP	NP	46.72±18.57 b	63.31±10.1 a	39.50±9.39 b
CP-253	<i>P. djamor</i>	47.932±5.40 a	51.503±6.30 a	NP	50.685±2.00 a	46.598±4.88 a
CP-267	<i>P. ostreatus</i>	52±7.31 a	49.01±3.60 a	27.6±10.4 c	32.38±3.72 b	57.30±9.01 a

Fuente: Sihanca, 2009.

Otro trabajo interesante, es el realizado por Ramírez, 2005; quién estudio la EB, de las cepas CP-253 y CP-50 en sustrato de aserrín (con pH 11) y paja de trigo; quién reporta que la cepa CP-50 presentó una mayor EB en el sustrato paja de trigo con 135.9 % (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de la EB mostrada por cepas de *Pleurotus* en diversas fórmulas.

Cepa	Especie	Eficiencia biológica	
		Aserrín	Paja de trigo
CP-253	<i>P. djamor</i>	14.1 ± 2.36*	120.1 ± 7.41
CP-50	<i>P. ostreatus</i>	94.8 ± 3.80*	135.9 ± 5.3

*pH 11, del sustrato

Fuente: Ramírez, 2006.

Estos resultados indican que la EB producida por las diferentes especies de *Pleurotus*, depende de la cepa y la afinidad de estas al sustrato.

Y en referencia a los trabajos de investigación para evaluar la actividad enzimática por cepas de *Pleurotus*, tenemos los siguientes (Cuadro 5):

Cuadro 5. Antecedentes relacionados con la actividad de celulasas por diferentes cepas de hongos comestibles mediante fermentación sólida.

Investigación	organismos	Tipo de fermentación	Sustrato para determinar la producción de celulasas	Método para la detección de azúcares reductores	Autor
Evaluación de la actividad de enzimas lignocelulíticas de cepas de <i>L. edodes</i> y <i>Pleurotus</i> spp. En fermentación en estado sólido y sumergida de varios sustratos lignocelulósicos	<i>L. edodes</i> IBB 123, <i>L. edodes</i> IBB 363, <i>L. edodes</i> IBB 369, <i>P. dryinus</i> IBB 903, <i>P. ostreatus</i> IBB 8, <i>P. ostreatus</i> IBB 108, <i>P. tuberregium</i> IBB 624, <i>P. ostreatus</i> IBB 2175 y <i>P. ostreatus</i> IBB 2191	Paja de trigo y hojas de árbol <i>Fagus sylvatica</i> . Y sumergida (50 ml de medio con cáscaras de mandarina, manzana y plátano, con una concentración de glucosa de 40 g/l)	CMC y en papel filtro	DNS (Miller, 1959)	Elisashvili <i>et al.</i> , 2008a.
Se estudio el efecto del tamaño de partícula del sustrato y la adición de fuentes de nitrógeno en la producción de proteínas y enzimas lignocelulíticas	2 cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> (IE- y CP-50)	Bagazo de caña de azúcar	CMC	DNS (Miller, 1959)	Membrillo <i>et al.</i> , 2008.
Se estudio la actividad enzimática específica de xilanasas, celulasas y lacasas	<i>Trametes</i> sp. (EUM1), <i>Pleurotus ostreatus</i> (IE8) y <i>Aspergillus niger</i> (AD96.4)	Bagazo de caña de azúcar	CMC	DNS (Miller, 1959)	Márquez-Araque <i>et al.</i> , 2007

rastrajo de maíz					
Producción de enzimas lignocelulósicas, durante el crecimiento y fructificación del hongo comestible <i>Lentinus tigrinus</i> , sobre paja de trigo	<i>Lentinus tigrinus</i>	Paja de trigo (77%), suplementada con harina de trigo (20%) y CaCO ₃ (3%)	CMC 0.5 % para endoglucanasas, xilano 0.2% para endoxilanasas.	Nelson y Somogyi.	Lechner y Papinutti, 2005.
Reducción de sustratos. Cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> (IE 38) y <i>Pleurotus pulmonarius</i> (IE 4, IE 135 e IE 226) sobre pulpa de café: cambio en la producción de algunas enzimas lignocelulósicas	<i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Pleurotus pulmonarius</i>	Pulpa de café	CMC	DNS (Miller, 1959)	Velázquez-Cedeño <i>et al.</i> , 2002.
Utilización del sustrato banana para la producción de enzimas celulíticas y lignolíticas por fermentación sólida del sustrato, usando 2 especies de <i>Pleurotus</i> (<i>P. ostreatus</i> y <i>P. sajor caju</i>)	<i>P. ostreatus</i> y <i>P. sajor caju</i>	Sustrato banana	Papel filtro y CMC		Reddy <i>et al.</i> , 2003
Detección de enzimas extracelulares producidas por <i>Pleurotus</i> spp. crecidas sobre pulpa de café	6 cepas de <i>Pleurotus</i> spp.: <i>P. djamor</i> (Fr) Boedjin, IE-121 y IE-218; <i>P. ostreatus</i> (Jacq. Fr.) Kumm, IE-38, IE-49, y	Pulpa de café	CMC	DNS (Miller, 1959).	Salmones y Mata, 2002

La habilidad de estos hongos para degradar materiales lignocelulósicos se debe a su eficiente sistema enzimático, el cual produce hidrolasas (celulasas y hemicelulasas), que son responsables de la degradación de polisacáridos; así como oxidasas que degradan la lignina (lignolíticas) y abren los anillos fenílicos (Sánchez, 2009). En el caso particular del género *Pleurotus*, las actividades de lacasas y endoglucanasas han sido asociadas con las etapas de colonización y fructificación de estos hongos (Salmones y Mata, 2002).

Por tal motivo, al considerar todos los factores antes mencionados de los que depende la producción de celulasas por las cepas en estudio, como resultado se obtendrán mejores microorganismos celulolíticos; y su posterior cultivo "*in vitro*" nos permitirá contar con una fuente fácilmente disponible de enzimas celulolíticas para ser utilizadas en la hidrólisis de residuos lignocelulósicos.

Diversos sustratos se han utilizado para la determinación enzimática de hongos celulolíticos, tales como: CMC (Elisashvili *et al.*, 2008a; Membrillo *et al.*, 2008; Márquez-Araque *et al.*, 2007; Lechner y Papinutti, 2005; Velázquez-Cedeño *et al.*, 2005; Reddy *et al.*, 2003; Salmones y Mata, 2002; Inglis *et al.*, 2000, Lynd *et al.*, 2002; Buswell *et al.*, 1996; Garzillo *et al.*, 1994), Avicel (Inglis *et al.*, 2000 y Buswell *et al.*, 1996) y papel filtro (Elisashvili *et al.*, 2008a; Inglis *et al.*, 2000 y Reddy *et al.*, 2003), en la mayoría de las investigaciones. Y en el caso de la medición de azúcares reductores liberados, se usan frecuentemente dos métodos para su determinación: del ácido dinitrosalicílico (DNS; Miller, 1959) (Elisashvili *et al.*, 2008a; Membrillo *et al.*, 2008; Márquez-Araque *et al.*, 2007; Velázquez-Cedeño *et al.*, 2005; Salmones y Mata, 2002; Inglis *et al.*, 2000; Lynd *et al.*, 2002), y el método de Nelson-Somogyi (Nelson-Somogyi, 1944) (Lechner y Papinutti, 2005; Buswell *et al.*, 1996 y Garzillo *et al.*, 1994).

4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Actualmente el incremento en la demanda de alimentos por la sociedad constituye un grave problema, debido a que la satisfacción de esta demanda se logra a través de actividades agrícolas intensivas que provocan el deterioro del medio ecológico. Otro problema, también importante es la generación de residuos agroindustriales y de las industrias del papel y forestal.

En este sentido la producción de hongos comestibles constituye una alternativa para ambos problemas. Se trata de una biotecnología compatible con el medio físico, económico y social, si se aplica apropiadamente. Permite obtener biomasa para consumo humano, sin aumentar la presión sobre los recursos naturales disponibles, toda vez que se recicla el subproducto por acción del hongo (Martínez–Carrera *et al.*, 1993). Y como resultado de este proceso biotecnológico se obtiene un alimento humano con alto valor medicinal, proteínico, y comercial.

Particularmente las especies del género *Pleurotus* pueden utilizar casi todos los desechos agrícolas como sustratos, ya que durante el crecimiento del micelio y la maduración de los cuerpos fructíferos, secretan enzimas extracelulares para degradar materiales insolubles en los sustratos a moléculas simples con la finalidad de obtener nutrientes (Kuforiji y Fasidi, 2008). Las cepas con alta producción de estas enzimas podrían mostrar ventajas durante la etapa de colonización, biodegradando los sustratos y produciendo hongos (Buswell *et al.*, 1996; Salmones y Mata, 2002).

En el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla, se tiene una muestra representativa de las principales especies de *Pleurotus* que crecen en México, las cuales han sido identificadas a nivel molecular. Algunas de estas especies representan recursos genéticos con sistemas enzimáticos específicos que pueden tener implicaciones importantes para la producción comercial de “setas”. A la fecha no se ha caracterizado la producción de enzimas por parte de estos recursos genéticos nativos. En el presente trabajo de investigación se planteó determinar la producción

de celulasas, proteína y biomasa, por diversas especies de hongos comestibles (*Pleurotus*) aisladas de diversas regiones de México. Esto permitirá llevar a cabo una selección inicial a nivel de laboratorio, ya que las cepas que presenten una mayor actividad enzimática podrían tener la capacidad de degradar más eficientemente los compuestos lignocelulósicos y al mismo tiempo, mostrar mejores rendimientos de hongos comestibles.

5. HIPÓTESIS

1) Los recursos genéticos nativos de *Pleurotus* mostrarán patrones diferentes en su sistema enzimático, específicamente en la producción de proteína y celulasa.

2) Existirá una correlación entre la producción de proteína y la enzima estudiada.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Caracterizar el sistema enzimático de diversas especies de *Pleurotus* que crecen en México, determinando la producción de proteína y celulasa. Esto con el objetivo de desarrollar en el largo plazo un criterio de selección de cepas para la producción rural de hongos comestibles.

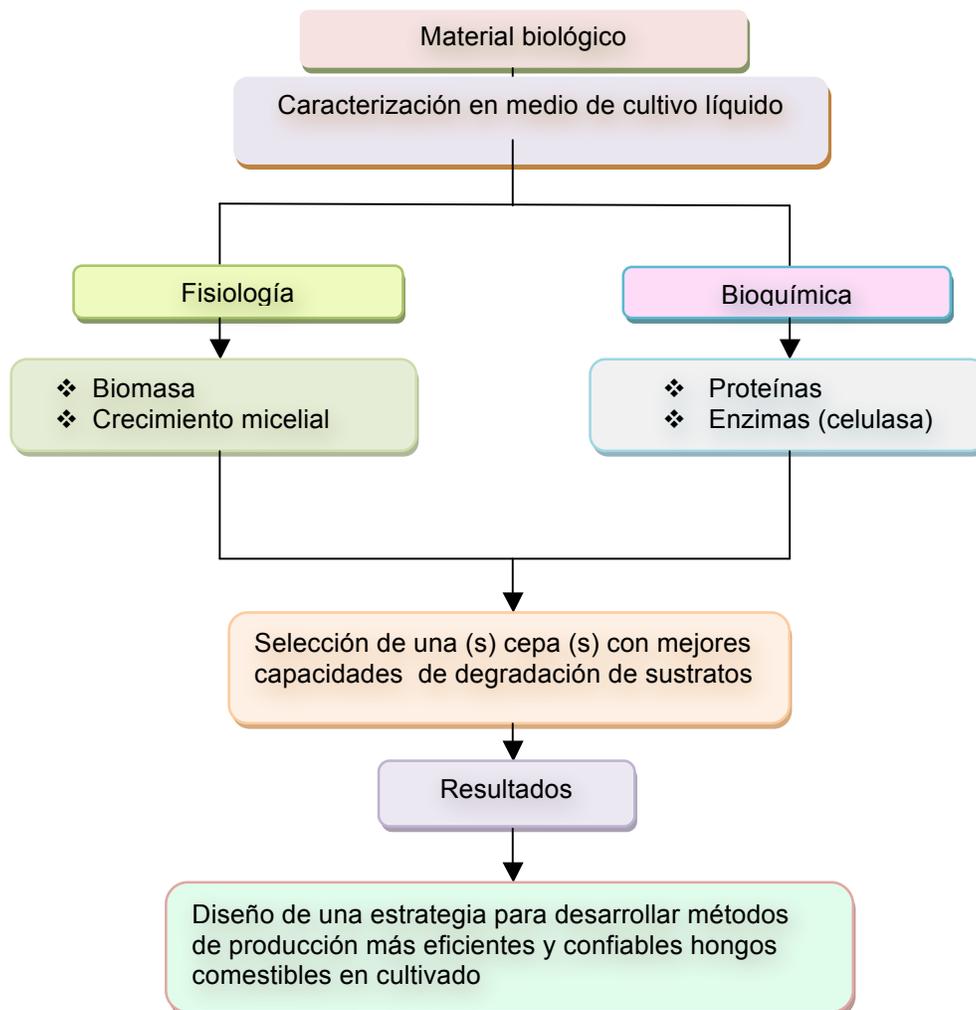
6.2. Objetivos particulares

- Seleccionar un medio de cultivo líquido que estimule la producción de enzimas celulolíticas de cepas de *Pleurotus*.
- Comparar la actividad enzimática de 13 cepas agrupadas en 6 especies pertenecientes al género *Pleurotus*, en fermentación líquida a los 14, 21 y 28 días de incubación.
- Caracterizar macroscópicamente las colonias desarrolladas en dicho medio.
- Evaluar la producción de biomasa desarrollada por las cepas en estudio.
- Evaluar la producción de proteína de las 13 cepas en estudio en el medio de cultivo líquido y a los días de incubación antes mencionados.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. La figura 9 muestra de manera general la metodología seguida en este trabajo.

Figura 9. Esquema general que muestra la metodología propuesta en este trabajo de investigación.



7.1. Material biológico

Se estudiaron 12 cepas de hongos comestibles pertenecientes al género *Pleurotus* procedentes de diversas regiones de México y, una cepa comercial de *P. ostreatus* (CP-50) usada como testigo. Las cepas se mantuvieron y sembraron en agar papa dextrosa [(PDA) (Bioxon, México)]. En el cuadro 6, se muestran las especies, la clave asignada en el CREGENHC (Sobal *et al.*, 2007), donde actualmente se encuentran depositadas y el lugar de procedencia. El material biológico estudiado estuvo

representado por cepas nativas provenientes de 10 estados, a saber: Chiapas (2 cepas), Durango (1 cepa), Hidalgo (1 cepa), Morelos (1 cepa), Nuevo León (1 cepa), Puebla (2 cepas), Tabasco (1 cepa) Tlaxcala (1 cepa), Veracruz (1 cepa) y Yucatán (1 cepa).

Cuadro 6. Cepas del género *Pleurotus* empleadas en esta investigación.

Especie	Cepa	Procedencia
<i>P. cystidiosus</i>	CP-18	Veracruz
<i>P. levis</i>	CP-30	Puebla
<i>P. djamor</i>	CP-44	Morelos
<i>P. ostreatus</i>	CP-50	Comercial
<i>P. spp.</i>	CP-98	Hidalgo
<i>P. djamor</i>	CP-120	Puebla
<i>P. djamor</i>	CP-171	Yucatán
<i>P. spp.</i>	CP-194	Tlaxcala
<i>P. djamor</i>	CP-253	Tabasco
<i>P. djamor</i>	CP-257	Chiapas
<i>P. djamor</i>	CP-261	Chiapas
<i>P. ostreatus</i>	CP-267	Nuevo León
<i>P. pulmonarius</i>	CP-328	Durango

CP= Colegio de Postgraduados.

7.2. Investigaciones preliminares para determinar el medio de cultivo que promueva la actividad de la enzima celulasa

Con la finalidad de seleccionar un medio de cultivo que estimulara la producción de la enzima celulasa en las cepas de *Pleurotus*, se llevaron a cabo diversos ensayos (anexo I) cultivando únicamente la cepa CP-50 (*P. ostreatus*) en 6 medios de cultivo líquidos, a saber: caldo papa dextrosa (PDB, Difco), extracto de Malta (Marca comercial), medio completo para levaduras (CYM), extracto de paja de trigo (E.P.T.), extracto de paja de trigo más peptona (E.P.T. + P) y Solka Floc (S.F.). En el anexo II se muestran las cantidades y el modo de preparación de los medios de cultivo utilizados y en el anexo III se reportan los resultados encontrados. Siendo el medio de cultivo Solka Floc el que demostró la mayor actividad enzimática por lo que se

decidió continuar las investigaciones con dicho medio y cuya preparación es la siguiente.

Medio de cultivo líquido con Solka Floc usado como fuente de carbono

Este medio fue preparado de acuerdo a Elisashvili *et al* (2008a), quien reportó las siguientes cantidades de reactivos para preparar un litro de medio de cultivo: 10.0 g de glucosa (J.T. Baker), 1.0 g de NH_4NO_3 (J.T. Baker), 0.8 g de KH_2PO_4 (J.T. Baker), 0.2 g de Na_2HPO_4 (Química Meyer), 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker), 2.0 g de extracto de levadura (Bioxon). Posteriormente, el medio de cultivo fue esterilizado a 121 °C, durante 25 min. Se vertieron 13 ml del medio de cultivo en cajas Pétri (60x15 mm) bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar (VECO, México). Cabe mencionar que, la glucosa fue sustituida por el reactivo Solka Floc y el NH_4NO_3 por peptona.

7.3. Inoculación de los medios de cultivo

Todas las cepas fueron cultivadas en cajas Pétri con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA). Una vez que el micelio cubrió las cajas Pétri, se tomaron pequeños círculos de aproximadamente 0.5 cm de diámetro, los cuales sirvieron para inocular el medio de cultivo líquido Solka Floc. Cada caja de Pétri fue sembrada con un inóculo de 0.5 cm de diámetro previamente colonizado por la cepa en estudio.

7.4. Muestreo

Se programó una cinética de crecimiento a diferentes días de incubación (0, 14, 21 y 28 días). Durante cada tiempo se fueron tomando muestras aleatorias ($n= 2$) de cada cepa, es decir dos cajas por tiempo y se procedieron a su análisis o estudio.

7.5. Obtención del extracto enzimático

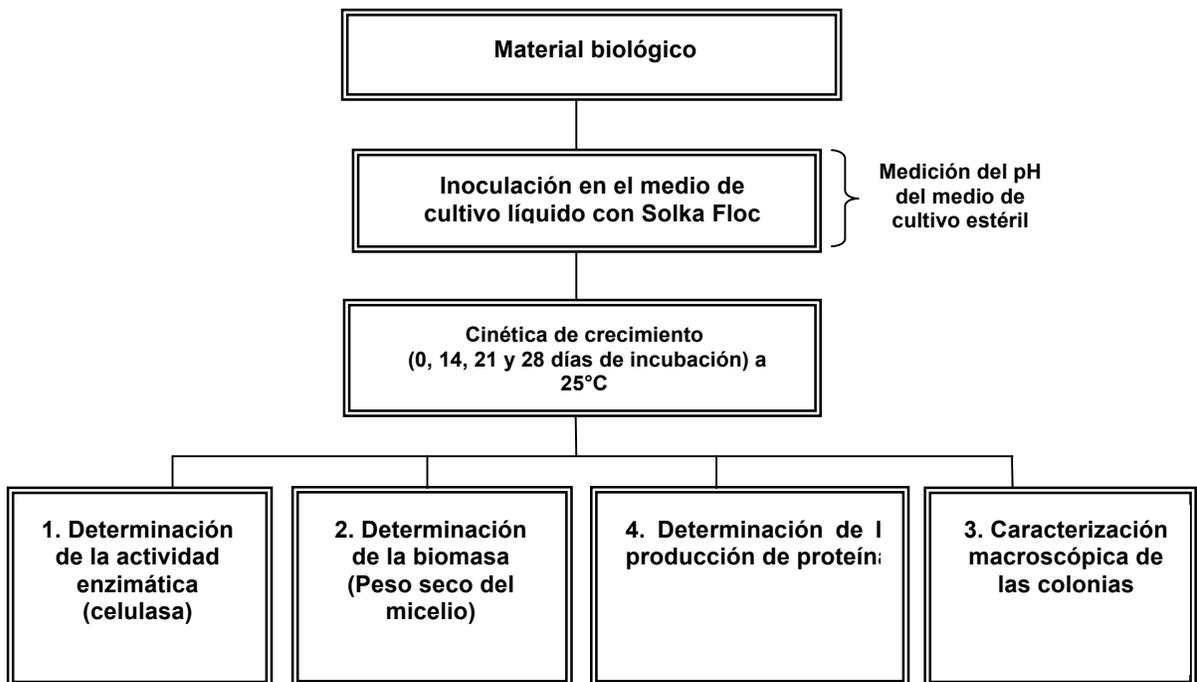
Una vez que las colonias fueron cosechadas, se procedió a homogenizar el medio de cultivo líquido con una micro pipeta (Rainin, U.S.A) utilizando puntas estériles. Se tomaron 2 ml del medio de cultivo y colocaron en tubos Eppendorf de la misma capacidad; estos fueron rotulados especificando la cepa, el tiempo de incubación, la réplica y la fecha. Las muestras se centrifugaron en una microcentrífuga (Eppendorf,

E.U.A) a 5000 rpm, durante 7 min, a temperatura ambiente para obtener el sobrenadante el cual fue almacenado a -20 °C.

7.6. Análisis de las variables

A continuación se describe la manera en que se analizaron las variables consideradas en esta investigación. La figura 10 resume la metodología seguida en esta parte del trabajo.

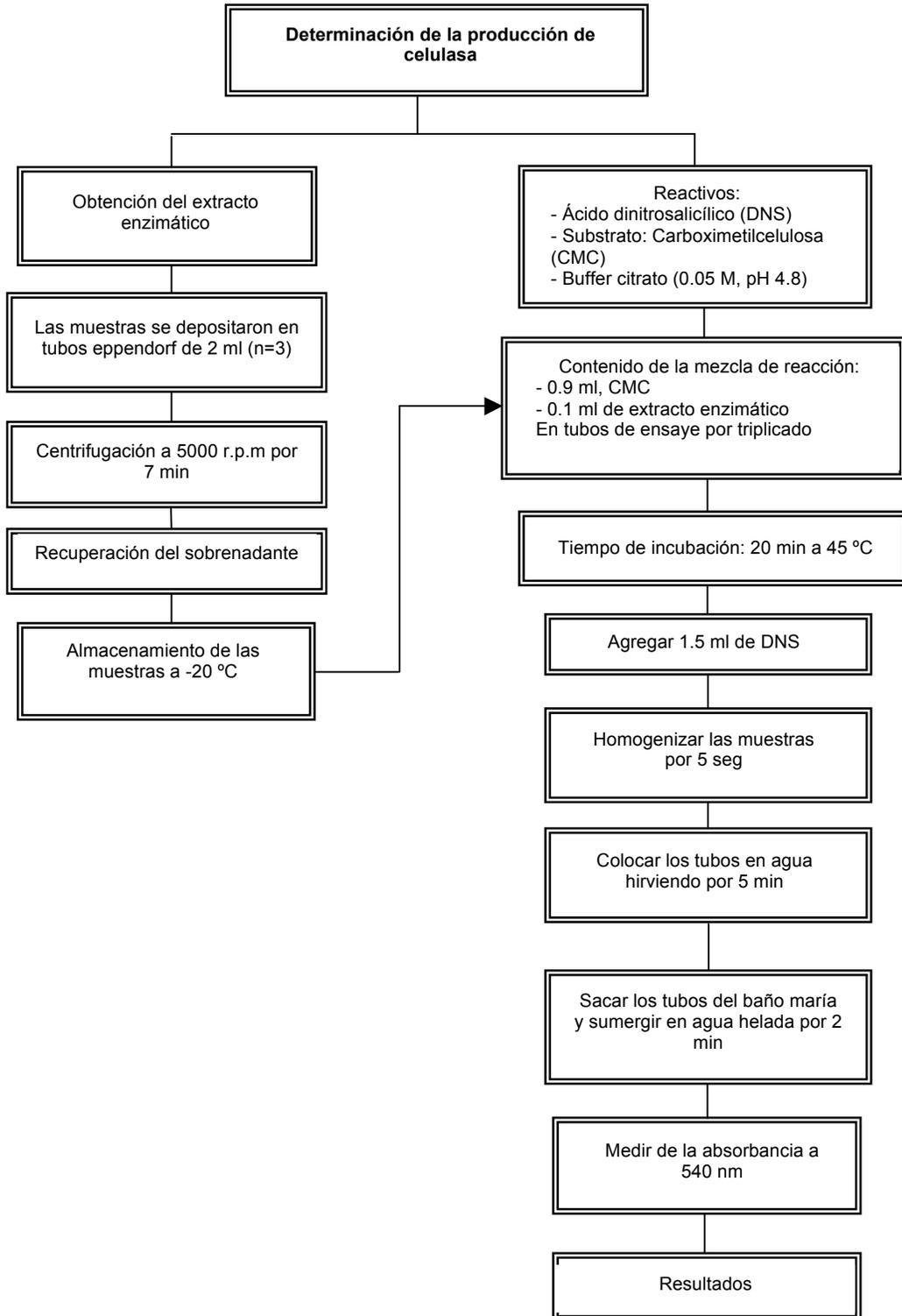
Figura 10. Diagrama general de la metodología utilizada para determinar la actividad enzimática, producción de la biomasa y de proteínas, así como la caracterización macroscópica de las cepas de *Pleurotus* en medio de cultivo líquido con Solka Floc, como fuente de carbono.



7.6.1. Determinación de la actividad de la enzima celulasa

La determinación de celulasa se llevó a cabo por el método de Miller (1959) usando el ácido dinitrosalicílico y como sustrato se usó carboximetilcelulosa (CMC, SIGMA). La longitud de onda se fijó a 540 nm. El diagrama de flujo que resume los principales pasos para determinar la actividad de la enzima celulasa se muestra en la figura 11.

Figura 11. Diagrama que muestra como se determino la actividad de la enzima celulasa en las cepas cultivadas en medio de cultivo líquido con Solka Floc, como fuente de carbono.



Preparación de los reactivos

Preparación del citrato de sodio

Para la preparación de este reactivo se vertieron 360 ml de agua destilada y estéril en un vaso de precipitado y enseguida se le agregó el citrato de sodio ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, 14.71 g/l) (Sigma, E.U.A.), esta mezcla se agito en una parrilla de agitación (Thermolyne).

Preparación del ácido cítrico

Bajo las mismas condiciones que en el caso anterior, se vertieron 640 ml de agua destilada y estéril en un vaso de precipitado y posteriormente se adicionó el ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, 10.5 g/l) (Sigma, E.U.A.).

Preparación del buffer citrato (0.05 M, pH 4.8)

La preparación del buffer citrato también se llevo a cabo en condiciones de agitación, se agregó primero la solución del citrato de sodio ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, 14.71 g/l) (Sigma, E.U.A.), y se tomó la lectura del pH inicial de la solución. Posteriormente fue adicionada poco a poco la solución de ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, 10.5 g/l) (Sigma, E.U.A.), hasta lograr ajustar el pH de la solución citrato a 4.8.

Preparación del sustrato (CMC)

Se disolvió 1 g de carboximetilcelulosa (Sigma, E.U.A.), en 100 ml de buffer citrato de sodio (0.05M, pH 4.8). Para disolver esta mezcla, fue necesario usar una parrilla de agitación y agregar lentamente la carboximetilcelulosa hasta diluirla completamente (este procedimiento duró aproximadamente 2 h). El sustrato se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Preparación del DNS 1%

El reactivo del ácido dinitrosalicílico (DNS, Sigma) al 1% se preparó pesando 10 g de ácido dinitrosalicílico (Sigma, E.U.A.), 2 g de fenol (Sigma, E.U.A.), 0.5 g de sulfito de sodio (J. T. Baker) y 10 g de hidróxido de sodio (J. T. Baker) en 1 l de agua destilada previamente esterilizada. Este reactivo se conservó en un frasco Schott, cubierto con papel aluminio y almacenado a temperatura ambiente.

Curva estándar a base de glucosa al 0.1 M

Se preparó una solución de glucosa al 0.1 M para realizar la curva estándar. Para tal fin se disolvieron 0.901 g de glucosa (J. T. Baker), en 50 ml del buffer citrato (0.05 M, pH 4.8). Posteriormente se realizaron tres diluciones que sirvieron para graficar una curva de concentraciones conocidas con la finalidad de calcular los azúcares reductores liberados por la enzima celulasa (Cuadro 7) (Anexo IV).

Cuadro 7. Diluciones de glucosa y sus respectivas concentraciones ($\mu\text{Mol/ml}$), para realizar la curva estándar.

Dilución de glucosa	Concentración de glucosa $\mu\text{Mol/ml}$	ECU
1:25 (2 ml / 50 ml)	4.0	6.67
1:15 (3 ml / 50 ml)	6.0	10.01
1:10 (3 ml / 50 ml)	10.00	16.67

ECU= Unidad de enzima celulasa.

Reacción enzimática

La mezcla de la reacción se preparó colocando 0.9 ml de sustrato (CMC) y 0.1 ml de extracto enzimático (según la dilución que requiera cada muestra en estudio), en tubos de ensaye por triplicado. El tiempo de incubación fue por 20 min, a 45 °C, transcurrido este tiempo se adicionaron a las muestras 1.5 ml de DNS. Cabe mencionar que para cada muestra se preparó un blanco, el cual se realizó con las mismas cantidades de reactivos, solo que el extracto enzimático se adicionó después de agregar el DNS, al final del tiempo de incubación. Las mezclas se homogenizaron en un vórtex y, enseguida los tubos se colocaron en agua hirviendo por 5 min, e inmediatamente después fueron transferidos a un recipiente con agua helada, para detener la reacción. Todas las lecturas de la cinética se midieron a 540 nm en un espectrofotómetro (PerkinElmer, Lambda EZ201, E.U.A.).

Actividad específica de la enzima celulasa

Un valor adicional que se obtiene de acuerdo a lo reportado por Mirzaakhmedov *et al* (2007), Han *et al* (2005) y Li *et al* (2005), consiste en calcular la actividad específica de la enzima presente en el medio de cultivo. Este valor se calcula dividiendo la actividad enzimática entre la proteína total (expresada en mg).

7.6.2. Determinación de la producción de biomasa

A los diferentes días de incubación se tomaron simultáneamente muestras del extracto enzimático y de la biomasa producida por cada cepa. Para obtención de la biomasa desarrollada por las cepas, se cosechó el micelio producido por cada cepa con la ayuda de una espátula estéril, y se colocó en una charola de aluminio, previamente pesada; se tomo el peso fresco de las colonias y posteriormente se colocaron en un horno (Felisa, 144AD, México) a 95 °C por 24 h y registrando al final el peso seco.

7.6.3. Determinación de proteína

La determinación de proteínas se llevó a cabo en cada uno de los tiempos (0, 14, 21, 28 días). La proteína total se determino por medio del Kit de Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, U.S.A.) el cual se basa en el método de Bradford (Bradford, 1976). Este método incluye la adición de un colorante ácido a la solución con proteína y la subsecuente medición a 595 nm con un espectrofotometro (PerkinElmer, Lambda EZ201, E.U.A.). Posteriormente, se compara con una curva estándar que provee la concentración de la proteína.

Preparación de la curva estándar de la proteína

Se uso seroalbúmina bovina (BSA, Sigma) como proteína estándar para preparar la curva de calibración que representara la relación entre la concentración de la proteína y la absorbancia a 595 nm. Se preparo una solución stock de BSA de 1.0 mg/ml en agua destilada. A partir de esta solución se prepararon soluciones conocidas de acuerdo al Cuadro 8. La reacción se preparo mezclando 800 µl de cada una de las diluciones de BSA más 200 µl de la solución Bradford del Kit de Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, U.S.A.). La mezcla se agito en un vortex y se incubo a temperatura ambiente por 30 min. La absorvancia se midió a una longitud de onda de 595 nm contra un control sin proteína (reactivo Bradford más agua destilada) en un espectrofotómetro (Perkin Elmer, Lambda EZ201, USA) (Anexo V). La curva estándar (absorvancia contra concentración de BSA) se grafico y con la ecuación que se obtiene se calculo la concentración de la proteína de las muestras. La curva estándar se repitió para cada determinación.

Cuadro 8. Preparación de las concentraciones de la solución estándar de seroalbúmina bovina.

Solución stock [1 mg/ml] (μ l)	Cantidad de agua destilada (μ l)	Concentración final de la solución estándar (ug/ml)
4	1996	2
20	1980	10
36	1964	18
44	1956	22

Determinación de la proteína en los cultivos con las cepas de hongos

La concentración proteica de las muestras se determino de la siguiente manera: a 800 μ l de extracto enzimático (en algunos casos se diluyo la muestra en agua destilada y estéril), se le adicionaron 200 μ l de la solución Bradford del Kit de Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, U.S.A.); posteriormente la mezcla se agitó en un vórtex y se incubó la reacción por 30 min a temperatura ambiente. Inmediatamente después, se realizó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm contra un blanco (como se menciona anteriormente) en un espectrofotómetro (Perkin Elmer, Lambda EZ201, USA). La proteína en los extractos enzimáticos se determino por medio de la formula $y = mx + b$, obtenida de la curva estándar.

Donde:

y = absorbancia de la muestra.

x= concentración de proteína.

b= ordenada al origen.

Esta fue ajustada para los casos donde se hicieron diluciones. Para obtener los valores de mg de proteína por mililitro, se despejó la fórmula anterior. Y se sustituyeron en “y” los valores de la absorbancia de cada muestra en estudio, posteriormente se hicieron los calculos correspondientes y finalmente se múltiplico el resultado obtenido por el número de veces en que se diluyó la muestra.

7.7. Caracterización macroscópica de las colonias

A los 28 días de incubación, se registraron las características macroscópicas de las colonias desarrolladas por las cepas, tales como: crecimiento micelial (lento, moderado ó rápido), color, textura, densidad, tipo de micelio aéreo y, adicionalmente también se observaron las características que presentó el medio de cultivo con la presencia de las diferentes cepas.

7.8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos para cada variable y cepa en estudio, se analizaron estadísticamente, empleando el programa de computo SPSS (versión 15) (Anexo VI). Se calcularon las medias, desviaciones estándar, y las diferencias significativas fueron estimadas usando la prueba de rangos múltiples de Duncan a $p < 0.05$. Además fue calculado el coeficiente de correlación de Pearson, para determinar alguna relación significativa entre la producción de celulasas y proteína de cada cepa durante los diferentes días de incubación.

8. RESULTADOS

8.1 Análisis de las variables

8.1.1. Curva estándar para celulasas

Con los datos obtenidos de las absorvancias pertenecientes a las diluciones de la glucosa se construyó la curva estándar para cuantificar el producto de la reacción de enzima celulasa (Figura 12).

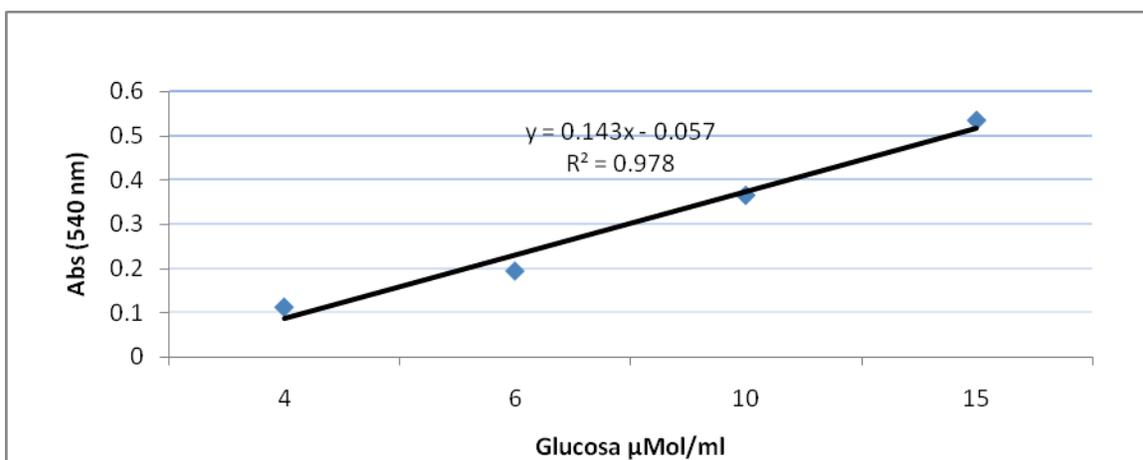


Figura 12. Curva estándar para la determinación de la actividad de la celulasa.

Y a partir de la gráfica obtenida se creó la línea de regresión, la pendiente y la ordenada al origen (ecuación de la recta: $y = mx+b$)

Donde:

y = absorvancia de la muestra.

x= concentración de azúcares reductores.

b= ordenada al origen.

De esta ecuación se obtiene la concentración de azúcares reductores presentes en la muestra.

8.1.2. Curva estándar para proteínas

Con los datos obtenidos de las lecturas de absorvancia de las diferentes diluciones del reactivo BSA (seroalbúmina bovina) se construyó la curva estándar para proteínas (Figura 13).

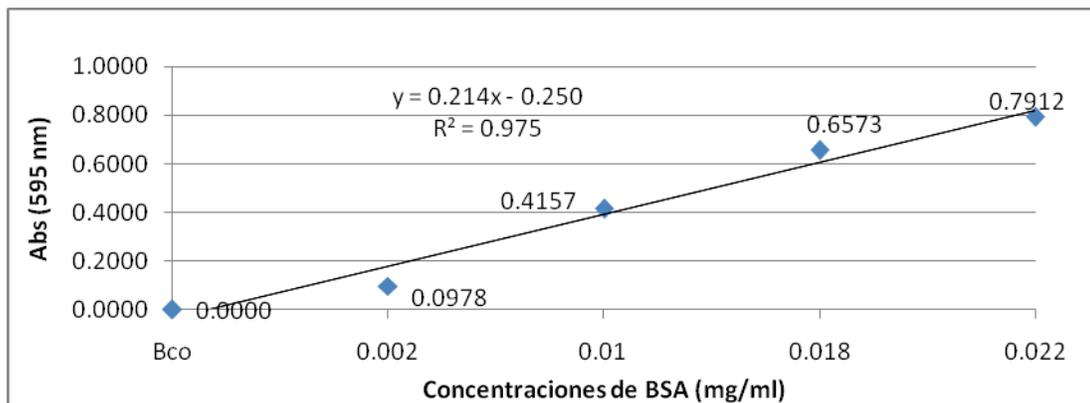


Figura 13. Curva estándar para determinar la cantidad de proteína producida por las cepas en estudio.

8.2. Caracterización del material biológico cultivado en medio de cultivo líquido

Cada cepa seleccionada fue caracterizada tomando como base las variables biomasa, proteína, actividad enzimática y morfología de la colonia. Estos resultados se analizaron estadísticamente para comparar las variables estudiadas. De manera detallada se muestran a continuación los resultados obtenidos por cada cepa

8.2.1. Cepa CP-18 (*Pleurotus cystidiosus*)

La cepa CP-18 de *P. cystidiosus* mostró un crecimiento micelial lento y no alcanzó a invadir completamente la caja Petri al final de la cinética en estudio (28 días), la colonia presentó color blanco, con textura algodonosa y, densidad y micelio aéreo abundantes (Figura 14).



Figura 14. Colonización de *P. cystidiosus* (CP-18), sobre medio de cultivo líquido Solka Flocc, a 28 días de incubación

En esta cepa no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) en la producción de celulasa, pero sí en la producción de proteína y biomasa, donde se obtuvo una

diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) y significativa respectivamente ($p < 0.05$), con respecto a los días de incubación considerados en la cinética de estudio (Cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-18 de *Pleurotus cystidiosus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Fuente	Grados de libertad	Valor de F.	Valor de p
Celulasa	23	0.484	0.697
Proteína	7	88.79	0.000
Biomasa	7	12.248	0.017

Por otro lado, también se aplicó una prueba de rangos múltiples de Duncan tomando en cuenta la producción de celulasas, proteína y biomasa por dicha cepa a los diferentes días de incubación, resultando la formación de dos grupos homogéneos (a y b). En esta cepa la máxima producción de celulasa (0.3448 UI) y proteína 6.2308 ($\mu\text{g/ml}$) se obtuvo al día 28 de la fermentación y, en el caso de la biomasa la mayor producción se obtuvo en el día 21 (7.7847 mg/ml), disminuyendo al final de la cinética (Cuadro 10).

Cuadro 10. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-18 de *Pleurotus cystidiosus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.

Incubación (días)	Variables					
	Celulasa (UI)		Proteína ($\mu\text{g/ml}$)		Biomasa (mg/ml)	
0	0.3312 \pm 0.0265	a	2.9005 \pm 0.0430	b	.0888 \pm 0.0118	b
14	0.3341 \pm 0.0267	a	6.0579 \pm 0.3569	a	3.3138 \pm 1.5792	b
21	0.3399 \pm 0.0068	a	5.8477 \pm 0.0859	a	7.7847 \pm 1.7854	a
28	0.3448 \pm 0.0190	a	6.2308 \pm 0.2974	a	7.7222 \pm 1.8149	a

Nota: Letras diferentes indican que las medias son estadísticamente distintas (Prueba de Duncan, $p \leq 0.05$).

En la figura 15, puede apreciarse la producción de biomasa (A), la cual se fue incrementando gradualmente en cada tiempo de incubación de la cepa CP-18 y, disminuyó ligeramente a los 28 días; sin embargo, en el caso de la producción de proteína y celulasa (B), se observó que estas variables seguían incrementándose paulatinamente durante todo el tiempo de incubación, registrando una mayor producción al final de la cinética (28 días).

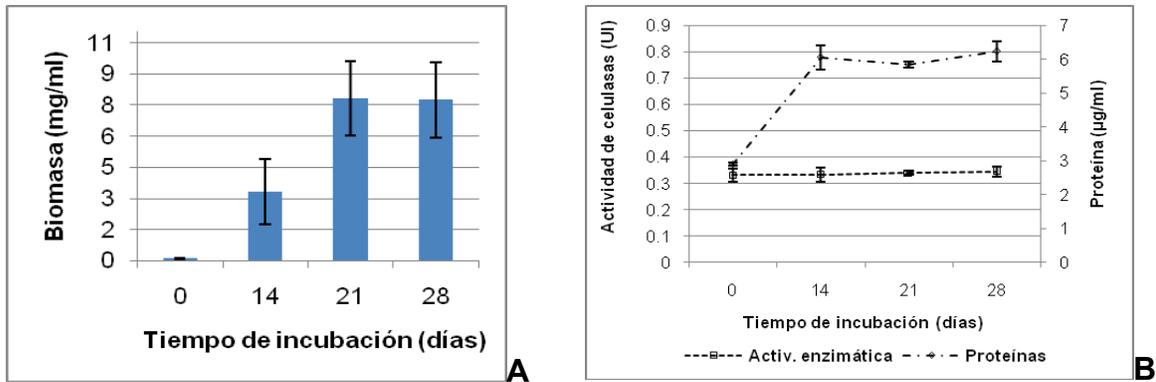


Figura 15. Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-18 de *Pleurotus cystidiosus*, creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.

En el cuadro 11, se puede observar que la máxima actividad específica de la celulasa de la cepa CP-18 se presentó en el día 21, en donde también la producción de proteína mostró un aumento considerable.

Cuadro 11. Actividad específica de la celulasa la cepa CP-18 de *Pleurotus cystidiosus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Incubación (días)	Actividad específica (UI/mg)
0	114.1873
14	55.1524
21	58.1323
28	55.3367

8.2.2. Cepa CP-30 (*P. levis*)

Al crecer la cepa CP-30 de *P. levis* en medio de cultivo Solka Floc, ésta mostró un crecimiento micelial lento, además se formaron pequeñas colonias satélite de textura lisa, densidad y micelio aéreo escasos, y no alcanzó a invadir completamente la caja Petri al final de la cinética en estudio (Figura 16).



Figura 16. Colonización de *P. levis* (CP-30), sobre medio de cultivo líquido Solka Floc, a 28 días de incubación.

Para la cepa CP-30 (*P. levis*) se obtuvieron diferencias altamente significativas tanto en la producción de celulasa como en la de proteína ($p \leq 0.01$) y en el caso de la producción de biomasa se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a los días considerados en la cinética (Cuadro 12).

Cuadro 12. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-30 de *Pleurotus levis*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Fuente	Grados de libertad	Valor de F.	Valor de p
Celulasa	23	386.530	.000
Proteína	7	51.348	.001
Biomasa	7	7.498	.041

Al aplicar la prueba de rangos múltiples de Duncan para comparar las medias correspondientes a las diferentes variables en estudio con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha \leq 0.05$) se obtuvo la formación de tres grupos (a, b y c) en las tres variables en estudio, lo cual indica, que la producción de estas, a los diferentes días considerados en la cinética en estudio mostró diferencias significativas. Al igual que en la cepa anterior, la mayor producción de celulasa (2.6806 UI) y proteína (11.9677 $\mu\text{g/ml}$) se obtuvo en el día 28 de incubación y, en el caso de la producción de biomasa ocurrió en el día 21 (6.3347 mg/ml), decreciendo al final de la cinética (Cuadro 13).

Cuadro 13. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-30 de *Pleurotus levis*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.

Incubación (días)	Variables					
	Celulasa (UI)		Proteína ($\mu\text{g/ml}$)		Biomasa (mg/ml)	
0	0.3681 \pm 0.0378	c	2.7439 \pm 0.0397	c	0.0222 \pm 0.0118	c
14	0.3875 \pm 0.0415	c	8.4700 \pm 0.2577	b	2.5930 \pm 0.4066	b
21	1.2432 \pm 0.0772	b	8.2528 \pm 0.2676	b	6.3347 \pm 2.9286	b
28	2.6806 \pm 0.2534	a	11.9677 \pm 1.4572	a	5.6305 \pm 0.5421	a

Nota: Letras diferentes indican que las medias son estadísticamente distintas (Prueba de Duncan, $p \leq 0.05$)

En la figura 17, se observa la cinética de producción de biomasa (A), la cual fue incrementando progresivamente del día cero, hasta el día 21, decreciendo en el día

28. En el caso de la producción de proteína y celulasa (B), se observó un comportamiento similar, aumentando del día cero al 28, y la mayor producción se presentó al final de la cinética.

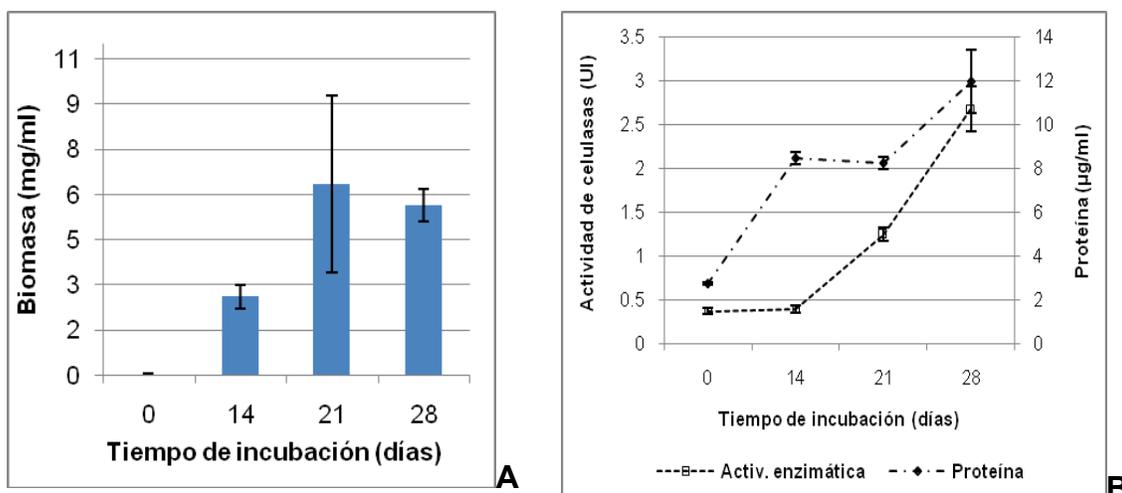


Figura 17. Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-30 de *Pleurotus levis*, creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.

En el cuadro 14, se puede observar que la mayor actividad específica de las celulasa de la cepa CP-30 se presentó en el día 28, en donde también la producción de proteína mostró un aumento considerable.

Cuadro 14. Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-30 de *Pleurotus levis*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Incubación (días)	Actividad Específica (UI/mg)
T0	134.1524
14	45.7526
21	150.6399
28	223.9896

8.2.3. Cepa CP-44 (*P. djamor*)

La forma de comportamiento de la cepa CP-44 en medio de cultivo líquido fue de crecimiento micelial moderado, y al término de la cinética la colonia presentó textura lisa, densidad y micelio aéreo escasos y formó pequeñas fructificaciones rosas.

Al aplicar el análisis de varianza, en la cepa CP-44 de *P. djamor*, no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) en la producción de celulasa, pero sí en la producción de proteína y biomasa, en donde se obtuvo una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$), con respecto a los días de incubación considerados en la cinética de estudio (Cuadro 15).

Cuadro 15. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-44 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Fuente	Grados de libertad	Valor de F.	Valor de p
Celulasas	23	.213	.886
Proteínas	7	162.712	.000
Biomasa	7	38.068	.002

También se aplicó una prueba de rangos múltiples de Duncan tomando en cuenta la producción de celulasa, proteína y biomasa por dicha cepa a los diferentes días de incubación, resultando la formación de un grupo (a) en la producción de celulasa, tres grupos (a, b y c) en la producción de proteína y dos (a y b) en la producción de biomasa. En esta cepa la máxima producción de celulasa (0.3651 UI) y proteína (6.6841 $\mu\text{g/ml}$) se obtuvo en el día 28 de la fermentación y, en el caso de la biomasa la mayor producción se obtuvo en el día 14 (6.2597 mg/ml), decreciendo gradualmente del día 21, hasta el final de la cinética (Cuadro 16).

Cuadro 16. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-44 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.

Incubación (días)	Variables					
	Celulasa (UI)		Proteína ($\mu\text{g/ml}$)		Biomasa (mg/ml)	
0	0.3506 \pm 0.0187	a	2.6457 \pm 0.0991	c	0.0763 \pm 0.0059	b
14	0.3496 \pm 0.0478	a	5.4971 \pm 0.2511	b	6.2597 \pm 0.0177	a
21	0.3564 \pm 0.0543	a	6.5112 \pm 0.2049	a	5.5097 \pm 1.3140	a
28	0.3651 \pm 0.0130	a	6.6841 \pm 0.2379	a	5.6305 \pm 0.1296	a

Nota: Letras diferentes indican que las medias son estadísticamente distintas (Prueba de Duncan, $p \leq 0.05$)

En la figura 18, puede observarse la producción de biomasa (A), en la cual se registró su mayor producción en el día 14, y posteriormente fue decreciendo hasta el final de la cinética (28 días) y, en el caso de la producción de proteína y celulasa (B), se observó que estas variables incrementaron paralelamente durante todo el tiempo de incubación, registrando una mayor producción al término de la cinética.

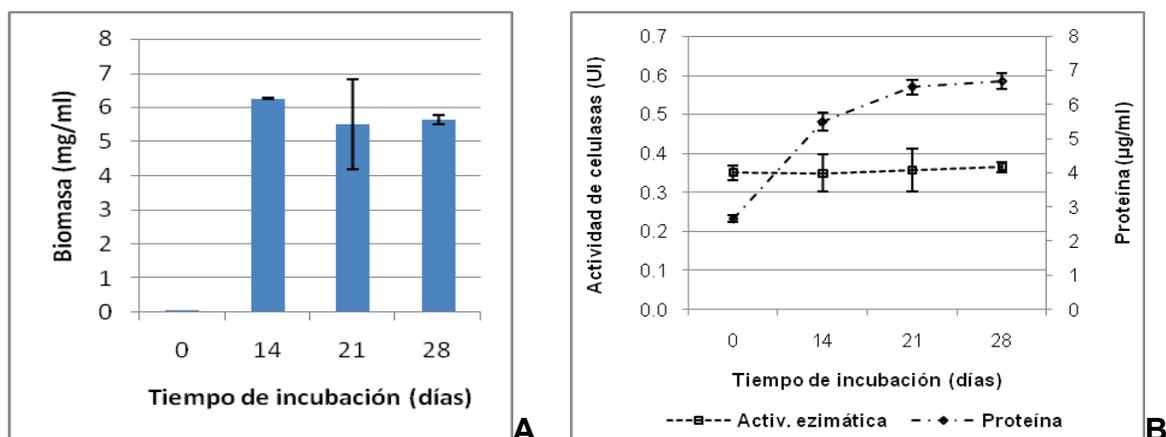


Figura 18. Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-44 de *Pleurotus djamor*, creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.

En el cuadro 17, se puede observar que la mayor actividad específica de las celulasas de la cepa CP-44 se presentó en el día 14, en donde también la producción de proteína mostró un acrecentamiento considerable.

Cuadro 17. Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-44 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Incubación (días)	Actividad Específica (UI/mg)
0	132.5204
14	63.6052
21	54.7439
28	54.6356

8.2.4. CP-50 (*P. ostreatus*)

Esta cepa considerada como testigo, mostró un crecimiento rápido, micelio de color blanco, con textura algodonosa-aterciopelada y, densidad y micelio aéreo abundantes (Figura 19).



Figura 19. Colonización de *P. ostreatus* (CP-50), sobre medio de cultivo líquido Solka Floc, a 28 días de incubación

En la cepa CP-50, considerada como cepa comercial, se obtuvieron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) en la producción de celulasa, proteína y biomasa, con respecto a los diferentes días de incubación (Cuadro 18).

Cuadro 18. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Fuente	Grados de libertad	Valor de F.	Valor de p
Celulasa	23	39.699	.000
Proteína	7	188.784	.000
Biomasa	7	15.702	.011

Al aplicar la prueba de rangos múltiples de Duncan para comparar las medias correspondientes a las diferentes variables en estudio con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha \leq 0.05$) se obtuvo la formación de tres grupos (a, b y c) en la producción de celulasa, a los diferentes días considerados en la cinética en estudio y, tanto en la producción de proteína, como de biomasa se encontró la formación de dos grupos (a y b). En esta cepa, la máxima producción de celulasa (2.0231UI) y biomasa (7.6958 mg/ml) ocurrió a los 14 días de incubación y en el caso de la proteína (7.2915 $\mu\text{g/ml}$) a los 21 días. Una vez que estas variables alcanzaron su mayor producción, fueron decreciendo hasta los 28 días de incubación (Cuadro 19).

Cuadro 19. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.

Incubación (días)	Variables					
	Celulasa (UI)		Proteína (µg/ml)		Biomasa (mg/ml)	
0	0.3564 ± 0.0140	c	2.7415 ± 0.0033	b	0.0541 ± 0.0059	b
14	2.0231 ± 0.1219	a	6.8523 ± 0.1322	a	7.6958 ± 0.2298	a
21	1.2218 ± 0.6152	b	7.2915 ± 0.1322	a	6.6291 ± 2.0683	a
28	0.3331 ± 0.0154	c	6.7869 ± 0.3965	a	5.9250 ± 1.2846	a

Nota: Letras diferentes indican que las medias son estadísticamente distintas (Prueba de Duncan, $p \leq 0.05$)

En la figura 20, se denota la producción de biomasa (A), celulasa y proteína (B), las cuales presentaron un aumento considerable en el día 14 de incubación y después la producción de celulasa decreció drásticamente hasta el final de la cinética (28 días) y en el caso de la producción de proteína y biomasa solo menguó ligeramente hasta el final del periodo de incubación.

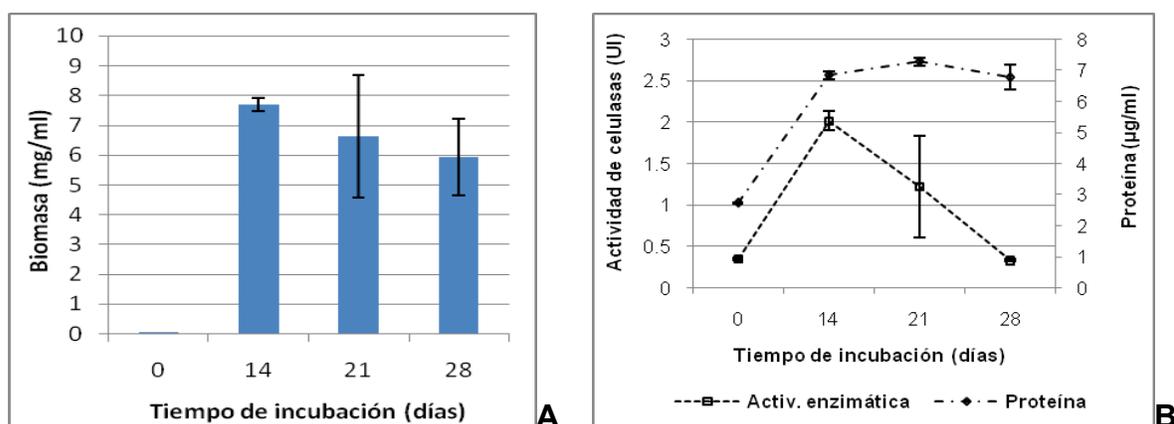


Figura 20. Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.

En el cuadro 20, se puede observar que la mayor actividad específica de la celulasa de la cepa CP-50 se presentó en el día 14, en donde también la producción de proteína presentó un aumento importante.

Cuadro 20. Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Incubación (días)	Actividad Específica (UI/mg)
0	130.0155
14	295.2447
21	167.5676
28	49.0855

8.2.5. CP-98 (*P. sp.*)

La cepa CP-98 de *P. spp.* mostró un crecimiento micelial moderado y no alcanzó a invadir completamente la caja Petri al final de la cinética en estudio (28 días), la colonia presentó color blanco opaco, con textura lisa y consistencia viscosa, densidad abundante y micelio aéreo escaso. Cabe mencionar que el medio de cultivo se torno a un amarillo ligeramente más oscuro y de consistencia viscosa en los primeros días de incubación (Figura 21).



Figura 21. Colonización de *P. sp.* (CP-98), sobre medio de cultivo líquido Solka Floc, a 28 días de incubación.

Al aplicar el análisis de varianza, en la cepa CP-98 de *P. spp.*, se encontró diferencia altamente significativa ($p \leq 0.01$), tanto en la producción de celulasa como en la de proteína, pero no en la producción biomasa ($p \leq 0.05$), con respecto a los días de incubación considerados en la cinética de estudio (Cuadro 21).

Cuadro 21. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-98 de *Pleurotus spp.*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Fuente	Grados de libertad	Valor de F.	Valor de p
Celulasa	23	314.056	.000
Proteína	7	78.300	.001
Biomasa	7	4.881	.080

Además se aplicó una prueba de rangos múltiples de Duncan para comparar las medias correspondientes a las diferentes variables en estudio con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha \leq 0.05$) se obtuvo la formación de dos grupos (a y b) en la producción de celulasa y, tres en la producción de proteína (a, b y c) y biomasa (a, ab y b) a los diferentes días considerados en la cinética en estudio. En esta cepa la máxima producción de celulasa (1.7463 UI) y proteína (18.4710 $\mu\text{g/ml}$) se obtuvo el día 28 de la fermentación y, en el caso de la biomasa la mayor producción se presentó en el día 21 (8.6347 mg/ml), disminuyendo hasta el final de la cinética (Cuadro 22).

Cuadro 22. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-98 de *Pleurotus* spp., a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.

Incubación (días)	Variables					
	Celulasa (UI)		Proteína ($\mu\text{g/ml}$)		Biomasa (mg/ml)	
0	0.3768 \pm 0.0217	b	2.6948 \pm 0.0231	c	.0888 \pm 0.0236	b
14	0.3506 \pm 0.0146	b	7.6299 \pm 0.0000	b	3.0097 \pm 2.0565	ab
21	0.3467 \pm 0.0109	b	10.0037 \pm 1.9825	b	8.6347 \pm 2.8815	a
28	1.7463 \pm 0.1898	a	18.4710 \pm 0.7137	a	6.6180 \pm 3.3293	ab

Nota: Letras diferentes indican que las medias son estadísticamente distintas (Prueba de Duncan, $p \leq 0.05$)

En la figura 22, se observa que la producción de biomasa (A) incrementó gradualmente del tiempo cero al día 21, decreciendo al final del periodo de incubación; no así, en el caso de la producción de celulasa y proteína, en donde ambas fueron incrementando durante los 28 días de fermentación.

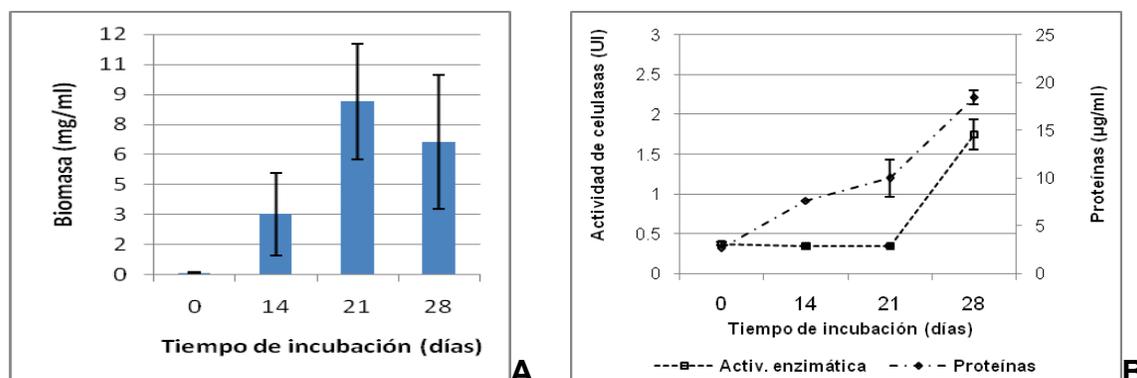


Figura 22. Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-98 de *Pleurotus* spp., creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.

En el cuadro 23, se puede apreciar que la mayor actividad específica de la celulasa de la cepa CP-98 se presentó en el día 28, en donde también la producción de proteína presentó un aumento considerable.

Cuadro 23. Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-98 de *Pleurotus* spp., a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Incubación (días)	Actividad Específica (UI/mg)
0	139.8386
14	45.9536
21	34.6607
28	94.5432

8.2.6. CP-120 (*P. djamor*)

La forma de comportamiento de la cepa CP-120 en medio de cultivo líquido fue de crecimiento micelial moderado, y al término de la cinética la colonia presentó textura lisa, densidad regular y micelio aéreo escaso y formó pequeñas fructificaciones blancas (Figura 23).



Figura 23. Colonización de *P. djamor* (CP-120), sobre medio de cultivo líquido Solka Floc, a 28 días de incubación

En el cuadro 24, se observa que la cepa CP-120, presentó diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) en la producción de celulasa, proteína y biomasa con respecto a los días considerados en la cinética en estudio.

Cuadro 24. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-120 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Fuente	Grados de libertad	Valor de F.	Valor de p
Celulasa	23	6.821	.016
Proteína	7	89.935	.000
Biomasa	7	133.224	.000

Al aplicar la prueba de rangos múltiples de Duncan para comparar las medias correspondientes a las diferentes variables en estudio con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha \leq 0.05$) se obtuvo la formación de cuatro grupos en la producción de celulasa (a, ab, b y bc) y proteína (a, ab, b y c) a los diferentes días considerados en la cinética en estudio, y en la producción de biomasa se formaron tres (a, b y c). En esta cepa se observó, que en el tiempo cero se registró una concentración mayor de celulasa (0.3506 UI) y, la máxima producción de proteína (6.7869 $\mu\text{g/ml}$) y biomasa (4.2555 mg/ml), se obtuvo el día 14 y 28; la producción de proteína fue disminuyendo hasta el final de la fermentación (Cuadro 25).

Cuadro 25. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-120 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.

Incubación (días)	Variables					
	Celulasa (UI)		Proteína ($\mu\text{g/ml}$)		Biomasa (mg/ml)	
0	0.3506 \pm 0.0109	a	2.8537 \pm 0.0297	c	-0.0402 \pm 0.0059	c
14	0.3418 \pm 0.0149	ab	6.7869 \pm 0.4229	a	3.2180 \pm 0.4066	b
21	0.3341 \pm 0.0068	bc	6.1981 \pm 0.1983	ab	4.2263 \pm 0.0412	a
28	0.3205 \pm 0.0137	c	5.9084 \pm 0.2379	b	4.2555 \pm 0.2828	a

Nota: Letras diferentes indican que las medias son estadísticamente distintas (Prueba de Duncan, $p \leq 0.05$)

En la figura 24, se observa que la producción de biomasa (A), incrementó progresivamente del día cero al 21 y se mantuvo hasta el día 28 de incubación. En contraste con esta variable, en la producción de celulasa (B), no se registró aumento y, su concentración fue decreciendo hasta el final de la cinética en estudio. Y la máxima producción de proteína se presentó en el día 14 decreciendo ligeramente hasta el día 28.

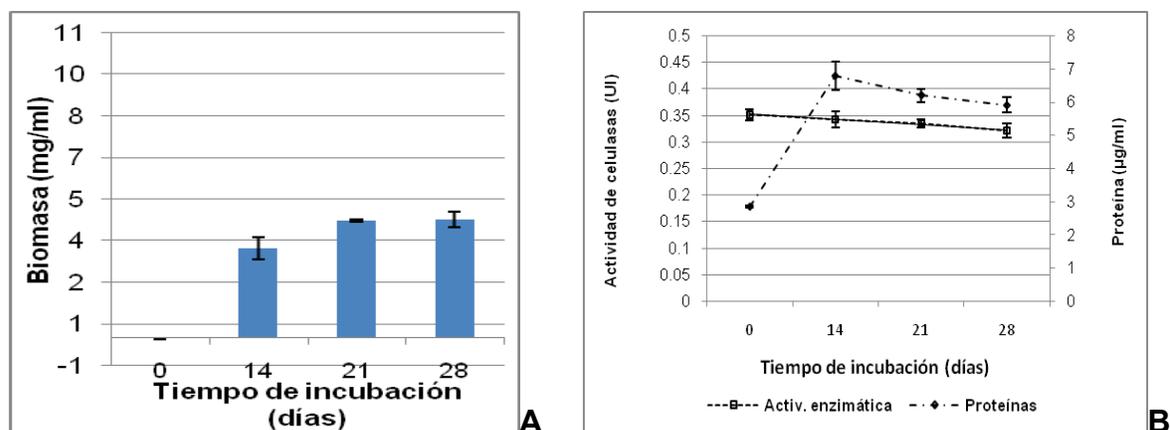


Figura 24. Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-120 de *Pleurotus djamor*, creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.

En el cuadro 26, se puede apreciar que la actividad específica de la celulasa de la cepa CP-120 fue incrementando gradualmente del día cero al 28, lo cual coincide con el rango de mayor producción de proteína.

Cuadro 26. Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-120 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Incubación (días)	Actividad Específica(UI/mg)
0	122.8640
14	50.3734
21	53.9050
28	54.2469

8.2.7. CP-171(*P. djamor*)

Al crecer la cepa CP-171 de *P. djamor* en medio de cultivo Solka Floc, ésta mostró un crecimiento micelial moderado, de textura algodonosa con agregaciones hifales, densidad regular y micelio aéreo escaso, invadiendo completamente la caja Petri al final de la cinética en estudio (Figura 25).



Figura 25. Colonización de *P. djamor* (CP-171), sobre medio de cultivo líquido Solka Floc, a 28 días de incubación.

Al aplicar el análisis de varianza, en la cepa CP-171 de *P. djamor*, se encontró diferencia altamente significativa ($p \leq 0.01$), en la producción de proteína; y en la producción de celulasa y biomasa no se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), con respecto a los días de incubación considerados en el periodo de incubación (Cuadro 27).

Cuadro 27. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-171 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Fuente	Grados de libertad	Valor de F.	Valor de p
Celulasa	23	2.926	.059
Proteína	7	110.553	.000
Biomasa	7	4.059	.105

También se aplicó una prueba de rangos múltiples de Duncan para comparar las medias correspondientes a las diferentes variables en estudio con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha \leq 0.05$) se obtuvo la formación de tres grupos en la producción de celulasa (a, ab y b), proteína (a, b y c) y biomasa (a, ab y b) a los diferentes días considerados en la cinética en estudio. La mayor producción de celulasa (0.3729 UI) se presentó el día 14 de incubación, decreciendo al final de la cinética en estudio y en el caso de la producción de proteína (6.7168 $\mu\text{g/ml}$) y biomasa (9.8638 mg/ml) el día 28 (Cuadro 28).

Cuadro 28. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-171 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.

Incubación (días)	Variables					
	Celulasa (UI)		Proteína ($\mu\text{g/ml}$)		Biomasa (mg/ml)	
0	0.3525 \pm 0.0146	ab	2.7883 \pm 0.0693	c	-0.0152 \pm 0.0177	b
14	0.3729 \pm 0.0469	a	6.2682 \pm 0.1916	a	6.5180 \pm 2.1744	ab
21	0.3477 \pm 0.0226	ab	5.3710 \pm 0.1388	b	7.0597 \pm 1.2080	ab
28	0.3263 \pm 0.0096	b	6.7168 \pm 0.4031	a	9.8638 \pm 5.3151	a

Nota: Letras diferentes indican que las medias son estadísticamente distintas (Prueba de Duncan, $p \leq 0.05$)

En la figura 26, se observa que la producción de biomasa (A) incrementó gradualmente del tiempo cero al día 28; no así, en el caso de la producción de

celulasa (B), en donde después de su máxima producción a los 14 días, fue decreciendo hasta el final de la fermentación y con respecto a la producción de proteína, se obtuvo su mayor producción al final de la cinética en estudio, al igual que en la producción de biomasa.

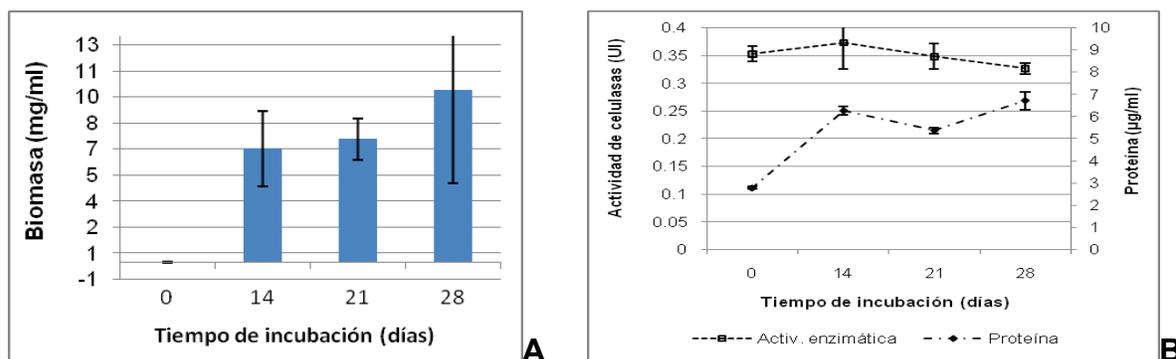


Figura 26. Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-171 de *Pleurotus djamor*, creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.

En el cuadro 29, se puede apreciar que la mayor actividad específica de la celulasa de la cepa CP-171 se presentó en el día 21, lo cual coincide con el rango de mayor producción de proteína.

Cuadro 29. Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-171 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Incubación (días)	Actividad Específica (UI/mg)
0	126.4433
14	59.5002
21	64.7377
28	48.5855

8.2.8. CP-194 (*P. spp.*)

La cepa CP-194 de *P. spp.* mostró un crecimiento micelial lento y no alcanzó a invadir completamente la caja Petri al final de la cinética en estudio (28 días), la colonia presentó color blanco, con textura ligeramente algodonosa, densidad y micelio aéreo escasos. Cabe mencionar que el medio de cultivo, al igual que en la cepa CP-98 se torno a un amarillo ligeramente más oscuro, pero de consistencia líquida (Figura 27).



Figura 27. Colonización de *P. spp.* (CP-194), sobre medio de cultivo líquido Solka Flocc, a 28 días de incubación.

Para la cepa CP-194 (*P. spp.*) se obtuvieron diferencias altamente significativas en la producción de celulasa, proteína y biomasa ($p \leq 0.01$), con respecto a los días de incubación considerados en la cinética de estudio (Cuadro 30).

Cuadro 30. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-194 de *Pleurotus spp.*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Flocc.

Fuente	Grados de libertad	Grados de libertad	Valor de p
Celulasa	23	23	.000
Proteína	7	7	.000
Biomasa	7	7	.013

Al aplicar la prueba de rangos múltiples de Duncan para comparar las medias correspondientes a las diferentes variables en estudio con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha \leq 0.05$) se obtuvo la formación de dos grupos (ab) en la producción de celulasa y biomasa a los diferentes días considerados en la cinética en estudio, y en la producción de proteína se formaron cuatro (a, b, c y d). En esta cepa se observó un patrón similar en la producción de celulasa (0.6857 UI) y proteína (15.7327 $\mu\text{g/ml}$), cuya mayor producción se presentó a los 28 días de fermentación, no así en la producción de biomasa, en donde la máxima producción (3.1819 mg/ml), se registró a los 21 días de incubación, disminuyendo al final de la cinética en estudio (Cuadro 31).

Cuadro 31. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-194 de *Pleurotus spp.*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Flocc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.

Incubación (días)	Variables					
	Celulasa (UI)	Proteína (µg/ml)		Biomasa (mg/ml)		
0	0.3234 ± 0.0128	b	2.9471 ± 0.0099	d	0.0277 ± 0.0471	b
14	0.3127 ± 0.0150	b	9.2467 ± 0.1190	c	2.8402 ± 0.9487	a
21	0.3419 ± 0.0485	b	13.1439 ± 0.0528	b	3.1819 ± 0.0766	a
28	0.6857 ± 0.1486	a	15.7327 ± 1.4406	a	2.5555 ± 0.4832	a

Nota: Letras diferentes indican que las medias son estadísticamente distintas (Prueba de Duncan, $p \leq 0.05$)

En la figura 28, se observa que la producción de biomasa (A) incrementó gradualmente del tiempo cero al día 21, decreciendo al final del periodo de incubación; no así, en el caso de la producción de celulasa y proteína (B), en donde ambas fueron incrementando durante los 28 días de fermentación.

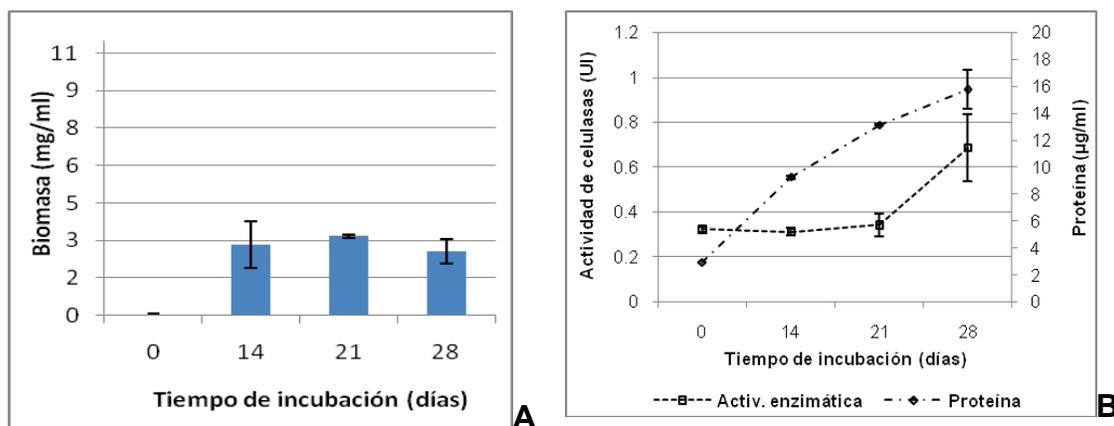


Figura 28. Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-194 de *Pleurotus* spp., creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.

En el cuadro 32, se puede apreciar que la mayor actividad específica de la celulasa de la cepa CP-194 se presentó en el día 28, en donde también la producción de proteína mostró un aumento considerable.

Cuadro 32. Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-194 de *Pleurotus* spp., a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Incubación (días)	Actividad Específica (UI/mg)
0	109.7404
14	33.8220

8.2.9. CP-253 (*P. djamor*)

La forma de comportamiento de la cepa CP-253 en medio de cultivo líquido fue de crecimiento micelial moderado, y al término de la cinética la colonia presentó textura lisa, densidad y micelio aéreo escasos (Figura 29).



Figura 29. Colonización de *P. djamor* (CP-253), sobre medio de cultivo líquido Solka Floc, a 28 días de incubación.

En esta cepa no se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la producción de celulasa y biomasa, pero sí en la producción de proteína, en donde se obtuvo una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$), con respecto a los días de incubación considerados en la cinética de estudio (Cuadro 33).

Cuadro 33. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-253 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Fuente	Grados de libertad	Valor de F.	Valor de p
Celulasa	23	1.052	.391
Proteína	7	35.144	.002
Biomasa	7	4.339	.095

Al aplicar la prueba de rangos múltiples de Duncan para comparar las medias correspondientes a las diferentes variables en estudio con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha \leq 0.05$), se obtuvo la formación de un grupo (a) en la producción celulasa y, tres en la producción de proteína (a, b y c) y biomasa (a, ab y b). En esta cepa la producción mayor producción de celulasa se observó el día 21 (0.3457 UI), y de proteína (6.8990 $\mu\text{g/ml}$) y biomasa (7.7527 mg/ml) se presentó en el día 14, decreciendo al final de la cinética en todos los casos (Cuadro 34)

Cuadro 34. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-253 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos

Incubación (días)	Variables		
	Celulasas (UI)	Proteína (µg/ml)	Biomasa (mg/ml)
0	0.3370 ±0.0068	a 2.6457 ±0.0991	c -0.1138± 0.0236
14	0.3302 ±0.0149	a 6.8990 ±0.8723	a 7.7527 ±4.0659
21	0.3457 ±0.0203	a 6.5158 ±0.2775	a 4.3152 ±0.6776
28	0.3379 ±0.0218	a 4.7775 ±0.1057	b 4.6486 ±1.5262

Nota: Letras diferentes indican que las medias son estadísticamente distintas (Prueba de Duncan, $p \leq 0.05$)

En la figura 30, se denota la producción de biomasa (A) y proteína (B), las cuales aumentaron considerable en el día 14 de incubación y, posteriormente decrecieron al final de la cinética. En el caso de la producción de celulasa se observó un ligero incremento del día cero hasta el final de la fermentación.

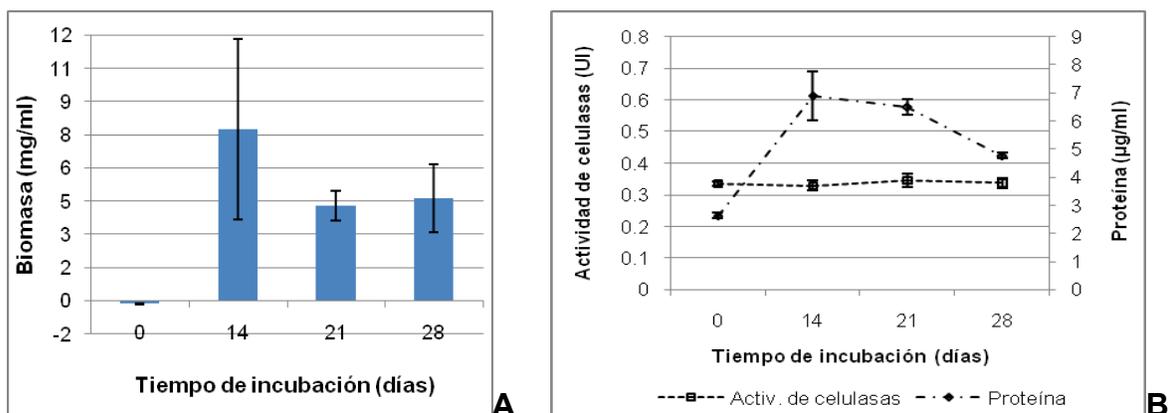


Figura 30. Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-253 de *Pleurotus djamor*, creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.

En el cuadro 35, se puede apreciar que la actividad específica de las celulasas de la cepa CP-253 fue incrementando gradualmente del día cero al 28, lo cual coincide con el rango de mayor producción de proteína.

Cuadro 35. Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-253 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Incubación (días)	Actividad Específica (UI/mg)
0	127.3811
14	47.8652
21	53.0650
28	70.7463

8.2.10. CP-257(*P. djamor*)

La cepa CP-257 (*P. djamor*) presentó crecimiento moderado, micelio blanco de textura lisa, con densidad y micelio aéreo escasos. En esta cepa se obtuvieron diferencias altamente significativas en la producción de celulasa, proteína y biomasa ($p \leq 0.01$), con respecto a los días de incubación considerados en la cinética de estudio (Cuadro 36).

Cuadro 36. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-257 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Fuente	Grados de libertad	Valor de F.	Valor de p
Celulasa	23	15.824	.000
Proteína	7	159.533	.000
Biomasa	7	32.037	.003

Al aplicar la prueba de rangos múltiples de Duncan para comparar las medias correspondientes a las diferentes variables en estudio con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha \leq 0.05$) se obtuvo la formación de dos grupos (a y b) en la producción de celulasa y biomasa a los diferentes días considerados en la cinética en estudio, y en la producción de proteína se formaron cuatro (a, ab, b y c). En esta esta cepa se observó, que en el tiempo cero se registró una concentración mayor de celulasa (0.3593 UI), la cual fue disminuyendo hasta el final de la fermentación; por otro lado la máxima producción de biomasa (5.8708 mg/ml) y proteína (5.8570 $\mu\text{g/ml}$) se obtuvo a los 14 y 28 días de incubación respectivamente, cabe mencionar que la producción biomasa decreció hasta el final de la cinética en estudio (Cuadro 37).

Cuadro 37. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-257 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas. (Prueba de Duncan, $p \leq 0.05$)

Incubación (días)	Variables					
	Celulasa (UI)		Proteína ($\mu\text{g/ml}$)		Biomasa (mg/ml)	
0	0.3593 \pm 0.0131	a	2.6457 \pm 0.0991	b	0.1375 \pm 0.1002	c
14	0.3525 \pm 0.0233	a	5.4925 \pm 0.2181	a	5.8708 \pm 1.1490	a

En la figura 31, puede apreciarse la producción de biomasa (A), la cual presentó un incremento considerable en el día 14 de incubación y posteriormente fue disminuyendo paulatinamente hasta el término de la fermentación. En el caso de la producción de celulasa se observó que la concentración de celulasa fue mayor en el tiempo cero y después en los siguientes días decreció (14, 21 y 28); en contraste con esta variable, la producción de proteína (B) fue incrementando gradualmente hasta el día 28 de incubación.

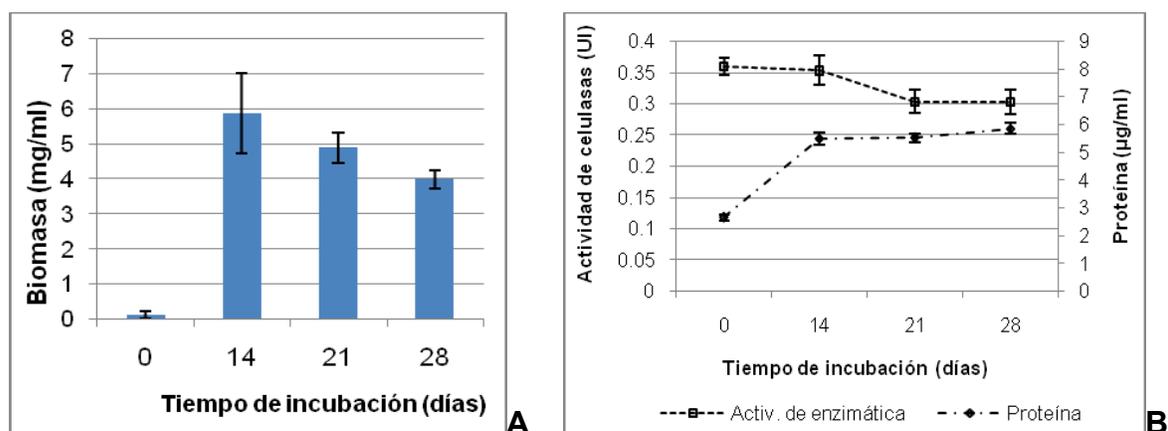


Figura 31. Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-257 de *Pleurotus djamor*, creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.

En el cuadro 38, se puede apreciar que la mayor actividad específica de la celulasa de la cepa CP-257 se presentó en el día 14, en donde también la producción de proteína mostró un aumento considerable.

Cuadro 38. Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-257 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Incubación (días)	Actividad Específica (UI/mg)
0	135.8242
14	64.1898
21	54.9843
28	51.5722

8.2.11. CP-261(*P. djamor*)

Al igual que la mayoría de todas las cepas pertenecientes a *P. djamor*, la cepa CP-261, presentó crecimiento moderado, micelio blanco, con textura lisa y, densidad y micelio aéreo escasos. En esta cepa no se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la producción de celulasas y biomasa, pero sí en la producción de proteína, en donde se obtuvo una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$), con respecto a los días de incubación considerados en la cinética de estudio (Cuadro 39).

Cuadro 39. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-261 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Fuente	Grados de libertad	Valor de F.	Valor de p
Celulasa	23	1.479	.250
Proteína	7	40.240	.002
Biomasa	7	9.659	.026

También se aplicó una prueba de rangos múltiples de Duncan para comparar las medias correspondientes a las diferentes variables en estudio con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha \leq 0.05$) se obtuvo la formación de un grupo en la producción de celulasa (a), y dos en la producción de proteína (a y b) y biomasa, a los diferentes días considerados en la cinética en estudio. Al igual que en la cepa anterior, en el tiempo cero se obtuvo una concentración mayor de celulasa (0.3438 UI), la cual fue disminuyendo hasta el final de la fermentación; y la máxima producción de biomasa (6.4777 mg/ml) y proteína (6.2028 $\mu\text{g/ml}$) se obtuvo a los 14 y 21 días de incubación respectivamente, decreciendo hasta el final de la cinética en estudio (Cuadro 40).

Cuadro 40. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-261 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.

Incubación (días)	Variables					
	Celulasa (UI)		Proteína ($\mu\text{g/ml}$)		Biomasa (mg/ml)	
0	0.3438 \pm 0.0109	a	2.6457 \pm 0.0991	b	0.0611 \pm 0.0589	b
14	0.3292 \pm 0.0218	a	6.1233 \pm 0.5551	a	6.4777 \pm 2.3806	a
21	0.3370 \pm 0.0088	a	6.2028 \pm 0.4560	a	5.8736 \pm 0.4419	a

En la figura 32 puede apreciarse la producción de biomasa (A), cuya mayor producción se registró en el día 14 de incubación y posteriormente disminuyó al final de la fermentación. En el caso de la producción de celulasa y proteína (B), se observó que, en la primera variable la concentración fue mayor en el tiempo cero y en los siguientes días de la cinética en estudio decreció, en contraste, la producción de proteína fue incrementándose paulatinamente durante todo el tiempo de incubación, registrando una mayor producción en el día 21.

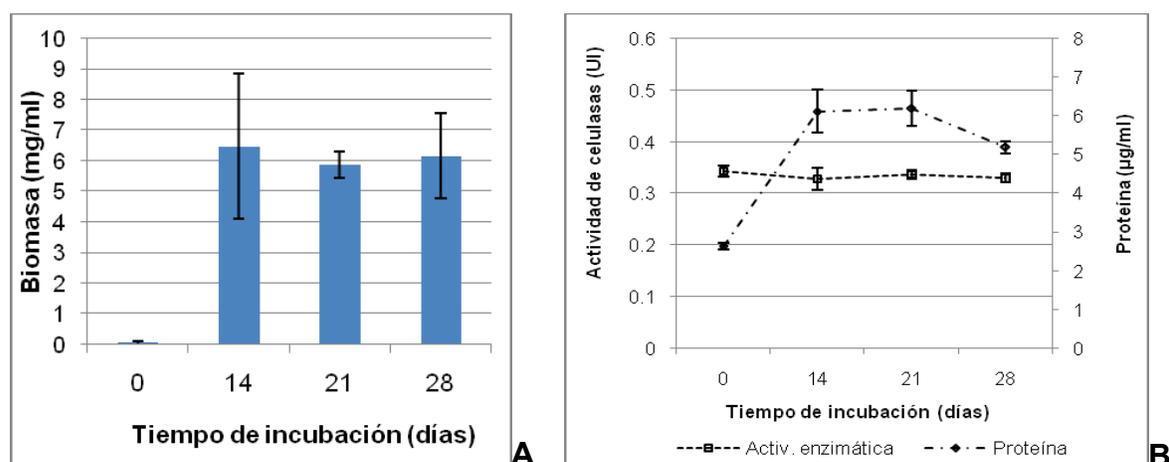


Figura 32. Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-261 de *Pleurotus djamor*, creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.

En el cuadro 41, se puede apreciar que la mayor actividad específica de la celulasa de la cepa CP-261 se presentó en el día 28, lo cual coincide con el rango de mayor producción de proteína.

Cuadro 41. Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-261 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Incubación (días)	Actividad Específica (UI/mg)
0	129.9507
14	53.7701
21	54.3342
28	63.4706

8.2.12. CP-267 (*P. ostreatus*)

La cepa CP-267 de *P. ostreatus* mostró un crecimiento micelial moderado, alcanzando a invadir completamente la caja Petri al final de la cinética en estudio (28

días), la colonia presentó color blanco, con textura lanosa, densidad abundante y micelio aéreo escaso, y además, se observó la formación de metabolitos en el micelio presente en la periferia de la caja Petri (Figura 33).



Figura 33. Colonización de *P. ostreatus* (CP-267), sobre medio de cultivo líquido Solka Floc, a 28 días de incubación

Para la cepa CP-267 (*P. ostreatus*) se obtuvieron diferencias altamente significativas tanto en la producción de celulasa como de proteína ($p \leq 0.01$) y en el caso de la producción de biomasa se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto a los días considerados en la cinética (Cuadro 42).

Cuadro 42. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa proteína y biomasa para la cepa CP-267 de *Pleurotus ostreatus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Fuente	Grados de libertad	Valor de F.	Valor de p
Celulasa	23	70.331	.000
Proteína	7	66.001	.001
Biomasa	7	9.170	.029

Al aplicar la prueba de rangos múltiples de Duncan para comparar las medias correspondientes a las diferentes variables en estudio con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha \leq 0.05$) se obtuvo la formación de dos grupos (a y b) en la producción de celulasa y proteína a los diferentes días considerados en la cinética en estudio, y en la producción de biomasa se formaron tres (a, ab y b). En esta cepa la mayor producción de celulasa (1.0110 UI) y proteína (10.3485) se obtuvo a los 28 días de incubación y en el caso de la producción de biomasa a los 14 (9.5777 mg/ml), disminuyendo al final de la fermentación (Cuadro 43).

Cuadro 43. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-267 de *Pleurotus ostreatus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.

Incubación (días)	Variables		
	Celulasa (UI)	Proteína (µg/ml)	Biomasa (mg/ml)
0	0.3137 ± 0.0077	b 2.7976 ± 0.0562	b 0.2527 ± 0.0589
14	0.3496 ± 0.0215	b 9.3672 ± 1.1895	a 9.5777 ± 2.7224
21	0.4127 ± 0.0935	b 9.1500 ± 0.1090	a 5.0444 ± 1.2728
28	1.0110 ± 0.1662	a 10.3485 ± 0.1190	a 5.1736 ± 1.9033

Nota: Letras diferentes indican que las medias son estadísticamente distintas (Prueba de Duncan, $p \leq 0.05$)

En la figura 34, se observa que la mayor producción de biomasa (A) se obtuvo a los 14 días de incubación y posteriormente decreció al final de la cinética en estudio; no así, en el caso de la producción de celulasa y proteína, en donde ambas fueron incrementando durante los 28 días de fermentación.

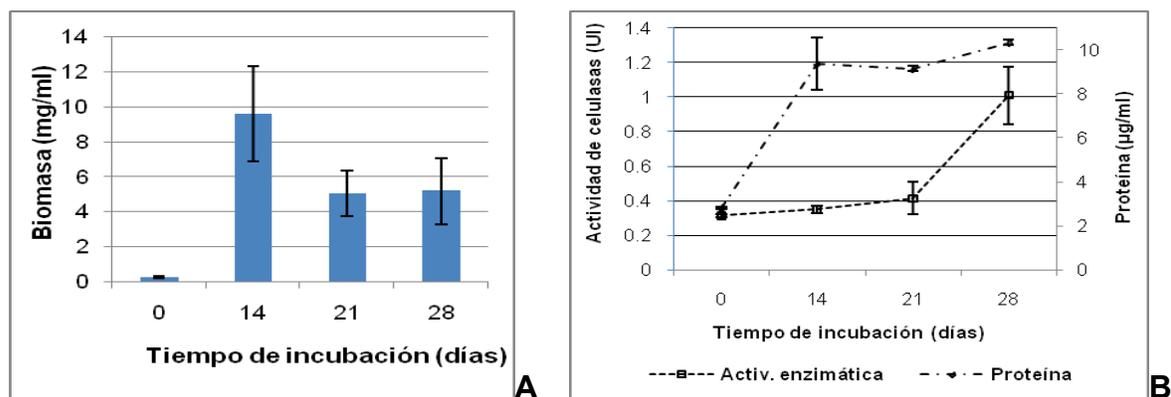


Figura 34. Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-267 de *Pleurotus ostreatus*, creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.

En el cuadro 44, se puede apreciar que la mayor actividad específica de las celulasa de la cepa CP-267 se presentó en el día 28, en donde también la producción de proteína mostró un aumento considerable.

Cuadro 44. Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-267 de *Pleurotus ostreatus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Incubación (días)	Actividad Específica (UI/mg)
0	112.1343
14	37.3267
21	45.1128
28	97.7014

8.2.13. CP-328 (*P. pulmonarius*)

Esta cepa mostró crecimiento rápido, micelio blanco de textura algodonosa-lanosa, con densidad abundante y micelio aéreo regular. Y al igual que en la cepa anterior, al término de la cinética se observó la formación de metabolitos en el micelio presente en la periferia de la caja Petri (Figura 35)



Figura 35. Colonización de *P. pulmonarius* (CP-328), sobre medio de cultivo líquido Solka Floc, a 28 días de incubación.

En la cepa CP-328 (*P. pulmonarius*) se obtuvieron diferencias altamente significativas en la producción de celulasa, proteína y biomasa ($p \leq 0.01$), con respecto a los días de incubación considerados en la cinética de estudio (Cuadro 45).

Cuadro 45. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-328 de *Pleurotus pulmonarius*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Fuente	Grados de libertad	Valor de F.	Valor de p
Celulasa	23	1280.662	.000
Proteína	7	158.085	.000
Biomasa	7	13.482	.015

Al aplicar la prueba de rangos múltiples de Duncan para comparar las medias correspondientes a las diferentes variables en estudio con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha \leq 0.05$) se obtuvo la formación de cuatro grupos en la producción de celulasa (a, b, c y d), en la producción de proteína tres (a, b y c) y en la producción de biomasa se formaron dos (a y b), a los diferentes días considerados en la cinética en estudio. En esta cepa la mayor producción de celulasa (8.1752 UI) y proteína (15.9275 $\mu\text{g/ml}$) se obtuvo a los 21 y 28 días de incubación respectivamente y en el caso de la producción de biomasa (5.9722 mg/ml) a los 14 días, disminuyendo al final de la fermentación (Cuadro 46).

Cuadro 46. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, proteína y biomasa producidas por la cepa CP-328 de *Pleurotus pulmonarius*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y la formación de grupos homogéneos de las variables estudiadas.

Incubación (días)	Variables					
	Celulasas (UI)		Proteína (µg/ml)		Biomasa (mg/ml)	
0	0.8556 ± 0.0081	d	2.6154 ± 0.0165	c	0.0180 ± 0.0295	b
14	2.9476 ± 0.2406	c	11.1378 ± 0.6113	b	5.9722 ± 1.5910	a
21	8.1752 ± 0.1671	a	14.5023 ± 0.9087	a	3.8680 ± 0.7012	a
28	5.4674 ± 0.0896	b	15.9275 ± 0.7765	a	3.6722 ± 0.7778	a

Nota: Letras diferentes indican que las medias son estadísticamente distintas (Prueba de Duncan, $p \leq 0.05$)

En la figura 36, se observa que la mayor producción de biomasa (A) se obtuvo a los 14 días de incubación y posteriormente decreció al final de la cinética en estudio; no así, en el caso de la producción de celulasa y proteína (B), en donde ambas fueron incrementando durante los días considerados en la cinética en estudio, solo la producción de celulasa decreció en el día 28.

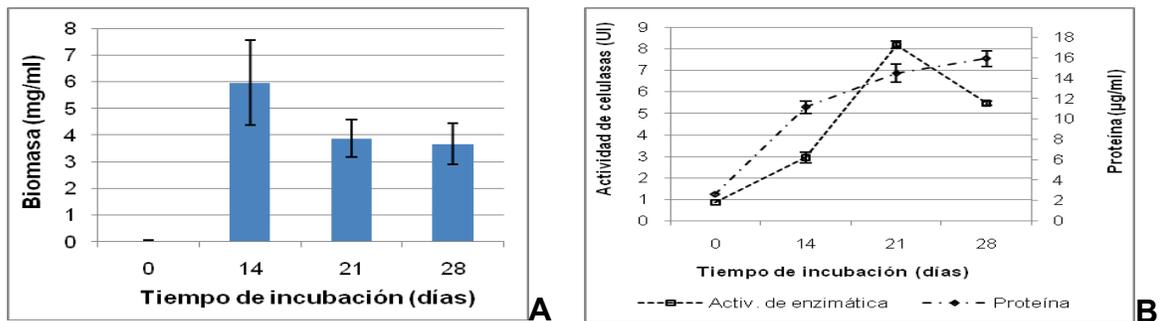


Figura 36. Producción de biomasa (A), actividad enzimática y proteína (B) de la cepa CP-328 de *Pleurotus pulmonarius*, creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C. En el cuadro 47, se puede apreciar que la mayor actividad específica de la celulasa de la cepa CP-328 se presentó en el día 21, lo cual coincide con el rango de mayor producción de proteína.

Cuadro 47. Actividad específica de la celulasa de la cepa CP-328 de *Pleurotus pulmonarius*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

Incubación (días)	Actividad Específica (UI/mg)
0	327.1380
14	264.6472
21	563.7191
28	343.2664

Con base a los resultados correspondientes a la producción de biomasa por las distintas cepas, en la figura 37, se observa que la mayoría de las cepas alcanzaron su crecimiento óptimo entre los días 14 y 21 de incubación, a excepción de la cepa CP-171 que lo alcanzó a los 28 días y además exhibió la mayor producción de biomasa

con 9.8639 mg/ml, seguida de las cepas CP-267 y CP-98 con 9.5778 y 8.6347 mg/ml, respectivamente. En contraste las cepas CP-120 y CP-194 mostraron la menor producción de biomasa durante todos los días considerados en la cinética en estudio.

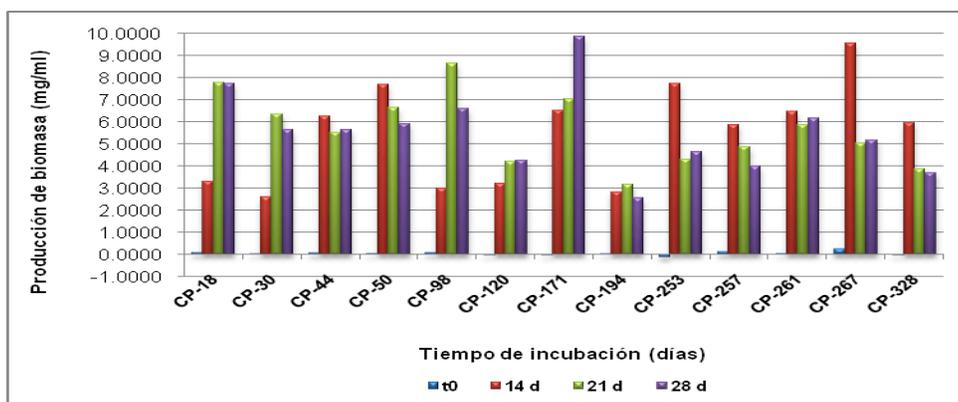


Figura 37. Comparación de la producción de biomasa por las cepas en estudio a diferentes días de incubación en el medio de cultivo Solka Floc.

8.3. Comparación de la actividad enzimática y proteínas entre todas las cepas a diferentes días de incubación

8.3.1. A tiempo cero

Al aplicar el análisis de varianza para comparar las variables entre las 13 cepas en estudio, se encontró la existencia de diferencias altamente significativas tanto en la producción de celulasas como de proteínas ($p \leq 0.01$), con respecto al tiempo cero de incubación (Cuadro 48).

Cuadro 48. Análisis de varianza 13 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* al tiempo cero de incubación, usando medio líquido Solka Floc.

Fuente	Grados de libertad	Valor de F.	Valor de p
Celulasa	74	194.843	.000
Proteína	25	5.786	.002

Para comparar las medias de las variables entre las cepas en estudio, se aplicó la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha \leq 0.05$), en donde se obtuvo la formación de cinco grupos (a, b, bc, bcd y bcde) en la producción de celulasa y en la producción de proteína siete (a, ab, abc, bcd, cde, de, y e), al tiempo cero la cinética en estudio.

En el cuadro 49, se aprecia que al tiempo cero de incubación la producción de celulasa y proteína por las diferentes cepas en estudio fue muy baja, estas fluctuaron entre 0.3137 UI a 0.8556 UI y de 2.9471 µg/ml a 2.6154 µg/ml, respectivamente.

Cuadro 49. Comparación de medias por el método de Duncan y formación de grupos homogéneos de 13 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* a tiempo cero de incubación en fermentación líquida

Variables					
Cepas	Especie	Celulasa (UI)		Proteína (µg/ml)	
328	<i>P. pulmonarius</i>	0.8556 ± 0.0081	a	2.6154 ± 0.0165	e
98	<i>P. spp</i>	0.3768 ± 0.0217	b	2.6948 ± 0.0231	de
30	<i>P. levis</i>	0.3681 ± 0.0378	bc	2.7439 ± 0.0397	cde
257	<i>P. djamor</i>	0.3593 ± 0.0233	bcd	2.6457 ± 0.0991	de
50*	<i>P. ostreatus</i>	0.3564 ± 0.0140	bcd	2.7415 ± 0.0033	cde
171	<i>P. djamor</i>	0.3525 ± 0.0146	bcde	2.7883 ± 0.0694	bcd
120	<i>P. djamor</i>	0.3506 ± 0.0109	bcde	2.8537 ± 0.0297	abc
44	<i>P. djamor</i>	0.3506 ± 0.0187	bcde	2.6457 ± 0.0991	de
261	<i>P. djamor</i>	0.3438 ± 0.0109	bcde	2.6457 ± 0.0991	de
253	<i>P. djamor</i>	0.3370 ± 0.0068	bcde	2.6457 ± 0.0991	de
18	<i>P. cystidiosus</i>	0.3311 ± 0.3312	cde	2.9005 ± 0.0430	ab
194	<i>P. spp</i>	0.3234 ± 0.0128	de	2.9471 ± 0.0099	a
267	<i>P. ostreatus</i>	0.3137 ± 0.0077	e	2.7976 ± 0.0562	bcd

* Cepa comercial

Nota: Letras diferentes indican que las medias son estadísticamente distintas (Prueba de Duncan, $p \leq 0.05$)

8.3.2. A los 14 días de incubación

Al aplicar el análisis de varianza para comparar las variables entre las 13 cepas en estudio, se encontró la existencia de diferencias altamente significativas tanto en la producción de celulasa como de proteínas ($p \leq 0.01$), con respecto al día 14 de incubación (Cuadro 50).

Cuadro 50. Análisis de varianza 13 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* a los 14 días de incubación, usando medio líquido Solka Floc.

Fuente	Grados de libertad	Valor de F.	Valor de p
Celulasa	74	719.663	.000
Proteína	25	22.457	.000

Para comparar las medias de las variables entre las cepas en estudio en el día 14 de incubación, se aplicó la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de

significancia de 0.05 ($\alpha \leq 0.05$), en donde se obtuvo la formación de tres grupos (a, b, y c) en la producción de celulasa y en la producción de proteína siete (a, b, bc, cd, de, ef, y f).

En el cuadro 51, se observa, con respecto a la producción de celulasa que las cepas CP-328 y CP-50 presentaron la mayor producción con 2.9476 UI y 2.023 UI, respectivamente, de las cuales la segunda de ellas alcanzó una mayor actividad de celulasa en este día. Y la producción de celulasa del resto de las cepas osciló de 0.3127 UI a 0.3875 UI, en general estos valores no presentaron una variación significativa, con respecto a los valores obtenidos en el tiempo cero de incubación.

En contraste con la variable anterior, se obtuvo una mayor producción de proteína en este tiempo de incubación, en comparación con los valores registrados al tiempo cero. Las cepas que mostraron la mayor producción fueron las cepas CP-328 (11.1378 $\mu\text{g/ml}$), CP-267 (9.3672 $\mu\text{g/ml}$), CP-194 (9.2467 $\mu\text{g/ml}$), CP-30 (8.4700 $\mu\text{g/ml}$) y la producción de las demás cepas fluctuó de 5.4925 a 6.8990 $\mu\text{g/ml}$ (Cuadro 51).

Cuadro 51. Comparación de medias por el método de Duncan y formación de grupos homogéneos de 13 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* a los 14 días de incubación en fermentación líquida

Cepas	Especie	Variables			
		Celulasa (UI)		Proteína ($\mu\text{g/ml}$)	
328	<i>P. pulmonarius</i>	2.9476 \pm 0.2406	a	11.1378 \pm 0.6113	a
50*	<i>P. ostreatus</i>	2.0231 \pm 0.1219	b	6.8523 \pm 0.1322	de
30	<i>P. levis</i>	0.3875 \pm 0.0415	c	8.4700 \pm 0.2577	bc
171	<i>P. djamor</i>	0.3729 \pm 0.0469	c	6.2682 \pm 0.1916	ef
257	<i>P. djamor</i>	0.3525 \pm 0.0233	c	5.4925 \pm 0.2181	f
98	<i>P. spp</i>	0.3506 \pm 0.0146	c	7.6299 \pm 0	cd
267	<i>P. ostreatus</i>	0.3496 \pm 0.0215	c	9.3672 \pm 1.1895	b
44	<i>P. djamor</i>	0.3496 \pm 0.0478	c	5.4971 \pm 0.2511	f
120	<i>P. djamor</i>	0.3418 \pm 0.0149	c	6.7869 \pm 0.4229	de
18	<i>P. cystidiosus</i>	0.3341 \pm 0.0267	c	6.0579 \pm 0.3569	ef
253	<i>P. djamor</i>	0.3302 \pm 0.0149	c	6.8990 \pm 0.8723	de
261	<i>P. djamor</i>	0.3292 \pm 0.0218	c	6.1233 \pm 0.5551	ef
194	<i>P. spp</i>	0.3127 \pm 0.0150	c	9.2467 \pm 0.1190	b

* Cepa comercial

Nota: Letras diferentes indican que las medias son estadísticamente distintas (Prueba de Duncan, $p \leq 0.05$)

Usando el coeficiente de correlación de Pearson, se obtuvo una correlación altamente significativa ($P \leq 0.01$). En el cuadro 52, se observa que la correlación entre la concentración de proteína y la actividad de celulasa en el medio de cultivo Solka Floc, a los 14 días de incubación fue mediana ($r^2 = 0.505$).

Cuadro 52. Correlación entre la producción de celulasa y proteína de las cepas en estudio a los 14 días de incubación en medio líquido Solka Floc.

		Celulasas	Proteínas
Celulasas	Correlación de Pearson	1	.505(**)
	Sig. (bilateral)		.008
	N	75	26
Proteínas	Correlación de Pearson	.505(**)	1
	Sig. (bilateral)	.008	
	N	26	26

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

8.3.3. A los 21 días de incubación

Al aplicar el análisis de varianza para comparar las variables entre las diferentes cepas en estudio, se encontraron diferencias altamente significativas en la producción de celulasa y proteína ($p \leq 0.01$), en el día 21 de incubación (Cuadro 53).

Cuadro 53. Análisis de varianza 13 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* a los 21 días de incubación, usando medio líquido Solka Floc.

Fuente	Grados de libertad	Valor de F.	Valor de p
Celulasa	74	446.884	.000
Proteína	25	42.405	.000

Al aplicar la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha \leq 0.05$), para comparar las medias de las variables entre las cepas en estudio en el día 21 de incubación, se obtuvo la formación de tres grupos (a, b, y c) en la producción de celulasa y en la producción de proteína siete (a, b, bc, cd, de, ef, y f), al igual que en la comparación de medias de las variables correspondientes al día 14. En donde también las cepas CP-328, CP-30, CP-50 y CP-267 exhibieron la mayor producción de celulasa con 8.1752 UI, 1.2432 UI, 1.2218 UI y 0.4128,

respectivamente, cabe mencionar que de estas cepas, la primera alcanzó su mayor producción de celulasa en este día de incubación. En contraste las cepas que mostraron la menor producción de celulasa fueron las cepas CP-261(0.3370 UI), CP-120 (0.3341 UI) y CP-257 (0.3030 UI), pertenecientes a *P. djamor* (Cuadro 54).

Un patrón similar fue observado, con respecto a la producción de proteína, en donde las cepas CP-328 (14.5023 µg/ml), CP-194 (13.1439 µg/ml), CP-98 (10.0037 µg/ml), CP-267 (9.1500 µg/ml), CP-30 (8.2528 µg/ml) y CP-50 (7.2915 µg/ml) presentaron la mayor producción. Cabe señalar que la cepa comercial CP-50 alcanzó su mayor producción en este periodo de incubación, mientras que la producción de las otras cepas continuó incrementando hasta el final de la cinética. Y por otro lado la mayoría de las cepas pertenecientes a *P. djamor*, presentaron la menor producción de proteína (Cuadro 54).

Cuadro 54. Comparación de medias por el método de Duncan y formación de grupos homogéneos de 13 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* a los 21 días de incubación en fermentación líquida.

Cepas	Especie	Variables			
		Celulasa (UI)		Proteína (µg/ml)	
328	<i>P. pulmonarius</i>	8.1752 ± 0.1671	a	14.5023 ± 0.9087	a
30	<i>P. levis</i>	1.2432 ± 0.0772	b	8.2528 ± 0.2676	cd
50*	<i>P. ostreatus</i>	1.2218 ± 0.6152	b	7.2915 ± 0.1322	de
267	<i>P. ostreatus</i>	0.4128 ± 0.0935	c	9.1500 ± 0.1090	bc
44	<i>P. djamor</i>	0.3564 ± 0.0543	c	6.5112 ± 0.2049	ef
171	<i>P. djamor</i>	0.3477 ± 0.0226	c	5.3710 ± 0.1388	f
98	<i>P. spp</i>	0.3467 ± 0.0109	c	10.0037 ± 1.9825	b
253	<i>P. djamor</i>	0.3458 ± 0.0203	c	6.5158 ± 0.2775	ef
194	<i>P. spp</i>	0.3419 ± 0.0485	c	13.1439 ± 0.0528	a
18	<i>P. cystidiosus</i>	0.3399 ± 0.0068	c	5.8477 ± 0.0859	ef
261	<i>P. djamor</i>	0.3370 ± 0.0088	c	6.2028 ± 0.4560	ef
120	<i>P. djamor</i>	0.3341 ± 0.0068	c	6.1981 ± 0.1983	ef
257	<i>P. djamor</i>	0.3030 ± 0.0183	c	5.5112 ± 0.1520	f

* Cepa comercial

Nota: Letras diferentes indican que las medias son estadísticamente distintas

(Prueba de Duncan, $p \leq 0.05$)

Usando el coeficiente de correlación de Pearson, se obtuvo una correlación altamente significativa ($P \leq 0.01$). En el cuadro 55, se observa un coeficiente de correlación positivo entre la concentración de proteína y la actividad de celulasa en el medio de cultivo Solka Floc de $r^2 = 0.656$, a los 21 días de incubación.

Cuadro 55. Correlación entre la producción de celulasa y proteína de las cepas en estudio a los 21 días de incubación en medio líquido Solka Floc.

		Celulasas	Proteínas
Celulasas	Correlación de Pearson	1	.656(**)
	Sig. (bilateral)		.000
	N	75	26
Proteínas	Correlación de Pearson	.656(**)	1
	Sig. (bilateral)	.000	
	N	26	26

*La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

8.3.4. A los 28 días de incubación

Al aplicar el análisis de varianza para comparar las variables entre las 13 cepas en estudio, se encontró la existencia de diferencias altamente significativas tanto en la producción de celulasa como de proteína ($p \leq 0.01$), con respecto a los 28 días de incubación (Cuadro 56).

Cuadro 56. Análisis de varianza 13 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* a los 28 días de incubación, usando medio líquido Solka Floc.

Fuente	Grados de libertad	Valor de F.	Valor de p
Celulasa	74	677.314	.000
Proteína	25	98.011	.000

Para comparar las medias de las variables entre las cepas en estudio a los 28 días de incubación, se aplicó la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha \leq 0.05$), en donde se obtuvo la formación de seis grupos (a, b, c, d y f) en la producción de celulasa y en la producción de proteína siete (a, b, c, d, e, ef, y f). En el cuadro 57, se observa, una clara diferencia con respecto a la producción de celulasa de las cepas correspondientes a *P. djamor* (CP-44, CP-120,

CP-171, CP-253, CP-257y CP-261), las cuales presentaron en este día de incubación valores muy bajos de concentración de celulasa (de 0.3020 UI a 0.3651 UI) y, cuyos rangos mantuvieron prácticamente durante toda la cinética, al igual que la cepa CP-18 de *P. cystidiosus*. En comparación con las cepas CP-328 (5.4674 UI), CP-30 (2.6806 UI), CP-98 (1.7463 UI), CP-267 (1.0110 UI) y CP-194 (0.6857 UI), que mostraron la mayor producción de celulasa durante este día de incubación. Sin embargo, cabe mencionar, que la producción de las cepas CP-328 y CP-50 decreció en este día, a pesar de que la cepa CP-328 se ubico, como una de las mayormente productoras de celulasa, y contrariamente a esto, las cepas restantes exhibieron su mayor producción en este día de incubación.

En cuanto a la producción de proteína, también se observaron marcadas diferencias entre las cepas correspondientes a *P. djamor* y la cepa CP-18 de *P. cystidiosus*, con el resto de las cepas, en donde las primeras solo aumentaron su producción del día cero al 14 y la mantuvieron hasta el final de la cinética (28 días); no así en el caso de las cepas CP-98 (18.4710 µg/ml), CP-328 (15.9275 µg/ml), CP-194 (15.7327 µg/ml), CP-30 (11.9677 µg/ml) y CP-267 (10.3485 µg/ml) y, las cuales fueron incrementando su producción durante los días considerados en la cinética en estudio y alcanzaron su mayor producción en el día 28 de incubación, a excepción de la cepa CP-50 (6.7869 µg/ml), cuya producción decreció en este día (Cuadro 57).

Cuadro 57. Comparación de medias por el método de Duncan y formación de grupos homogéneos de 13 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* a los 28 días de incubación en fermentación líquida.

Cepas	Especie	Variables			
		Celulasa (UI)		Proteína (µg/ml)	
328	<i>P. pulmonarius</i>	5.4674 ± 0.0896	a	15.9275 ± 0.7765	b
30	<i>P. levis</i>	2.6806 ± 0.2534	b	11.9677 ± 1.4572	c
98	<i>P. spp</i>	1.7463 ± 0.1898	c	18.4710 ± 0.7137	a
267	<i>P. ostreatus</i>	1.0110 ± 0.1662	d	10.3485 ± 0.1190	d
194	<i>P. spp</i>	0.6857 ± 0.1486	e	15.7327 ± 1.4406	b
44	<i>P. djamor</i>	0.3651 ± 0.0130	f	6.6841 ± 0.2379	e
18	<i>P. cystidiosus</i>	0.3448 ± 0.0190	f	6.2308 ± 0.2974	ef
253	<i>P. djamor</i>	0.3379 ± 0.0218	f	4.7775 ± 0.1057	f
50*	<i>P. ostreatus</i>	0.3331 ± 0.0154	f	6.7869 ± 0.3965	e
261	<i>P. djamor</i>	0.3302 ± 0.0086	f	5.2028 ± 0.1520	ef
171	<i>P. djamor</i>	0.3263 ± 0.0096	f	6.7168 ± 0.4031	e
120	<i>P. djamor</i>	0.3205 ± 0.0137	f	5.9084 ± 0.2379	ef
257	<i>P. djamor</i>	0.3020 ± 0.0201	f	5.8570 ± 0.1784	ef

* Cepa comercial

Nota: Letras diferentes indican que las medias son estadísticamente distintas
(Prueba de Duncan, $p \leq 0.05$)

Usando el coeficiente de correlación de Pearson, se obtuvo una correlación altamente significativa ($P \leq 0.01$). En el cuadro 58, se observa un coeficiente de correlación positivo entre la concentración de proteína y la actividad de celulasa en el medio de cultivo Solka Floc de $r^2 = 0.661$, a los 28 días de incubación.

Cuadro 58. Correlación entre la producción de celulasa y proteína de las cepas en estudio a los 28 días de incubación en medio líquido Solka Floc.

		Celulasas	Proteínas
Celulasas	Correlación de Pearson	1	.661(**)
	Sig. (bilateral)		.000
	N	75	26
Proteínas	Correlación de Pearson	.661(**)	1
	Sig. (bilateral)	.000	
	N	26	26

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

En la figura 38, se observan las cepas que presentaron una mayor actividad enzimática (A) durante la cinética en estudio, en donde la cepa comercial CP-50 de (*P. ostreatus*) fue la primera en alcanzar su máxima producción (2.023 UI) en el día 14 de incubación, posteriormente en el día 21 la cepa CP-328 de *P. pulmonarius* (8.1752 UI) y CP-30 de *P. levis* (1.2432 UI), cuya producción de estas cepas decreció al final de la cinética, y por último en el día 28 las cepas CP-98 (1.7463 UI), CP-267(1.0110 UI) y CP-194 (0.6857 UI), alcanzaron su mayor producción.

Por otro lado se observó una marcada diferencia, con respecto a la producción de celulasa de las cepas pertenecientes a *P. djamor* y la cepa CP-18 de *P. cystidiosus* (B), en donde la producción fue muy baja, y cuyos valores fluctuaron entre 0.3021 UI y 0.3730 UI.

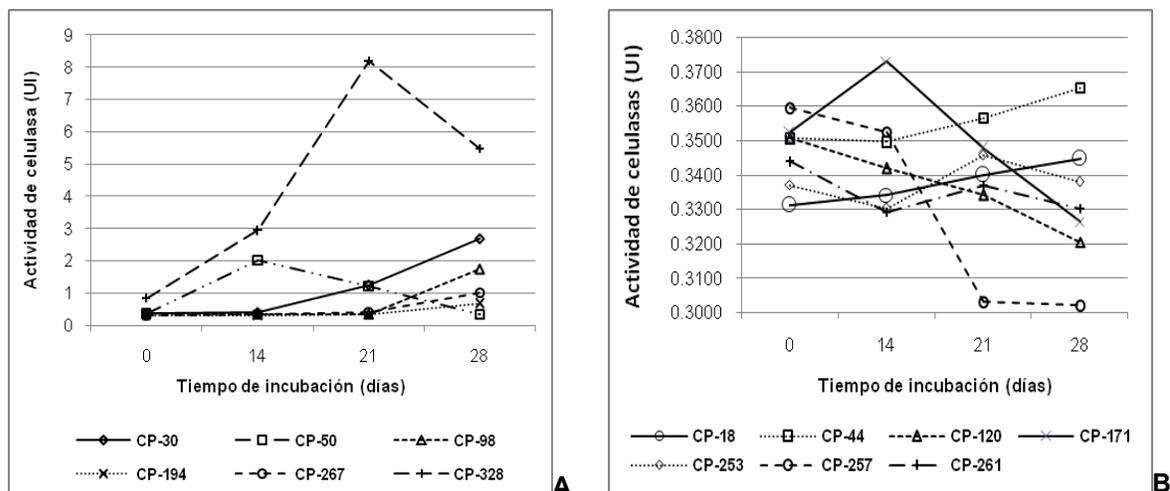


Figura 38. Comparación de la actividad enzimática entre todas las cepas a diferentes días de incubación en el medio de cultivo Solka Floc.

Finalmente, en la figura 39, se observó que la cepa CP-50 fue la primera en alcanzar su máxima producción de proteína a los 21 días de incubación (decreciendo al final de la cinética); en comparación con las cepas CP-98 (18.4710 $\mu\text{g/ml}$), CP-328 (15.9275 $\mu\text{g/ml}$), CP-194 (15.7327 $\mu\text{g/ml}$), CP-30 (11.9677 $\mu\text{g/ml}$) y CP-267 (10.3485 $\mu\text{g/ml}$), que presentaron una mayor concentración al final de la cinética en estudio. Y en contraste con estas cepas, la producción de proteína por las cepas pertenecientes a *P. djamor* fue menor y se mantuvo prácticamente constante durante toda la cinética, al igual que en el caso de la producción de celulasa por las mismas cepas.

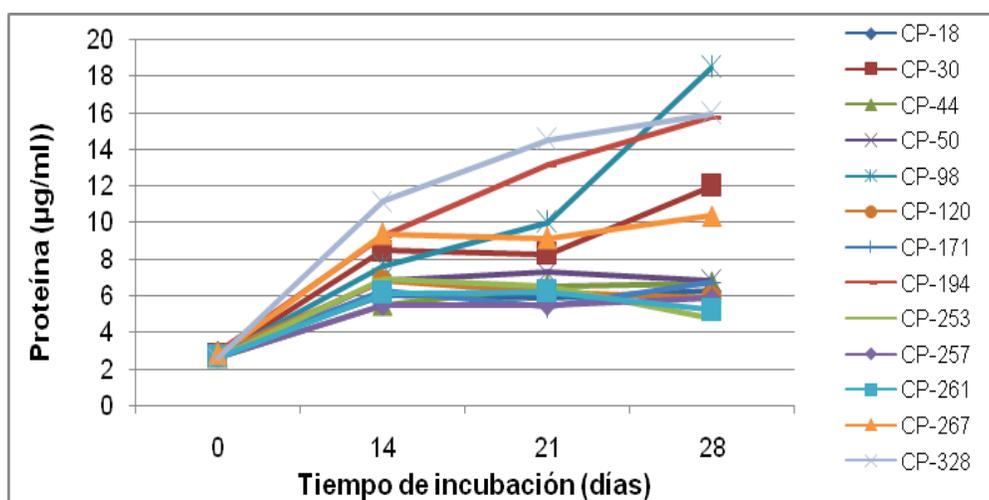


Figura 39. Comparación de la producción de proteína de las cepas en estudio a diferentes días de incubación en el medio de cultivo Solka Floc.

Con base a los resultados obtenidos, se observó claramente la formación de dos grupos: el que incluía a las cepas que mostraron mayor capacidad para la degradación de celulosa y producción de proteína, en donde se ubicaron las cepas: CP-30, CP-50, CP-98, CP-194 y CP-328. Y por otro lado el grupo de las cepas que presentaron menor actividad enzimática y producción de proteína, durante toda la cinética en estudio, el cual lo conformaron las cepas pertenecientes a *P. djamor* (CP-44, CP-120, CP-171, CP-253, CP-257 y CP-261) y la cepa CP-18 de *P. cystidiosus*.

Debido a que la finalidad de este proyecto de investigación es seleccionar las cepas que exhiban la mayor actividad enzimática, se decidió comparar la producción de celulasa y proteína registradas a los 28 días de incubación entre las cepas contenidas en el primer grupo, y de esta manera segregar las cepas, cuya actividad enzimática y producción de proteína sea mayor.

8.4. Estudio comparativo de cepas con mayores capacidades de degradación de sustratos a los 28 días de incubación

Al aplicar el análisis de varianza para comparar las variables entre las cepas que mostraron mayor capacidad para la degradación de celulosa y producción de proteína, se encontraron diferencias altamente significativas tanto en la producción de celulasa como de proteína ($p \leq 0.01$), con respecto a los 28 días de incubación (Cuadro 59).

Cuadro 59. Análisis de varianza 6 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* a los 28 días de incubación, usando medio líquido Solka Floc.

Fuente	Grados de libertad	Valor de F.	Valor de p
Celulasa	32	482.784	.000
Proteína	11	40.455	.000

Para comparar las medias de las variables entre las cepas elegidas a los 28 días de incubación, se aplicó la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha \leq 0.05$), en donde se obtuvo la formación de seis grupos (a, b, c, d y f) en la producción de celulasa y en la producción de proteína cuatro (a, b, c y d). En referencia a la producción de celulasa por las cepas en estudio, a los 28 días de incubación, se observó que la cepa CP-328 presentó la mayor producción de

celulasa con 5.4674 UI, seguida de la cepa CP-30 con 2.6806 UI, enseguida se ubicaron las cepas CP-98 con 1.7463 UI y CP-267 con 1.0110 UI y en contraste las cepas que mostraron la menor producción fueron las cepas CP-194 con 0.6857 UI y CP-50 con 0.3331UI. Cabe mencionar que las cepas CP-50 y CP-328 alcanzaron su máxima producción de celulasas en los días 14 y 21, respectivamente, y decrecieron al final de la cinética (28 días), al contrario del resto de las cepas, que alcanzaron su máxima producción en este día de incubación (Cuadro 60).

Y con respecto a la producción de proteína, la cepa CP-98 exhibió la mayor producción con 18.4710 µg/ml, seguida de las cepas CP-328 y CP-194 con 15.9275 µg/ml y 15.7327 µg/ml respectivamente, y por otro lado la cepa CP-50 mostró la menor producción (6.7869 µg/ml). Cabe mencionar que la mayoría de estas cepas alcanzó su mayor producción de proteína en este día de incubación, a excepción de la cepa CP-50 que lo presentó en el día 21, decreciendo al final de la cinética en estudio (Cuadro 60).

Cuadro 60. Comparación de medias por el método de Duncan y formación de grupos homogéneos de 6 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* a los 28 días de incubación en fermentación líquida.

Cepas	Especie	Variables			
		Celulasa (UI)		Proteína (µg/ml)	
328	<i>P. pulmonarius</i>	5.4674 ± 0.0896	a	15.9275 ± 0.7765	b
30	<i>P. levis</i>	2.6806 ± 0.2534	b	11.9677 ± 1.4572	c
98	<i>P. spp</i>	1.7463 ± 0.1898	c	18.4710 ± 0.7137	a
267	<i>P. ostreatus</i>	1.0110 ± 0.1662	d	10.3485 ± 0.1190	c
194	<i>P. spp</i>	0.6857 ± 0.1486	e	15.7327 ± 1.4406	b
50*	<i>P. ostreatus</i>	0.3331 ± 0.0154	f	6.7869 ± 0.3965	d

* Cepa comercial

Nota: Letras diferentes indican que las medias son estadísticamente distintas (Prueba de Duncan, $p \leq 0.05$)

En la figura 40, se observa que la mayor actividad de celulasa a los 28 días de incubación (A) la presentó la cepa CP-328, seguida de la cepa CP-30 y CP-98. Y en

contraste las que mostraron una menor producción fueron las cepas CP-194 y CP-50; un patrón similar se observó, en el caso de la producción de proteína (B), en donde las cepa CP-98 presentó la máxima producción, seguida de las cepas CP-194 y CP-328 y, al igual que en el caso anterior la menor producción de proteína la obtuvo la cepa CP-50, en este día de incubación, debido a que esta cepa alcanzó su máxima producción en el día 21, al contrario del resto de las cepas, cuya mayor producción de proteína la alcanzaron en el día 28 de incubación.

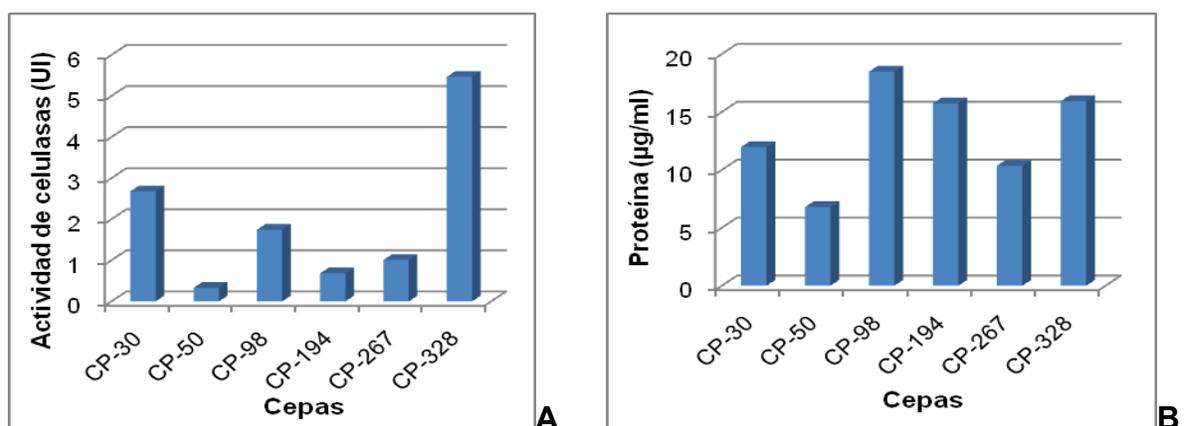


Figura 40. Actividad enzimática (A) y producción de proteína (B) de las cepas elegidas, creciendo en medio de cultivo Solka Floc a 28 días de incubación y una temperatura de 25°C.

Usando el coeficiente de correlación de Pearson, no se obtuvo una correlación significativa ($P \leq 0.05$). En el cuadro 61, se observa un coeficiente de correlación positivo entre la concentración de proteína y la actividad de celulasa en el medio de cultivo Solka Floc de $r^2 = 0.412$, a los 28 días de incubación.

Cuadro 61. Correlación entre la producción de celulasa y proteína de las cepas elegidas a los 28 días de incubación en medio líquido Solka Floc.

		Celulasas	Proteínas
Celulasas	Correlación de Pearson	1	.412
	Sig. (bilateral)		.183
	N	33	12
Proteínas	Correlación de Pearson	.412	1
	Sig. (bilateral)	.183	
	N	12	12

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

8.5. Caracterización de las cepas en estudio, en el medio de cultivo líquido Solka Floc

El pH del medio de cultivo líquido con Solka Floc previo a la esterilización fue de 6.09 y después de la esterilización de 6.05. A pesar de que las cepas en estudio fueron mantenidas bajo las mismas condiciones y el pH que presentó el medio de cultivo se ha reportado como óptimo (de 6 a 6.5), según lo citado por Elisashvili (2008), Buswell (1996) y Garzillo (1994), para el desarrollo de cepas de hongos comestibles, entre las que se encuentran algunas especies del género *Pleurotus*. Las colonias desarrolladas mostraron características macroscópicas diferentes.

Con la mayoría de las cepas el medio de cultivo presentó características similares tales como: consistencia líquida y color amarillo claro, a excepción de las cepas CP-194 y CP-98, que tornaron el color del medio de cultivo a un amarillo ligeramente más oscuro y, en la segunda de estas tanto la colonia, como el medio de cultivo presentaron una consistencia viscosa, en los primeros días de incubación.

Otra observación interesante con respecto al medio de cultivo (Figura 41), fue que en las cepas que mostraron menor actividad enzimática (principalmente las cepas de *P. djamor*), el reactivo Solka Floc presente en el medio, no mostró alteración (A), no así, en el medio de cultivo inoculado con las cepas que presentaron la mayor actividad enzimática, en donde este reactivo estaba desintegrado completamente (B).

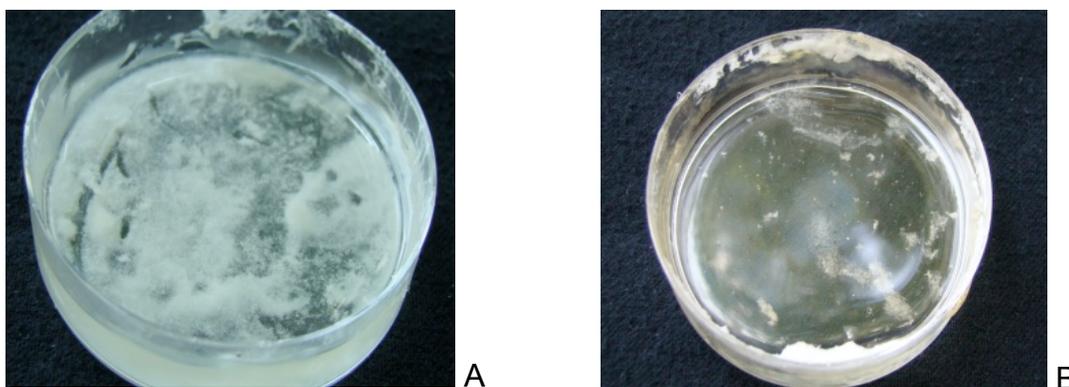


Figura 41. Comparación de la apariencia del medio de cultivo líquido Solka Floc inoculado con la cepa CP-253 de *P. djamor* (A) y CP-328 de *P. pulmonarius* (B), al término de la cinética en estudio (28 días).

9. DISCUSIÓN

A pesar de los estudios que se han realizado en nuestro país sobre el cultivo de *Pleurotus* utilizando diversos substratos (Mora y Martínez-Carrera *et al.*, 2006) muy poco se conoce sobre la producción de enzimas de estos hongos. Por otro lado, a nivel mundial se han identificado 15 grupos interestériles (GI) dentro del género *Pleurotus* (Vilgalys *et al.*, 1996), de los cuales en nuestro país se tienen identificados 5 de esos GI (Sobal *et al.*, 2007). En el presente trabajo se investigo la producción extracelular de celulasas en medio líquido con 12 cepas nativas mexicanas y una comercial de *Pleurotus*, pertenecientes a los cinco GI. También se determino el contenido de proteína en los extractos y el peso seco de las colonias. A los diferentes días considerados en la cinética en estudio, se aplico el coeficiente de correlación de Pearson, para determinar la existencia de correlación significativa entre las variables.

Se ha demostrado que las especies del género *Pleurotus* tienen la capacidad de producir enzimas celulolíticas tanto en fermentación líquida (Elisashvili *et al.*, 2008a; Mikiashvili *et al.*, 2006; Inglis *et al.*, 2000; Lynd *et al.*, 2002; Maziero *et al.*, 1999; Buswell *et al.*, 1996; Garzillo *et al.*, 1994) como en fermentación en estado sólido (Elisashvili *et al.*, 2008b; Márquez-Araque *et al.*, 2007; Membrillo *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2003; Ghosh *et al.*, 1998; Tan y Wahab, 1997).

Se encontró que el mejor medio de cultivo líquido para la producción de celulasas fue el propuesto por Elisashvili *et al.* (2008a,b), con las siguientes modificaciones: se sustituyeron los reactivos glucosa y NH_4NO_3 por Solka Floc y peptona, respectivamente. Se eligió usar el substrato Solka Floc, como fuente de carbono, debido a que la producción de celulasas en hongos es inducida por la presencia de compuestos fácilmente difusibles, presentes en el medio de cultivo, tales como: la celobiosa, celodextrina, sophorosa, etc., o algunos productos que contengan celulosa (Ghosh *et al.*, 1998; Uzcategui *et al.*, 1991). También se ha reportado que la adición de peptona al medio de cultivo (como fuente de nitrógeno) incrementa la actividad de enzimas celulolíticas (Elisashvili *et al.*, 2008b).

En el presente trabajo se comparo por primera vez la producción de celulasas, proteína y biomasa de cepas mexicanas de diversas especies provenientes de 10 estados de la república. Todas las cepas de *Pleurotus* crecieron sobre el medio de cultivo líquido con Solka Floc, debido a que pudo producir enzimas celulolíticas para degradar el substrato. Los resultados muestran que la actividad enzimática se incremento hasta el término de la cinética en estudio (28 días) en la mayoría de las cepas, a excepción de las cepas CP-50 y CP-328, donde el máximo se alcanzo a los 14 y 21 días, respectivamente (Figura 42). La cepa CP-328 de *P. pulmonarius* fue la que produjo la mayor cantidad de celulasa (8.17 UI), seguida por las cepas CP-30 (2.6806 UI) y CP-50 (2.023 UI). Es importante resaltar este dato ya que la cepa CP-328 es nativa del estado de Durango y produjo cuatro veces más celulasas que la cepa comercial (CP-50).

En el caso de las cepas CP-50 y CP-328, la producción de celulasa decreció considerablemente al término de la cinética en estudio, en la primera después de los 14 días y en la segunda después de los 21 días. Esto podría deberse a la inhibición de la producción de enzimas causada por el agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo o al envejecimiento del mismo, tal como lo menciona Tan y Wahab (1997) (Figura 42).

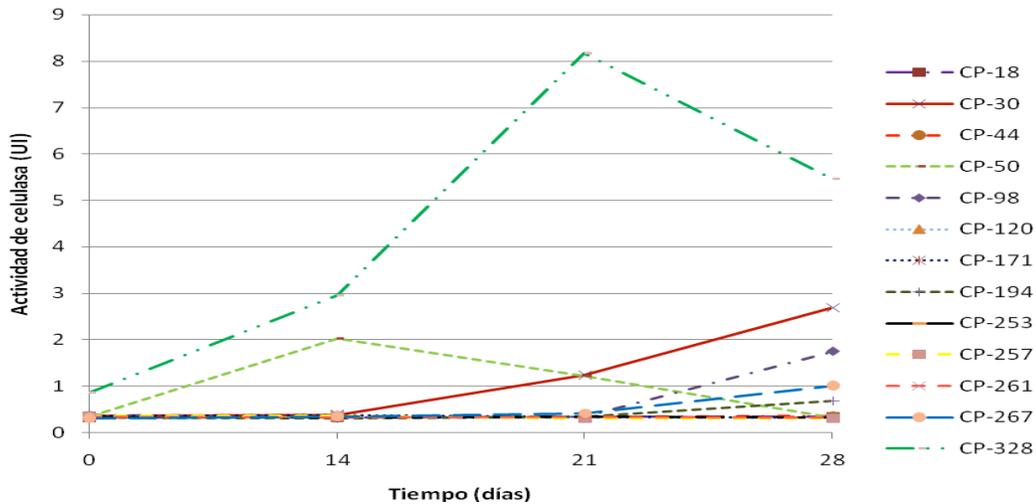


Fig. 42. Cinética de la producción de la celulasa de las 13 cepas de *Pleurotus* cultivadas en medio líquido con Solka Floc como fuente de carbono. Los números de las cepas corresponden a los del cuadro 4.

Los días en donde las cepas en estudio alcanzaron la máxima actividad enzimática (14-28 días), son mayores a los mencionados por Elisashvili *et al* (2008a,b) quien reporta de 7-10 días y Buswell *et al* (1996) que cita 6 días; para cepas de *Pleurotus*, en fermentación sumergida y bajo condiciones de crecimiento micelial en agitación; lo cual contrasta con las condiciones estáticas mantenidas en este trabajo de investigación.

Con respecto a la producción de celulasa, los valores obtenidos en este trabajo son inferiores, comparados con los obtenidos por Elisashvili *et al* (2008a), quienes obtuvieron una producción de celulasa de 2435 U matraz⁻¹ en *P. dryinus* y 1800 U matraz⁻¹ en *P. ostreatus*, usando hojas de árbol en ambos casos, mientras que Buswell *et al* (1996), obtuvo de 170-250 U/ml.

diferentes condiciones en los medios de cultivo para su óptimo crecimiento. Estos resultados coinciden con lo citado por Elisashvili *et al* (2008b); Membrillo *et al* (2008); Márquez-Araque *et al* (2007) y Tan y Wahab (1997); quienes mencionan que la producción de celulasas, lacasas, xilanasas y manganeso peroxidasa está influenciada por la especie del hongo, la composición del medio (ó sustrato) y las condiciones de cultivo.

Por ejemplo, en cultivos de *Panus tigrinus* no se detectó actividad de xilanasas y lacasas bajo condiciones de cultivo en agitación; pero sí en condiciones estáticas (Nazareth y Sampsy, 2003). Otro ejemplo, pero en fermentación sólida es el citado por Tan y Wahab (1997), quien menciona que la producción de celulasas por *P. sajor-caju* sobre residuos de algodón fue mucho más alta que la obtenida en aserrín.

En relación a la producción de biomasa, podría considerarse que las condiciones de cultivo a las se sometieron las cepas en estudio fueron adecuadas para la producción de biomasa, cuya mayor producción fue alcanzada por la mayoría de las cepas en estudio entre los 14-21 días de incubación, a excepción de la CP-171 que lo consiguió a los 28 días, estos datos coinciden con los mencionados por Maziero *et al* (1999), quien señala que las cepas de *Pleurotus* presentaron una mayor producción de biomasa después de los 7 días de incubación, bajo condiciones de agitación. Este mismo autor reporta rangos de producción de biomasa por las mismas cepas de 0.00450-0.01039 mg/ml a los 14 días de incubación; estos datos son inferiores, en comparación con los obtenidos en este trabajo de investigación para cepas de *Pleurotus*, cuyos rangos de producción oscilaron entre 2.5556-9.8639 mg/ml.

Otra observación importante mencionada por Maziero *et al* (1999), es que bajo las mismas condiciones de cultivo, las distintas especies de hongos mostraron diferencias en cuanto a la forma y consistencia de los pellet, así como también en la consistencia y color del medio de cultivo, dichas observaciones concuerdan con las registradas en las cepas CP-98 y CP-194 de *Pleurotus* spp., las cuales tornaron el color del medio a un amarillo ligeramente más oscuro, de consistencia líquida y viscosa, respectivamente.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran por primera vez la producción de celulasas de cepas pertenecientes a diferentes grupos interestériles provenientes de diversas regiones de nuestro país. Una siguiente fase en el estudio de esta enzima sería investigar su comportamiento en el sustrato sólido de cultivo, así como incorporar más cepas de otras regiones del país. Asimismo, se requiere estudiar otras variables tales como usar otras fuentes de carbono, nitrógeno, pH, y condiciones de cultivo, así como estudiar otras enzimas tales como lacasas, manganeso peroxidasas, entre otras. Ya que como se observó con las cepas de *P. djamor*, en donde se obtuvo una muy baja producción tanto de enzimas como de proteína, lo cual puede deberse a que se necesita proporcionarle a esas cepas otras condiciones de cultivo.

10. CONCLUSIONES

El mejor medio de cultivo líquido para la producción de celulasas en las cepas de *Pleurotus* fue el de Elisashvili *et al* (2008a) modificado.

La cepa CP-328 de *Pleurotus pulmonarius* fue la que obtuvo la mayor cantidad de enzimas y proteína con 1752 U y 14.5023 µg/ml, respectivamente a los 21 días de incubación.

La mayor correlación entre la producción de enzima y la producción de proteína se obtuvo a los días 28 de incubación ($r^2 = 0.661$).

La actividad enzimática se incremento hasta el término de la cinética en estudio (28 días) en la mayoría de las cepas, a excepción de las cepas CP-50 y CP-328, donde el máximo se alcanzo a los 14 y 21 días, respectivamente.

En cuanto a la producción de proteína, la cepa CP-98 exhibió la mayor producción con 18.4710 $\mu\text{g/ml}$, seguida de las cepas CP-328, CP-194 y CP-30 con 15.9275 $\mu\text{g/ml}$, 15.7327 $\mu\text{g/ml}$ y 11.9677 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. La mayoría de estas cepas alcanzó su mayor producción de proteína en el día 28 de incubación, a excepción de la cepa CP-50 (7.2915 $\mu\text{g/ml}$) que lo presentó en el día 21.

En cuanto a la producción de biomasa, la cepa CP-171 exhibió la mayor producción con 9.8639 mg/ml , seguida de la cepa CP-267 con 9.5778 mg/ml y CP-98 con 8.6347 mg/ml , a los 28, 14 y 21 días de incubación respectivamente. Y por otro lado las cepas CP-120 y CP-194 mostraron la menor producción de biomasa durante todos los días considerados en la cinética en estudio.

Las colonias desarrolladas mostraron características macroscópicas diferentes. En general todas las colonias presentaron color blanco, pero con diferencias en cuanto a crecimiento micelial, textura, densidad y tipo de micelio aéreo.

11. DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA DE SELECCIÓN DE CEPAS

Es indudable que la biotecnología de producción de hongos comestibles ofrece notables ventajas sociales, económicas y ecológicas, siempre y cuando se lleve a cabo de una forma correcta y con las cepas adecuadas, para alcanzar mayores beneficios; por tal motivo los métodos de selección de cepas son de suma importancia. Por lo que en la presente estrategia se plantean los siguientes objetivos:

Objetivo general

Seleccionar cepas de hongos comestibles (*Pleurotus*) para la producción rural, con base en su actividad enzimática en medio de cultivo líquido.

Objetivos particulares

- Diversificar las opciones de los productores en cuanto a las cepas que manejan, aumentando el número de las cepas nativas, que exhiban altos rendimientos y cuyo período de producción sea corto.
- Programar una evaluación periódica de las cepas propuestas que permita la optimización del proceso, lo cual se traducirá en ingresos estables y mayores para los productores.
- Mantener la estabilidad de la producción y de mercado durante todo el año.

Actores de la estrategia

Para la operación de la estrategia se propone la vinculación de tres elementos fundamentales; cada uno con tareas específicas interrelacionadas y complementarias:

- 1) Los productores y sus familias a quienes es dirigida la estrategia.
- 2) Los equipos humanos técnicos y científicos; en este caso, el Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla, así como otras instituciones de investigación científica sobre la biotecnología de hongos comestibles son de gran importancia, ya que es evidente que las actividades productivas asociadas con los hongos comestibles en México requieran de la vinculación estratégica con instituciones públicas para llegar a ser sostenibles desde el punto de vista social, económico y ecológico.
- 3) Representantes y miembros de instituciones de apoyo a la producción y el desarrollo agrícola y rural. Este sector está representado principalmente por el Gobierno, que a través de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Fundaciones PRODUCE y otros organismos, otorguen capacitación técnica, así como apoyos financieros y administrativos a los productores de hongos comestibles.

La acción coordinada de éstos es lo que da fuerza a la operación de la estrategia, teniendo como resultado logros económico-sociales.

Plan de acción de la estrategia

- 1) Identificar el sector social (productores rurales), y analizar el lugar donde se desea poner en práctica.
- 2) Con los productores se pretende llevar a cabo cursos y talleres, con la finalidad de dar a conocer la importancia que tienen las enzimas en la degradación del sustrato y su implicación en los procesos de invasión micelial del mismo, en el periodo de tiempo de la obtención de la cosecha y en los rendimientos obtenidos por las cepas en estudio. Así mismo se sugerirá el uso de cepas nativas con altas potencialidades, como es el caso de la cepa CP-328 y CP-30 de *Pleurotus* que presentaron la mayor producción de enzimas celulolíticas y proteína extracelular en el medio de cultivo estudiado, en comparación la cepa comercial CP-50.
- 3) Los investigadores del Colegio de Postgraduados, *Campus*-Puebla, serán los encargados de impartir los cursos o talleres de capacitación a los productores. Por lo tanto la vinculación de este sector con los productores, se llevará a cabo a través del Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla; que cuenta con un programa de mantenimiento, conservación y caracterización del germoplasma nativo procedente de diversas regiones del país (Martínez-Carrera *et al.*, 2007). De esta forma cuando los productores acudan al CREGENHC, para comprar semilla, se les podrán sugerir algunas de las cepas nativas que se eligieron en este trabajo de investigación (CP-328 y CP-30) por exhibir alta producción de enzimas celulolíticas, y cuyos beneficios serán reflejados en un menor período de invasión de sustrato y obtención de la cosecha, y mayores rendimientos, lo cual repercutirá en la economía del productor.
- 4) Por otro lado las instituciones del sector, mencionadas anteriormente, también tendrán un papel fundamental en este proceso, ya que son quienes brindan el apoyo financiero para que las organizaciones de productores reciban los cursos y talleres necesarios, para llevar a cabo la biotecnología de producción de hongos comestibles.

Estrategia

Con base a los resultados obtenidos, la estrategia de selección que se plantea consiste en realizar en la fase de laboratorio estudios detallados sobre la morfología de las cepas, producción de biomasa bajo distintas condiciones (en agitación y estática), y examinar diferentes factores que estimulen la producción de enzimas celulolíticas por las cepas en estudio en fermentación líquida, tales como: composición del medio de cultivo, sustrato para la determinación enzimática, periodos de incubación, etc. Y por otro lado en la fase de campo se propone cultivar las cepas en estudio en paja de trigo y en diferentes fórmulas de sustrato, para caracterizar morfológicamente los cuerpos fructíferos y determinar su EB y actividad enzimática en dichos sustratos; con la finalidad de correlacionar la actividad enzimática durante la fermentación líquida y sólida, y paralelamente también analizar la correlación entre la actividad enzimática en fermentación sólida y la EB obtenida por las cepas en estudio. Por lo tanto si la correlación entre las variables en estudio resultara positiva, se podrían recomendar las cepas que exhiban una mayor producción enzimática desde la fase de laboratorio.

Con base a lo mencionado anteriormente, es importante mencionar que las cepas CP-30, CP-50, CP-253, CP-267 se han cultivado en diferentes sustratos, en los trabajos de investigación de Sihuanca (2009) y Ramírez (2006). El primero de los autores, encontró EB altas por las cepas CP-30 y CP-98, en las fórmulas 22 y 20, respectivamente, no así en las cepas correspondientes CP-253 y CP-267 (Cuadro 62); estos resultados concuerdan con la producción de celulasas por las mismas cepas estudiadas en el presente trabajo de investigación. Ya que las cepas donde se obtuvo una mayor producción de enzimas celulolíticas fue en las cepas CP-328, seguida de las cepas CP-30 y CP-50. Y en contraste donde se encontraron bajos niveles de celulasa fue en las cepas pertenecientes a *P. djamor*.

Cuadro 62. Comparación de la EB mostrada por cepas de *Pleurotus* en diversas fórmulas.

Cepa	Especie	Eficiencia biológica				
		Fórmula C17	Fórmula C18	Fórmula C19	Fórmula C20	Fórmula C22
CP-30	<i>P. levis</i>	81.21±9.28 bc	83.38±5.93 c	72.48±14.72 c	101.51±25.02 ab	104.95±11.90 a
CP-98	<i>Pleurotus spp</i>	NP	NP	46.72±18.57 b	63.31±10.1 a	39.50±9.39 b

CP-253	<i>P. djamor</i>	47.932±5.40 a	51.503±6.30 a	NP	50.685±2.00 a	46.598±4.88 a
CP-267	<i>P. ostreatus</i>	52±7.31 a	49.01±3.60 a	27.6±10.4 c	32.38±3.72 b	57.30±9.01 a

Fuente: Sihuana, 2009.

Por otro lado el segundo autor, encontró una mayor EB por la cepas CP-50 y CP-253 en paja de trigo (Cuadro 63).

Cuadro 63. Comparación de la EB mostrada por cepas de *Pleurotus* en diversas fórmulas.

Cepa	Especie	Eficiencia biológica	
		Aserrín	Paja de trigo
CP-253	<i>P. djamor</i>	14.1 ± 2.36*	120.1 ± 7.41
CP-50	<i>P. ostreatus</i>	94.8 ± 3.80*	135.9 ± 5.3

*pH 11, del sustrato

Fuente: Ramírez, 2006.

Lo cual sugiere que podría existir una relación positiva entre las variables en estudio, y por lo tanto, esta estrategia de selección sería de suma importancia para obtener altas EB, en cortos periodos de tiempos; y como resultado de este proceso, se obtendría un incremento en el ingreso económico de los productores rurales.

12. LITERATURA CITADA

- Ahamed, A. y P. Vermette. 2009. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. *Bioresource Technology* 100: 5979-5987.
- Abdullah, N. y S. Zafar. 1999. Lignocellulose biodegradation by white rot basidiomycetes: overview. *The International Journal of Mushroom Sciences* 2: 59-78.
- Aguilar, A., 1993. Análisis económico de una planta rural de producción de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*). Estudio de caso: Cuetzalán, Pue. México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados Montecillo, Estado de México.
- Alexopoulos, C. 1996. *Introductory Mycology*. 4a. Edición. Editorial John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Ávila, H. 2005. Enzimas fibrolíticas de *Pleurotus ostreatus* y su actividad en rastrojo de maíz. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.

- Baltazar, F. 2002. Papel de las organizaciones tradicionales para el desarrollo de comunidades marginadas en la Sierra Norte de Puebla. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Bhat, M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18: 355-383.
- Blanchette, R.A. 1995. Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Canadian Journal of Botany* 73: 999-1010.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Buswell, J.A., Y.J. Cai, S.T. Chang, J.F. Peberdy, S.Y. Fu, y H.S. Yu. 1996. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12: 537-542.
- Casas, R. 1994. Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional en proyectos con enfoque de sistemas: caso del proyecto prototipo agropecuario del Plan Puebla. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Castillo Tovar, J. 1987. *Micología General*. Ed. Limusa. México. 122 pp.
- Chang, S. T. y W. A. Hayes. 1978. *The biology and cultivation of edible Mushrooms*. Academic Press. New York.
- Chang, S. T. y T. H. Quimio (Eds.). 1982. *Tropical Mushrooms: biological nature and cultivation methods*. The Chinese University Press, Hong, Kong. pp. 363-377.
- Chang, S. T. y P. G. Miles. 1989. *Edible Mushrooms and their cultivation*. Boca Raton, Florida.
- Crisan E.V. y Sand A. 1978. Nutritional value. *In*: Chang ST, Hayes WA, editors. *The biology and cultivation of edible fungi*. New York: Academic Press. P.p. 137-68.
- Cullen, D. 2002. Molecular genetics of lignin-degrading fungi and their applications in organopollutant degradation. *The Mycota XI*.
- Elisashvili, V., M. Penninckx, E. Kachlishvili, N. Tsiklauri, E. Metreveli, T. Kharziani y G. Kvesitadze. 2008a. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technology* 99: 457-462.
- Elisashvili, V., E. Kachlishvili, y M. Penninckx. 2008b. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35:1531-1538.
- Esteva, G. 2001. Desarrollo. *En*: *Diccionario del desarrollo*. 1a. ed. Ed. Galileo. Pp. 65-92
- Gaitán-Hernández, R. 1999. Cultivo, selección y mejoramiento de *Neolentinus suffrutences* (= *Lentinus Lepideus*) y factibilidad de la reutilización de la madera por este hongo para el cultivo de otras especies comestibles. Tesis doctoral. Facultad de ciencias. División de Estudios de Postgrado. UNAM, México
- Gaitán-Hernández, R., D. Salmenes, R. Pérez y G. Mata. 2002. *Manual Práctico del cultivo de setas (Aislamiento, Siembra y Producción)*, 1ª ed. Instituto de Ecología, Xalapa.

- García-Herrera, E. 2004. Componentes de una estrategia para el Desarrollo Agrícola Regional en pinos, Zacatecas: el nopal tunero como su elemento central. *Comunicaciones en Socio economía, Estadística e Informática* 8: 83-102.
- Garzillo, A., S. Di Paolo, M. Ruzzi y V. Bunocore. 1994. Hydrolytic properties of extracellular cellulases from *Pleurotus ostreatus*. *Microbiology Biotechnology* 42: 476-481.
- Ghosh, M., R. Mukherjee y B. Nandi. 1998. Production of extracellular enzymes by two *Pleurotus* species. *Acta Biotechnologica* 18: 242-254.
- González, Y., O. González y J. Nungaray. 2005. Potencial del bagazo de agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. *Revista digital científica y tecnológica e- Gnosis. Universidad de Guadalajara* 3: 1-18.
- Guzmán, G. 1980. *Identificación de los Hongos*. Ed. Limusa. Méx.
- Guzmán, G., G. Mata, D. Salmones, C. Soto Velazco, y L. Guzmán Dávalos. 1993a. El cultivo de los hongos comestibles con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Guzmán, G., L. Montoya, D. Salmones y V. Bandala, 1993b. Studies of the Genus *Pleurotus* (Basidiomycotina), II. *P. djamour* in Mexico and in other Latin American Countries, Taxonomic Confusions, Distribution and semi-Industrial Culture. *Cryptogamic Botany* 3: 213-220.
- Guzmán, G., 2000. Genus *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae): Diversity, Taxonomic problems, and cultural and traditional medicinal uses. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 2: 95-123.
- Han, M., H. Choi y H. Song. 2005. Purification and characterization of laccases from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *The Journal of Microbiology* 43: 555-560.
- Herrera, T. y Ulloa. 1990. *El Reino de los Hongos*. Ed. Fondo de Cultura Económica. México.
- Inglis, G., A.P. Popp, L.B. Selinger, L.M. Kawchuck, D.A Gaudet y T.A McAllister. 2000. Production of cellulases and xylanases by low-temperature basidiomycetes. *Canadian Journal of Microbiology* 46: 860-865.
- Kirk, TK. y RL. Farrel. 1987. Enzymatic combustion". The microbial degradation of lignina. *Annu Rev Microbiol* 41: 465-505.
- Lechner, B., y V. Papinutti. 2006. Production of Lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of edible fungus. *Lentinus tigrinus* on wheat straw. *Process Biochemistry* 41: 594-598.
- Li, X., J. Pei, G. Wu y W. Shao. 2005. Expression, purification and characterization of a recombinant β -glucosidase from *Volvariella volvacea*. *Biotechnology Letters* 27: 1369–1373
- Kuforiji, O. y Fasidi, O. 2008. Enzyme activities of *Pleurotus tuber-regium* (Fries) Singer, cultivated on selected agricultural wastes. *Bioresource Technology* 99: 4275-4278
- Kurtzman, R. H. 1974. The metabolism of fatty substances by the oyster mushroom. *Mushroom Science* 9: 557- 565.
- Kurtzman, R. H. 1976. Nutrition of *Pleurotus sapidus*, effects of lipids. *Mycologia* 68: 268-295.

- Lynd, L.R., P.J. Weimer y W.H. van Zyl. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 506-577.
- López, L., V. Mora, D. Portugal y N. Bautista. 2007. El cultivo del hongo comestible oreja de cahuate (*Pleurotus* spp.), como una alternativa alimentaria en Morelos, México. VI Congreso Internacional y XII Nacional de Ciencias Ambientales. Ciudad de Chihuahua, Chih., México. Pp. 96-99.
- Márquez-Araque, A., G. Mendoza, S. González, S. Buntinx y O. Loera. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. *Interciencia* 32:780-785.
- Martínez-Carrera, D., 1984. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre desechos agrícolas, I. Obtención y caracterización de cepas nativas en diferentes medios de cultivo sólido en el laboratorio. *Biótica* 9(3): 243-248.
- Martínez-Carrera, D., R. Leben, P. Morales, M. Sobal y A. Larque-Saavedra. 1991. Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México. *Ciencia y Desarrollo* 96: 33-43.
- Martínez-Carrera, D., A. Larque-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., A. Larque-Saavedra, M. Aliphath, A. Aguilar, M. Bonilla y W. Martínez. 2000. La biotecnología de hongos comestibles en la Seguridad y Soberanía alimentaria de México. II Foro Nacional sobre la Seguridad y Soberanía alimentaria. Academia Mexicana de Ciencias-CONACYT, México, D.F. Pp. 193-207. ISBN 968-7428-11-2.
- Martínez-Carrera D., M. Sobal, P. Morales y M. Bonilla. 2007. Importancia estratégica del Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados para el desarrollo del sistema producción-consumo en México. Capítulo, 16 pp. *In: Estudios y propuestas para el Medio Rural*. R. Martínez, B. Ramírez & G.E. Rojo (Eds.). UAIM-COLPOS-UACH-CIAD-CONACYT, México, D.F. ISBN 968-839-478-5.
- Matus, C., 1972. Estrategia y Plan. 11ª Edición. Siglo XXI. Editores. México.
- Matus, C. 1980. Planificación de situaciones. 1ª Edición. Fondo de Cultura Económica. México.
- Maziero, R., V. Cavazzoni y V. Ramos. 1999. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. *Revista de Microbiología* 30:77-84.
- Melo, V., V. Melo-Ruiz y O. Cuamatzi, 2007. Bioquímica de los procesos metabólicos. Reverte, 2ª edición, Pp. 406.
- Membrillo, I., C. Sánchez, M. Meneses, E. Favela, O. Loera. 2008. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology* 99: 7842-7847.
- Mikiashvil, N., S. Wasser, E. Nevo, V. Elisashvili. 2006. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22:999-1002.
- Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-448.
- Mintzberg, H., 1991. Elaboración artesanal de la estrategia. Ediciones Díaz Santos. Madrid.

- Mirzaakhmedov, Sh., F. Ziyavitdinov, Z. Akhmedova, A. Saliev, D. Ruzmetova, K. Ashurov, D. Fessas y S. Lametti. 2007. Isolation, purification, and enzymatic activity of cellulase components of the fungus *Aspergillus terreus*. *Chemistry of Natural Compounds* 43: 594-597.
- Mora, V. y Martínez-Carrera, D. 2006. Investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas *Pleurotus* spp. en México. *In: El cultivo de Pleurotus en México*. ECOSUR-IE-UNAM-COLPOS, México, D.F.
- Morales, P., M. Sobal, M. Bonilla, W. Martínez y D. Martínez-Carrera. 2007. Vinculación y Desarrollo: el Colegio de Postgraduados con el sistema de producción-consumo de los hongos comestibles en México. 10 Pp. *In: Estudios y Propuestas para el Medio Rural*. G. Rojo & B. Ramírez (Eds.). COLPOS-UACH-CIAD-UAIM, México, D.F. ISBN 968-839-478-5.
- Nazareth, S.W. y J.D. Sampy. 2003. Production and characterisation of lignocellulases of *Panus tigrinus* and their application. *International Biodeterioration and Biodegradation* 52: 207-214.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153: 375-380.
- Pérez, R. 2002. Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex. Fr.) Kumm. y *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. Y la factibilidad de reutilizar la madera de *Pinus spp.* para su cultivo. *Foresta Veracruzana*, 4: 31-34.
- Ponce, T. y O. Pérez. 2002. Celulasas y xilanasas en la industria. *Avance y perspectiva* 21: 273-277.
- Quirarte R. R. 1985. Perspectivas de la biotecnología en México. Fundación Javier Barrios Sierra A. C. CONACYT, México.
- Raypeck, V. 1977. Chemical composition of hemicellulose as a factor participating in the substrate specificity of wood destroying fungi. *Wood Science and Technology* 11: 59-65.
- Reddy, G., P. Babu, P. Komaraiah, K. Roy y I. Kothari. 2003. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* y *P. sacor-caju*). *Animal Feed Science and Technology* 71: 357-362.
- Rodríguez, A., 1995. La estrategia productiva de los arroceros en el Distrito de Desarrollo Rural 067 de Ameca, Jal., México ante la modernización del campo. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Rodríguez, A. E. 2003. Curso tecnologías aplicadas: Hongos medicinales. Instituto de Ecología, Departamento de hongos, Xalapa.
- Sánchez, C. 2009. Lignocellulosic residues : Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27:185-194.
- Sánchez, J.E., y D., Royse. 2001. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. 1ª. ed. ECOSUR. San Cristóbal de las Casas, Chiapas.
- Salmones, D. y G. Mata. 2002. Detection of extracellular enzymes produced by *Pleurotus* spp. grown on coffee pulp. *Mushroom Biology and Mushroom Products*. UAEM. ISBN 968-878-105-3. Pp. 213-219.

- Savory, J.G. 1954. Breakdown of timber by ascomycetes and fungi imperfecti. *Annals of Applied Biology* 41: 336-347.
- Sobal, M. y D. Martínez-Carrera, 1988. Potencial de entrecruzamiento de diferentes cepas Mexicanas de *Pleurotus ostreatus*, aisladas a partir de diversos sustratos. *Micología Neotropical Aplicada* 1: 21 – 27.
- Sobal, M., P. Morales, M. Bonilla, G. Huerta y D. Martínez-Carrera. 2007. El Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados. Capítulo 2.1. Pp. 27-40. *In: El Cultivo de Setas Pleurotus spp. en México*. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata & H. Leal (Eds.). ECOSUR, México, D.F.
- Soler-Rivas, C., Joliet, S., Arpin, N., Olivier, J.M. y Wichers, H.J. (1999). Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiological Reviews* 23: 591–614.
- Tan, Y. y M. Wahab. 1997. Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13: 613-617.
- Tlecuítl-Beristain, S., C. Sánchez, O. Loera, G. Robson y G. Díaz-Godínez. 2008. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. *Mycological Research* 112:1080-1084.
- Tschierpe, H. I. y K. Hartman. 1977. A comparison of different growing methods. *Mushrooms Journal* 60: 404-416.
- Tse Tung, M., 1936. Problemas estratégicos de la guerra revolucionaria en China. La Rosa Blindada, Buenos Aires, Argentina.
- Uzcategui, E., G. Johansson y G. Pettersson. 1991. The 1,4-β-D-Glucan glucanohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. Reassessment of their significance in cellulose degradation mechanisms. *Journal of Biotechnology* 21: 143-160.
- Vargas, O. y Blandón, L. 1996. Modelación del desarrollo sostenible en sistemas agrícola-forestales del corregimiento de Aquitania (Antioquia). *Crónica Forestal y del Medio Ambiente* 11: 1-7.
- Velázquez-Cedeño, M., G. Mata y J.M. Savoie. 2002. Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 201-207.
- Vilgalys, R., J.-M. Moncalvo, S.-R. Liou y M. Volovsek. 1996. Recent advances in molecular systematics of the genus *Pleurotus*. Pp. 91-101. *In: Mushroom Biology and Mushroom Products*. Ed. D. J. Royse. Pennsylvania State University, University Park.
- Wu, J., P. Cheung, K. Wong y N. Huang. 2003. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (F.r.) Singer-Part 1: physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency. *Food Chemistry* 81:389-393.
- Zadrazil, F. 1974. The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cornucopia*, or *Pleurotus eryngii*. *Mushroom Science* 9: 621-652.

13. Anexos

Anexo I. Determinación de la actividad enzimática de la cepa CP-50 en medios de cultivo líquidos, considerando diferentes variables.

Variables	Medios de cultivo líquidos																				
	Malta			PDB			CYM			E.P.T.			E.P.T. + P			S.F.					
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V		
Tiempo de incubación (días)	2,4, 6, 8	2,4, 6, 8	2,4, 6, 8	2,4, 6, 8	2,4, 6, 8	2,4, 6, 8	2,4	2,4	8,10	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	8,10	8,10	
Dilución	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	0	0	1:9	0	1:4	1:1	0	1:9	0	1:4	0	0	0	
Tiempo de incubación del sustrato (Min)	60 min	40 min	20 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	60 min	40 min	20 min
Producción de biomasa	+			+			+			+			+								

- PDB= Caldo Papa Dextrosa, CYM= Medio Completo para Levaduras, E.P.T.= Extracto de paja de trigo, E.P.T. + P= Extracto de paja de trigo con peptona, S.F.= Solka Floc.
- Números I, II, III, IV, V: indican el número de ensayos realizados considerando las diferentes variables estudiadas.
- * Indica que en estos ensayos, también se determinó la producción de biomasa por la cepa en estudio en los diferentes medios de cultivo.

Anexo II.

Preparación de los medios de cultivo

Los medios de cultivo M (30 g/l), PDB [(Difco, E.U.A.) (24 g/l)] y CYM (Cuadro 1) se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuadro 1. Componentes del medio de cultivo líquido CYM

Reactivo	Cantidad (g/L)
Dextrosa	20
Peptona de carne	2
Extracto de levadura	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
KH ₂ PO ₄	0.46
K ₂ HPO ₄	1

Medio de cultivo: extracto de paja de trigo

Este medio fue preparado de acuerdo a Membrillo *et al* (2008) y Garzillo *et al* (1994). Se suspendieron 3 g de paja de trigo triturada por cada 100 ml de agua destilada; posteriormente se hirvió por 10 min y finalmente el extracto de paja de trigo fue filtrado con la ayuda de un embudo, al cual se le colocó papel filtro (Watman, No. 1) para evitar que pasaran las partículas de paja.

Medio de cultivo líquido: extracto de paja de trigo con peptona

El procedimiento para obtener el extracto enzimático fue el mismo que en caso anterior solo que a este medio de cultivo se le adicionó 1 g de peptona (Bioxon, México) por cada 100 ml.

Medio de cultivo líquido con Solka Floc usado como fuente de carbono

Este medio fue preparado de acuerdo a Elisashvili *et al* (2008), con algunas variaciones, quien reporta las siguientes cantidades de reactivos, para preparar 1L: 10.0 g de glucosa (J. T.Baker, México), 1.0 g de NH₄NO₃ (J. T.Baker, México), 0.8 g de KH₂PO₄ (J. T.Baker, México), 0.2 g de Na₂HPO₄ (Química Meyer, México), 0.5 g de MgSO₄·7H₂O (J. T.Baker, México), 2.0 g de extracto de levadura (Bioxon, México). Posteriormente, cada uno de los medios de cultivo fue esterilizado a 121 °C,

durante 25 min. Se vertieron 13 ml de los medios de cultivo en cajas Petri (60X15) bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar (VECO, México). Por cada cepa se prepararon 8 réplicas.

La actividad de la celulasa de la cepa CP-50 se determinó en cada uno de los medios de cultivo antes mencionados, a diferentes días de incubación, diluciones y tiempo de incubación del sustrato, con la finalidad de encontrar tanto un medio de cultivo óptimo, como las condiciones adecuadas para la producción de estas enzimas por cepas de *Pleurotus*, y a continuación se muestran los resultados obtenidos.

Anexo III. Resultados de ensayos

Al determinar la actividad de la enzima celulasa por la cepa CP-50 en medio de cultivo Extracto de Malta (M) durante 0, 2, 4, 6 y 8 días de fermentación líquida, con una dilución 1:9 del extracto enzimático (450µl de buffer citrato y 50µl de extracto) y a diferentes tiempos de incubación del sustrato (CMC), se registraron absorvancias muy bajas en los distintos tratamientos, que oscilaron entre -0.0003 - 0.0710, estos resultados indican que no fue posible la detección de celulasa bajo estas condiciones de cultivo e incubación del sustrato (Cuadro 2).

Cuadro 2. Determinación de la actividad de celulasa por la cepa CP- 50 de *Pleurotus ostreatus*, en medio de cultivo M, durante 8 días de fermentación líquida; con un tiempo de incubación del sustrato (CMC) de 60, 40 y 20 min y con dilución 1:9 del extracto enzimático. A una longitud de onda de 540 nm.

Incubación (días)	Tiempo de incubación del sustrato (min)		
	60	40	20
0	0.0240	0.0207	0.0343
2	0.0013	0.0347	0.0493
4	0.0267	0.0423	0.0213
6	-0.0003	0.0710	0.0377
8	0.0283	0.0313	0.0400

De acuerdo con los resultados encontrados anteriormente, en donde no influyó el tiempo de incubación del sustrato, para que la producción de la enzima celulasa aumentará, se decidió determinar la actividad de esta enzima, por la cepa CP-50 en medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB), bajo las mismas condiciones de cultivo que en el caso anterior, con la diferencia de que en este tratamiento la incubación del

sustrato solo se llevo acabo durante 60 min. Sin embargo, al igual que en el caso anterior se registraron absorvancias muy bajas que fluctuaron de -0.0220 - 0.0290. Por tal motivo estas condiciones tampoco resultaron viables para la producción de celulasa (Cuadro 3).

Cuadro 3. Determinación de la actividad de celulasa por la cepa CP- 50 de *Pleurotus ostreatus*, en medio de cultivo PDB, durante 8 días de fermentación líquida; con un tiempo de incubación del sustrato (CMC) de 60 min y con dilución 1:9 del extracto enzimático.

Incubación (días)	Absorvancia (540 nm)
0	0.0200
2	0.0050
4	0.0290
6	-0.0147
8	-0.0220

También se llevo a cabo la determinación de la actividad enzimática en el Medio Completo para Levaduras (CYM) por la cepa CP-50, bajo las mismas circunstancias que en el tratamiento anterior, obteniendo bajas absorvancias, que oscilaron entre -0.1283 a 0.0060. Por lo tanto, estos resultados indican que las condiciones consideradas en este estudio no resultaron óptimas para la producción de celulasa (Cuadro 4).

Cuadro 4. Determinación de la actividad de celulasa por la cepa CP- 50 de *Pleurotus ostreatus*, en medio de cultivo CYM, durante 8 días de fermentación líquida; con un tiempo de incubación del sustrato (CMC) de 60 min y con dilución 1:9 del extracto enzimático.

Incubación (días)	Absorvancia (540 nm)
0	-0.1177
2	-0.0507
4	0.0060
6	-0.0167
8	-0.1283

A los diferentes días de incubación se tomaron simultáneamente muestras del extracto enzimático y de la biomasa producida por la cepa en estudio en los medios de cultivo M, PDB y CYM. Con respecto a la producción de biomasa, los resultados muestran (Cuadro 5) que en el medio CYM se produjo una mayor cantidad de biomasa (0.104 g/ml) al término de la cinética en estudio (8 días), seguida del medio

M (0.069 g/ml); en contraste donde se registro menor producción fue en el medio PDB (0.026 g/ml).

Cuadro 5. Producción de biomasa (g/ml) por la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en 3 medios líquidos, durante 8 días de incubación.

Incubación (días)	Medios de cultivo		
	M	PDB	CYM
2	0.007	0.002	0.004
4	0.020	0.006	0.015
6	0.048	0.012	0.051
8	0.069	0.026	0.104

M=Extracto de malta, PDB=Caldo Papa Dextrosa, CYM=Medio Completo para Levaduras

En la figura 1, se observa que la producción de biomasa por la cepa CP-50, fue incrementando durante los 8 días de fermentación en los tres medios de cultivo en estudio, y la mayor producción de biomasa se registró en el medio completo para levaduras (CYM).

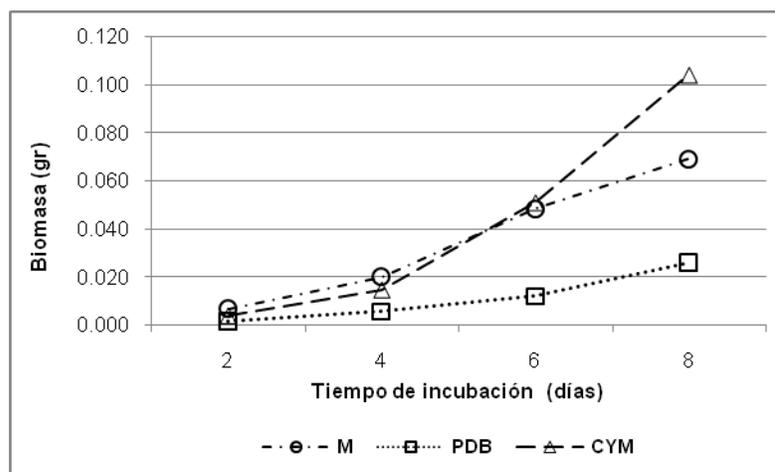


Fig. 1. Cinética de la producción de biomasa de la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus* cultivada en 3 medios líquidos (M=Extracto de malta, PDB=Caldo Papa Dextrosa, CYM= Medio Completo para Levaduras), durante 8 días de incubación.

Otro medio que se uso para determinar la actividad de la celulasa por la cepa CP-50 fue el medio de Extracto de Paja de Trigo (E.P.T.), durante 0, 2 y 4 días de fermentación líquida, con una dilución 1:9 del extracto enzimático (450µl de buffer citrato y 50µl de extracto) y, la incubación del sustrato se llevo acabo durante 60 min. Al igual que en lo ensayos anteriores se registraron absorvancias muy bajas a

los distintos días considerados en la cinética en estudio, cuyos rangos fluctuaron entre -0.0037 - 0.0063, estos resultados indican que no fue posible la detección de celulasa bajo estas condiciones de cultivo e incubación del sustrato (Cuadro 6)

Cuadro 6. Determinación de la actividad de celulasa por la cepa CP- 50 de *Pleurotus ostreatus*, en medio de cultivo E. P. T., durante 4 días de fermentación líquida; con un tiempo de incubación del sustrato (CMC) de 60 min y con dilución 1:9 del extracto enzimático.

Incubación (días)	Absorvancia (540 nm)
0	-0.0037
2	0.0063
4	0.0013

Para descartar que la baja producción de celulasa por la cepa CP-50, fue ocasionada por el corto período de tiempo de fermentación (4 días), en el caso del ensayo anterior, se decidió aumentar los días de incubación (10 días). Sin embargo los resultados mostraron nuevamente absorvancias mínimas, las cuales oscilaron de -0.0017 a 0.0203 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Determinación de la actividad de celulasa por la cepa CP- 50 de *Pleurotus ostreatus*, en medio de cultivo E. P. T., durante 10 días de fermentación líquida; con un tiempo de incubación del sustrato (CMC) de 60 min y sin dilución del extracto enzimático.

Incubación (días)	Absorvancia (540 nm)
0	0.0203
2	0.0020
4	-0.0017
8	0.0080
10	0.0070

Posteriormente se uso el mismo medio que en el caso anterior, pero se adicionó peptona (E. P. T. + P), para determinar la actividad de la enzima celulasa por la misma cepa en estudio. En este ensayo la determinación enzimática se llevo a cabo con las siguientes condiciones: durante 0, 2, 4, 6, 8 y 10 días de fermentación líquida, con diferentes diluciones del extracto enzimático (1:9, 1:4, 1:1 y sin dilución) y, la incubación del sustrato (CMC) se llevo acabo durante 60 min.

Los resultados indican en general bajas absorvancias, tanto a los diferentes días de incubación, como con las distintas diluciones del extracto enzimático, que fluctúan entre -0.0070 a 0.0323 (Cuadro 8).

Cuadro 8. Determinación de la actividad de celulasa por la cepa CP- 50 de *Pleurotus ostreatus*, en medio de cultivo E. P. T. + P, durante 10 días de fermentación líquida; con un tiempo de incubación del sustrato (CMC) de 60 min y con diferentes diluciones del extracto enzimático. A una longitud de onda de 540 nm.

Incubación (días)	Dilución del extracto enzimático			
	1:9	1:4	1:1	Sin dilución
0	-0.0120	0.0033	0.0017	-0.0037
2	0.0010	0.0037	-0.0010	0.0013
4	-0.0047	-0.0070	0.0043	0.0323
8				-0.0157
10				-0.0047

Otro medio que se uso para determinar la actividad de la celulasa por la cepa CP-50 fue el medio de cultivo Solka Floc (S.F.), durante 0, 2 y 4 días de fermentación líquida, con diferentes diluciones (1:9, 1:4 y sin dilución). Bajo estas condiciones de cultivo también se detectaron bajas absorvancias, cuyos valores oscilaron entre -0.057 - 0.0110 (Cuadro 9).

Cuadro 9. Determinación de la actividad de celulasa por la cepa CP- 50 de *Pleurotus ostreatus*, en medio de cultivo Extracto S.F., durante 4 días de fermentación líquida; con un tiempo de incubación del sustrato (CMC) de 60 min y con diferentes diluciones del extracto enzimático. A una longitud de onda de 540 nm.

Incubación (días)	Dilución del extracto enzimático		
	1:9	1:4	Sin dilución
0	0.0053	0.0050	0.0020
2	0.0010	0.0110	0.0063
4	-0.0057	-0.0047	-0.0017

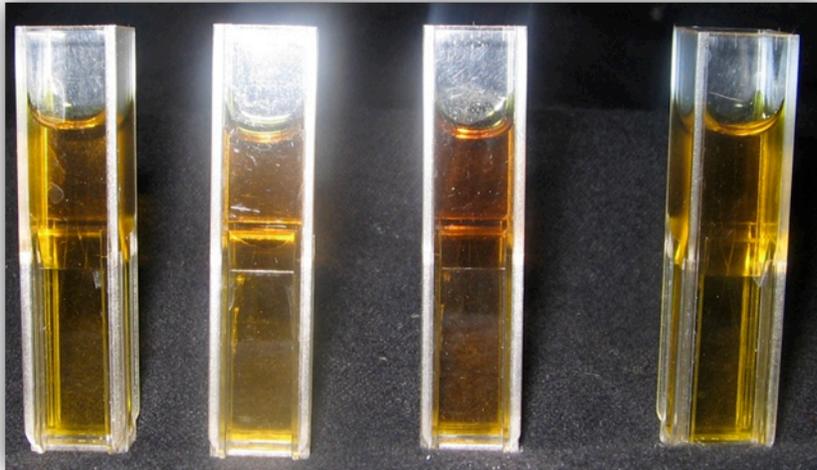
Y finalmente, para eliminar la posibilidad, de que la baja producción de celulasa por la cepa CP-50, fue ocasionada por el corto período de tiempo de fermentación (4 días), en el caso del ensayo anterior, se decidió aumentar los días de incubación (10 días).Y de esta forma se encontraron resultados significativos, comparados con los obtenidos en los ensayos anteriores. En este caso se llevo a cabo un primer estudio en donde se determinó la actividad de la enzima celulasa a los 0, 8 y 10 días de

fermentación líquida, con un tiempo de incubación del sustrato de 60 min y sin diluir el extracto enzimático. Bajo estas condiciones en el cuadro 10, se observa que al décimo día de incubación se alcanzó la mayor producción de celulasa, en donde se registró un valor de 0.5523. Posteriormente se llevaron a cabo 2 ensayos más, bajo las mismas condiciones, pero con tiempos de incubación menores (40 y 20 min), con la finalidad de reducir el período de incubación del sustrato; siempre y cuando los resultados fueran satisfactorios. Con base a estos resultados, también se detectó la mayor actividad enzimática en el día 10, con un periodo de incubación del sustrato de 40 y 20 min, registrándose en el segundo, cerca de la mitad de la lectura inicial de absorvancia (a 60 min).

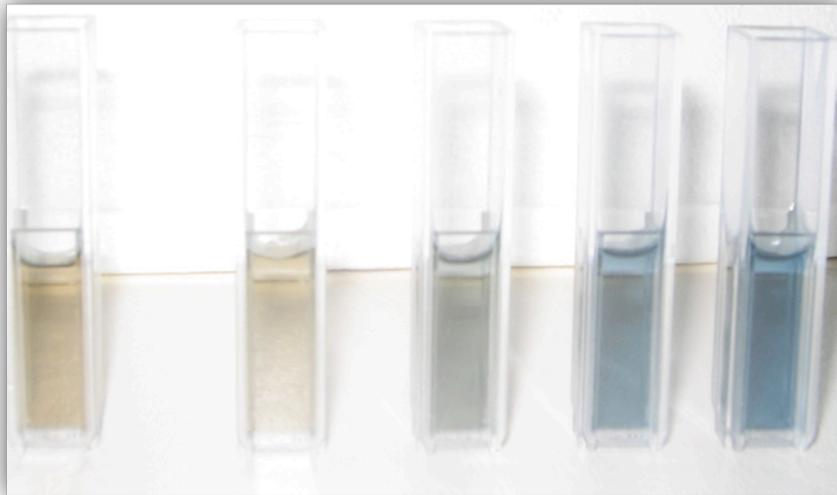
Cuadro 10. Determinación de la actividad de celulasa por la cepa CP- 50 de *Pleurotus ostreatus*, en medio de cultivo S. F., durante 8 días de fermentación líquida; con un tiempo de incubación del sustrato (CMC) de 60, 40 y 20 min y sin dilución del extracto enzimático. A una longitud de onda de 540 nm.

Incubación (días)	Tiempo de incubación del sustrato (min)		
	60	40	20
0	0.0027	0.0030	0.0007
8	0.4687	0.2293	0.1493
10	0.5523	0.4343	0.2177

De acuerdo a los resultados parcialmente obtenidos de la actividad de enzimas celulolíticas por la cepa CP-50 en los diferentes medios de cultivo líquidos, se concluye que en el medio de cultivo con Solka Floc, fue donde se presentó la mayor actividad de celulasa, considerando las siguientes variables: de 8-10 días de incubación, sin dilución del extracto enzimático y con un tiempo de incubación óptimo de 20 min. Por tal motivo se determinó que este medio de cultivo es el óptimo para medir la actividad celulolítica de las 13 cepas de *Pleurotus* estudiadas en este trabajo de investigación.



Anexo IV. Curva estándar para glucosa.



Anexo V. Curva estándar para proteína

Anexo VI. Análisis estadístico

Análisis estadístico para comparar la producción de celulosa, proteína y biomasa por cada cepa a diferentes días de incubación

CP-18

Cuadro 11. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulosa, proteína y biomasa para la cepa CP-18 de *Pleurotus cystidiosus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Celulosa	Inter-grupos	.001	3	.000	.484	.697
	Intra-grupos	.009	20	.000		
	Total	.010	23			
Proteína	Inter-grupos	14.984	3	4.995	88.790	.000
	Intra-grupos	.225	4	.056		
	Total	15.209	7			
Biomasa	Inter-grupos	83.660	3	27.887	12.428	.017
	Intra-grupos	8.976	4	2.244		
	Total	92.636	7			

Cuadro 12. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulosa, producida por la cepa CP-18 de *Pleurotus cystidiosus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	
0	6	.331197	
14	6	.334110	
21	6	.339938	
28	6	.344794	
Sig.		.325	

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Cuadro 13. Comparación de medias por el método de Duncan para la proteína, producida por la cepa CP-18 de *Pleurotus cystidiosus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
0	2	2.900467	
21	2		5.847664
14	2		6.057944
28	2		6.230841
Sig.		1.000	.187

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

Cuadro 14. Comparación de medias por el método de Duncan para la biomasa, producida por la cepa CP-18 de *Pleurotus cystidiosus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
0	2	.088889	
14	2	3.313889	
28	2		7.722222
21	2		7.784722
Sig.		.098	.969

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

CP-30

Cuadro 15. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulosa, proteína y biomasa para la cepa CP-30 de *Pleurotus levis*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Celulasas	Inter-grupos	21.256	3	7.085	386.530	.000
	Intra-grupos	.367	20	.018		
	Total	21.623	23			
Proteínas	Inter-grupos	87.149	3	29.050	51.348	.001
	Intra-grupos	2.263	4	.566		
	Total	89.412	7			
Biomasa	Inter-grupos	50.816	3	16.939	7.498	.041
	Intra-grupos	9.036	4	2.259		
	Total	59.852	7			

Cuadro 16. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulosa, producida por la cepa CP-30 de *Pleurotus cystidiosus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
0	6	.368104		
14	6	.387529		
21	6		1.243201	
28	6			2.680653
Sig.		.806	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Cuadro 17. Comparación de medias por el método de Duncan para la proteína, producida por la cepa CP-30 de *Pleurotus cystidiosus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Subconjunto para alfa = .05

Tiempos	N	2	3	1
0	2	2.743925		
21	2		8.252804	
14	2		8.470093	
28	2			11.967757
Sig.		1.000	.787	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

Cuadro 18. Comparación de medias por el método de Duncan para la biomasa, producida por la cepa CP-30 de *Pleurotus levis*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
0	2	.022222	
14	2	2.593056	2.593056
28	2		5.630556
21	2		6.334722
Sig.		.162	.071

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

CP-44

Cuadro 19. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulosa, proteína y biomasa para la cepa CP-44 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Celulasas	Inter-grupos	.001	3	.000	.213	.886
	Intra-grupos	.029	20	.001		
	Total	.030	23			
Proteínas	Inter-grupos	20.923	3	6.974	162.712	.000
	Intra-grupos	.171	4	.043		
	Total	21.095	7			
Biomasa	Inter-grupos	49.788	3	16.596	38.068	.002
	Intra-grupos	1.744	4	.436		
	Total	51.532	7			

Cuadro 20. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulosa, producida por la cepa CP-44 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05
---------	---	-----------------------------

	1	1
14	6	.349650
0	6	.350622
21	6	.356449
28	6	.365190
Sig.		.523

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Cuadro 21. Comparación de medias por el método de Duncan para la proteína, producida por la cepa CP-44 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
0	2	2.645794		
14	2		5.497196	
21	2			6.511215
28	2			6.684112
Sig.		1.000	1.000	.451

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

Cuadro 22. Comparación de medias por el método de Duncan para la biomasa, producida por la cepa CP-44 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
0	2	.076389	
21	2		5.509722
28	2		5.630556
14	2		6.259722
Sig.		1.000	.325

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

CP-50

Cuadro 23. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Celulasas	Inter-grupos	11.723	3	3.908	39.699	.000
	Intra-grupos	1.969	20	.098		
	Total	13.691	23			
Proteínas	Inter-grupos	27.209	3	9.070	188.784	.000
	Intra-grupos	.192	4	.048		
	Total	27.401	7			
Biomasa	Inter-grupos	70.431	3	23.477	15.702	.011
	Intra-grupos	5.981	4	1.495		
	Total	76.412	7			

Cuadro 24. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, producida por la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
28	6	.333139		
0	6	.356449		
21	6		1.221834	
14	6			2.023116
Sig.		.899	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Cuadro 25. Comparación de medias por el método de Duncan para la proteína, producida por la cepa CP-50 de *Pleurotus ostreatus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
0	2	2.741589	
28	2		6.786916
14	2		6.852336
21	2		7.291589
Sig.		1.000	.087

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

Cuadro 26. Comparación de medias por el método de Duncan para la biomasa, producida por la cepa CP-50 de *Pleurotus spp.*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05
---------	---	-----------------------------

	1	2	1
0	2	.054167	
28	2		5.925000
21	2		6.629167
14	2		7.695833
Sig.		1.000	.227

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

CP-98

Cuadro 27. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-98 de *Pleurotus* spp., a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Celulasas	Inter-grupos	8.676	3	2.892	314.056	.000
	Intra-grupos	.184	20	.009		
	Total	8.860	23			
Proteínas	Inter-grupos	260.761	3	86.920	78.300	.001
	Intra-grupos	4.440	4	1.110		
	Total	265.201	7			
Biomasa	Inter-grupos	86.460	3	28.820	4.881	.080
	Intra-grupos	23.617	4	5.904		
	Total	110.077	7			

Cuadro 28. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, producida por la cepa CP-98 de *Pleurotus* spp., a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
21	6	.346737	
14	6	.350622	
0	6	.376845	
28	6		1.746309
Sig.		.614	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Cuadro 29. Comparación de medias por el método de Duncan para la proteína, producida por la cepa CP-98 de *Pleurotus* spp., a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Subconjunto para alfa = .05

Tiempos	N	2	3	1
0	2	2.694860		
14	2		7.629907	
21	2		10.003738	
28	2			18.471028
Sig.		1.000	.087	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

Cuadro 30. Comparación de medias por el método de Duncan para la biomasa, producida por la cepa CP-98 de *Pleurotus* spp., a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Subconjunto para alfa = .05				
Tiempos	N	2	1	
0	2	.088889		
14	2	3.009722	3.009722	
28	2	6.618056	6.618056	
21	2		8.634722	
Sig.		.058		.086

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

CP-120

Cuadro 31. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-120 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Celulasas	Inter-grupos	.003	3	.001	6.821	.002
	Intra-grupos	.003	20	.000		
	Total	.006	23			
Proteínas	Inter-grupos	18.594	3	6.198	89.935	.000
	Intra-grupos	.276	4	.069		
	Total	18.870	7			
Biomasa	Inter-grupos	24.685	3	8.228	133.224	.000
	Intra-grupos	.247	4	.062		
	Total	24.932	7			

Cuadro 32. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, producida por la cepa CP-120 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Subconjunto para alfa = .05

Tiempos	N	2	3	1
28	6	.320513		
21	6	.334110	.334110	
14	6		.341880	.341880
0	6			.350622
Sig.		.063	.275	.221

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Cuadro 33. Comparación de medias por el método de Duncan para la proteína, producida por la cepa CP-120 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
0	2	2.853738		
28	2		5.908411	
21	2		6.198131	6.198131
14	2			6.786916
Sig.		1.000	.332	.088

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

Cuadro 34. Comparación de medias por el método de Duncan para la biomasa, producida por la cepa CP-120 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
0	2	-.040278		
14	2		3.218056	
21	2			4.226389
28	2			4.255556
Sig.		1.000	1.000	.912

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

CP-171

Cuadro 35. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-171 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido

Solka Floc.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Celulasas	Inter-grupos	.007	3	.002	2.926	.059
	Intra-grupos	.015	20	.001		
	Total	.022	23			
Proteínas	Inter-grupos	18.515	3	6.172	110.553	.000
	Intra-grupos	.223	4	.056		
	Total	18.739	7			
Biomasa	Inter-grupos	104.845	3	34.948	4.059	.105
	Intra-grupos	34.437	4	8.609		
	Total	139.282	7			

Cuadro 36. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, producida por la cepa CP-171 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
28	6	.326340	
21	6	.347708	.347708
0	6	.352564	.352564
14	6		.372960
Sig.		.132	.146

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Cuadro 37. Comparación de medias por el método de Duncan para la proteína, producida por la cepa CP-171 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
0	2	2.788318		
21	2		5.371028	
14	2			6.268224
28	2			6.716822
Sig.		1.000	1.000	.130

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

Cuadro 38. Comparación de medias por el método de Duncan para la biomasa, producida por la cepa CP-171 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
0	2	-.015278	
14	2	6.518056	6.518056
21	2	7.059722	7.059722
28	2		9.863889
Sig.		.077	.324

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

CP-194

Cuadro 39. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-194 de *Pleurotus* spp., a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Celulasas	Inter-grupos	.585	3	.195	31.409	.000
	Intra-grupos	.124	20	.006		
	Total	.709	23			
Proteínas	Inter-grupos	185.542	3	61.847	118.226	.000
	Intra-grupos	2.093	4	.523		
	Total	187.635	7			
Biomasa	Inter-grupos	12.419	3	4.140	14.505	.013
	Intra-grupos	1.142	4	.285		
	Total	13.561	7			

Cuadro 40. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, producida por la cepa CP-194 de *Pleurotus* spp., a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
14	6	.312743	
0	6	.323427	
21	6	.341880	
28	6		.685703
Sig.		.552	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Cuadro 41. Comparación de medias por el método de Duncan para la proteína, producida por la cepa CP-194 de *Pleurotus* spp., a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	Subconjunto para alfa = .05					
	N	1	2	3	4	1
0	2		2.947196			
14	2			9.246729		
21	2				13.143925	
28	2					15.732710
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

Cuadro 42. Comparación de medias por el método de Duncan para la biomasa, producida por la cepa CP-194 de *Pleurotus* spp., a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
0	2	.027778	
28	2		2.555556
14	2		2.840278
21	2		3.181944
Sig.		1.000	.312

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

CP-253

Cuadro 43. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-253 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Celulasas	Inter-grupos	.001	3	.000	1.052	.391
	Intra-grupos	.005	20	.000		
	Total	.005	23			
Proteínas	Inter-grupos	22.641	3	7.547	35.144	.002
	Intra-grupos	.859	4	.215		
	Total	23.500	7			
Biomasa	Inter-grupos	62.873	3	20.958	4.339	.095
	Intra-grupos	19.320	4	4.830		
	Total	82.194	7			

Cuadro 44. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, producida por la cepa CP-253 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05
---------	---	-----------------------------

	1	1
14	6	.330225
0	6	.337024
28	6	.337995
21	6	.345765
Sig.		.119

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Cuadro 45. Comparación de medias por el método de Duncan para la proteína, producida por la cepa CP-253 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
0	2	2.645794		
28	2		4.777570	
21	2			6.515888
14	2			6.899065
Sig.		1.000	1.000	.455

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

Cuadro 46. Comparación de medias por el método de Duncan para la biomasa, producida por la cepa CP-253 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
0	2	-.113889	
21	2	4.315278	4.315278
28	2	4.648611	4.648611
14	2		7.752778
Sig.		.101	.199

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

CP-257

Cuadro 47. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulosa, proteína y biomasa para la cepa CP-257 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido

Solka Floc.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Celulasas	Inter-grupos	.017	3	.006	15.824	.000
	Intra-grupos	.007	20	.000		
	Total	.025	23			
Proteínas	Inter-grupos	13.440	3	4.480	159.533	.000
	Intra-grupos	.112	4	.028		
	Total	13.552	7			
Biomasa	Inter-grupos	37.786	3	12.595	32.037	.003
	Intra-grupos	1.573	4	.393		
	Total	39.358	7			

Cuadro 48. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, producida por la cepa CP-257 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
28	6	.302059	
21	6	.303030	
14	6		.352564
0	6		.359363
Sig.		.931	.544

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Cuadro 49. Comparación de medias por el método de Duncan para la proteína, producida por la cepa CP-257 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
0	2	2.645794	
14	2		5.492523
21	2		5.511215
28	2		5.857009
Sig.		1.000	.100

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

Cuadro 50. Comparación de medias por el método de Duncan para la biomasa, producida por la cepa CP-257 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
0	2	.137500		
28	2		3.983333	
21	2		4.887500	4.887500
14	2			5.870833
Sig.		1.000	.223	.192

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

CP-261

Cuadro 51. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-261 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Celulasas	Inter-grupos	.001	3	.000	1.479	.250
	Intra-grupos	.004	20	.000		
	Total	.005	23			
Proteínas	Inter-grupos	16.569	3	5.523	40.240	.002
	Intra-grupos	.549	4	.137		
	Total	17.118	7			
Biomasa	Inter-grupos	56.384	3	18.795	9.659	.026
	Intra-grupos	7.784	4	1.946		
	Total	64.167	7			

Cuadro 52. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, producida por la cepa CP-261 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05
		1
14	6	.329254
28	6	.330225
21	6	.337024
0	6	.343823
Sig.		.104

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Cuadro 53. Comparación de medias por el método de Duncan para la proteína, producida por la cepa CP-261 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
0	2	2.645794	
28	2		5.202804
14	2		6.123364
21	2		6.202804
Sig.		1.000	.057

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

Cuadro 54. Comparación de medias por el método de Duncan para la biomasa, producida por la cepa CP-261 de *Pleurotus djamor*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
0	2	.061111	
21	2		5.873611
28	2		6.165278
14	2		6.477778
Sig.		1.000	.690

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

CP-267

Cuadro 55. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulasa, proteína y biomasa para la cepa CP-267 de *Pleurotus ostreatus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Celulasas	Inter-grupos	1.945	3	.648	70.331	.000
	Intra-grupos	.184	20	.009		
	Total	2.130	23			
Proteínas	Inter-grupos	71.488	3	23.829	66.001	.001
	Intra-grupos	1.444	4	.361		
	Total	72.932	7			
Biomasa	Inter-grupos	87.047	3	29.016	9.170	.029
	Intra-grupos	12.657	4	3.164		
	Total	99.705	7			

Cuadro 56. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, producida por la cepa CP-267 de *Pleurotus ostreatus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
0	6	.313714	
14	6	.349650	
21	6	.412782	
28	6		1.011072
Sig.		.105	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Cuadro 57. Comparación de medias por el método de Duncan para la proteína, producida por la cepa CP-267 de *Pleurotus ostreatus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
0	2	2.797664	
21	2		9.150000
14	2		9.367290
28	2		10.348598
Sig.		1.000	.122

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

Cuadro 58. Comparación de medias por el método de Duncan para la biomasa, producida por la cepa CP-267 de *Pleurotus ostreatus*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
0	2	.252778	
21	2	5.044444	5.044444
28	2	5.173611	5.173611
14	2		9.577778
Sig.		.054	.067

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

CP-328

Cuadro 59. Análisis de varianza de las variables en estudio: producción de celulosa, proteína y biomasa para la cepa CP-328 de *Pleurotus pulmonarius*, a 28 días de incubación usando medio

líquido Solka Floc.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Celulasas	Inter-grupos	90.174	3	30.058	1280.662	.000
	Intra-grupos	.188	8	.023		
	Total	90.362	11			
Proteínas	Inter-grupos	213.718	3	71.239	158.085	.000
	Intra-grupos	1.803	4	.451		
	Total	215.521	7			
Biomasa	Inter-grupos	36.692	3	12.231	13.482	.015
	Intra-grupos	3.629	4	.907		
	Total	40.321	7			

Cuadro 60. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, producida por la cepa CP-328 de *Pleurotus pulmonarius*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05			
		2	3	4	1
0	3	.855603			
14	3		2.947601		
28	3			5.467400	
21	3				8.175244
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Cuadro 61. Comparación de medias por el método de Duncan para la proteína, producida por la cepa CP-328 de *Pleurotus pulmonarius*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
0	2	2.615421		
14	2		11.137850	
21	2			14.502336
28	2			15.927570
Sig.		1.000	1.000	.101

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

Cuadro 62. Comparación de medias por el método de Duncan para la biomasa, producida por la cepa CP-328 de *Pleurotus pulmonarius*, a 28 días de incubación usando medio líquido Solka Floc y formación de grupos homogéneos.

Tiempos	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
0	2	.018056	
28	2		3.672222
21	2		3.868056
14	2		5.972222
Sig.		1.000	.077

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

Análisis estadístico aplicado para comparar la actividad enzimática y proteína entre todas las cepas a diferentes días de incubación

A tiempo cero

Cuadro 63. Análisis de varianza 13 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* al tiempo cero de incubación, usando medio líquido Solka Floc.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Celulasas	Inter-grupos	.767	12	.064	194.843	.000
	Intra-grupos	.020	62	.000		
	Total	.787	74			
Proteínas	Inter-grupos	.280	12	.023	5.786	.002
	Intra-grupos	.052	13	.004		
	Total	.333	25			

Cuadro 64. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, producida por 13 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* a tiempo cero de incubación en fermentación líquida.

Cepa	N	Subconjunto para alfa = .05
------	---	-----------------------------

	1	2	3	4	5	6	7	1
267	6	.313714						
194	6	.323427	.323427					
18	6	.331197	.331197	.331197				
253	6	.337024	.337024	.337024	.337024			
261	6		.343823	.343823	.343823	.343823		
44	6			.350622	.350622	.350622		
120	6			.350622	.350622	.350622		
171	6			.352564	.352564	.352564		
50	6				.356449	.356449	.356449	
257	6				.359363	.359363	.359363	
30	6					.368104	.368104	
98	6						.376845	
328	3							.855603
Sig.		.053	.090	.089	.079	.056	.090	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5.571.

b Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos.

Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Cuadro 65. Comparación de medias por el método de Duncan para la proteína, producida por 13 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* a tiempo cero de incubación en fermentación líquida.

Cepa	N	Subconjunto para alfa = .05					
		2	3	4	5	1	
328	2	2.615421					
44	2	2.645794	2.645794				
253	2	2.645794	2.645794				
257	2	2.645794	2.645794				
261	2	2.645794	2.645794				
98	2	2.694860	2.694860				
50	2	2.741589	2.741589	2.741589			
30	2	2.743925	2.743925	2.743925			
171	2		2.788318	2.788318	2.788318		
267	2		2.797664	2.797664	2.797664		
120	2			2.853738	2.853738	2.853738	
18	2				2.900467	2.900467	
194	2						2.947196
Sig.		.095	.055	.132	.126	.185	

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

A los 14 días

Cuadro 66. Análisis de varianza 13 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* al día 14 de incubación, usando medio líquido Solka Floc.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Celulasas	Inter-grupos	32.936	12	2.745	719.663	.000
	Intra-grupos	.236	62	.004		
	Total	33.172	74			
Proteínas	Inter-grupos	70.675	12	5.890	22.457	.000
	Intra-grupos	3.409	13	.262		
	Total	74.084	25			

Cuadro 67. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, producida por 13 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* al día 14 de incubación en fermentación líquida.

Cepa	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
194	6	.312743		
261	6	.329254		
253	6	.330225		
18	6	.334110		
120	6	.341880		
44	6	.349650		
267	6	.349650		
98	6	.350622		
257	6	.352564		
171	6	.372960		
30	6	.387529		
50	6		2.023116	
328	3			2.947601
Sig.		.096	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5.571.

b Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Cuadro 68. Comparación de medias por el método de Duncan para la proteína, producida por 13

cepas pertenecientes al género *Pleurotus* al día 14 de incubación en fermentación líquida.

Cepa	N	Subconjunto para alfa = .05					
		2	3	4	5	6	1
257	2	5.492523					
44	2	5.497196					
18	2	6.057944	6.057944				
261	2	6.123364	6.123364				
171	2	6.268224	6.268224				
120	2		6.786916	6.786916			
50	2		6.852336	6.852336			
253	2		6.899065	6.899065			
98	2			7.629907	7.629907		
30	2				8.470093	8.470093	
194	2					9.246729	
267	2					9.367290	
328	2						11.137850
Sig.		.191	.162	.151	.125	.119	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

Cuadro 69. Correlación entre la producción de celulasa y proteína de las cepas en estudio a los 14 días de incubación en medio líquido solka floc.

		Celulasas	Proteínas
Celulasas	Correlación de Pearson	1	.505(**)
	Sig. (bilateral)		.008
	N	75	26
Proteínas	Correlación de Pearson	.505(**)	1
	Sig. (bilateral)	.008	
	N	26	26

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

A los 21 días

Cuadro 70. Análisis de varianza 13 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* al día 21 de incubación, usando medio líquido Solka Floc.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Celulasas	Inter-grupos	177.806	12	14.817	446.884	.000
	Intra-grupos	2.056	62	.033		
	Total	179.862	74			
Proteínas	Inter-grupos	206.516	12	17.210	42.405	.000
	Intra-grupos	5.276	13	.406		
	Total	211.792	25			

Cuadro 71. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, producida por 13

cepas pertenecientes al género *Pleurotus* al día 21 de incubación en fermentación líquida.

Cepa	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
257	6	.303030		
120	6	.334110		
261	6	.337024		
18	6	.339938		
194	6	.341880		
253	6	.345765		
98	6	.346737		
171	6	.347708		
44	6	.356449		
267	6	.412782		
50	6		1.221834	
30	6		1.243201	
328	3			8.175244
Sig.		.406	.845	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5.571.

b Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Cuadro 72. Comparación de medias por el método de Duncan para la proteína, producida por 13 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* al día 21 de incubación en fermentación líquida.

Cepa	N	Subconjunto para alfa = .05					
		2	3	4	5	6	1
171	2	5.371028					
257	2	5.511215					
18	2	5.847664	5.847664				
120	2	6.198131	6.198131				
261	2	6.202804	6.202804				
44	2	6.511215	6.511215				
253	2	6.515888	6.515888				
50	2		7.291589	7.291589			
30	2			8.252804	8.252804		
267	2				9.150000	9.150000	
98	2					10.003738	
194	2						13.143925
328	2						14.502336
Sig.		.132	.062	.155	.182	.203	.053

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

Cuadro 73. Correlación entre la producción de celulasa y proteína de las cepas en estudio a los 21

días de incubación en medio líquido Solka Floc.

		Celulasas	Proteínas
Celulasas	Correlación de Pearson	1	.656(**)
	Sig. (bilateral)		.000
	N	75	26
Proteínas	Correlación de Pearson	.656(**)	1
	Sig. (bilateral)	.000	
	N	26	26

*La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

A los 28 días

Cuadro 74. Análisis de varianza 13 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* al día 21 de incubación, usando medio líquido Solka Floc.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Celulasas	Inter-grupos	101.692	12	8.474	677.314	.000
	Intra-grupos	.776	62	.013		
	Total	102.467	74			
Proteínas	Inter-grupos	534.940	12	44.578	98.011	.000
	Intra-grupos	5.913	13	.455		
	Total	540.852	25			

Cuadro 75. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa, producida por 13 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* al día 21 de incubación en fermentación líquida.

Cepa	N	Subconjunto para alfa = .05					
		2	3	4	5	6	1
257	6	.302059					
120	6	.320513					
171	6	.326340					
261	6	.330225					
50	6	.333139					
253	6	.337995					
18	6	.344794					
44	6	.365190					
194	6		.685703				
267	6			1.011072			
98	6				1.746309		
30	6					2.680653	
328	3						5.467400
Sig.		.430	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5.571.

b Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Cuadro 76. Comparación de medias por el método de Duncan para la proteína, producida por 13 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* al día 28 de incubación en fermentación líquida.

Cepa	N	Subconjunto para alfa = .05					
		2	3	4	5	6	1
253	2	4.777570					
261	2	5.202804	5.202804				
257	2	5.857009	5.857009				
120	2	5.908411	5.908411				
18	2	6.230841	6.230841				
44	2		6.684112				
171	2		6.716822				
50	2		6.786916				
267	2			10.348598			
30	2				11.967757		
194	2					15.732710	
328	2					15.927570	
98	2						18.471028
Sig.		.071	.056	1.000	1.000	.777	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

Cuadro 77. Correlación entre la producción de celulasa y proteína de las cepas en estudio a los 28 días de incubación en medio líquido Solka Floc.

		Celulasas	Proteínas
Celulasas	Correlación de Pearson	1	.661(**)
	Sig. (bilateral)		.000
	N	75	26
Proteínas	Correlación de Pearson	.661(**)	1
	Sig. (bilateral)	.000	
	N	26	26

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Análisis estadístico para comparar la producción de celulasa, proteína y biomasa de las cepas con mayores capacidades de degradación de sustratos a los 28 días de incubación

Cuadro 78. Análisis de varianza 6 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* a los 28 días de incubación, usando medio líquido Solka Floc.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Celulasas	Inter-grupos	68.566	5	13.713	482.784	.000
	Intra-grupos	.767	27	.028		
	Total	69.332	32			
Proteínas	Inter-grupos	184.829	5	36.966	40.455	.000
	Intra-grupos	5.483	6	.914		
	Total	190.311	11			

Cuadro 79. Comparación de medias por el método de Duncan para la celulasa producida por 6 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* a los 28 días de incubación en fermentación líquida.

Cepa	N	Subconjunto para alfa = .05					
		2	3	4	5	6	1
50	6	.333139					
194	6		.685703				
267	6			1.011072			
98	6				1.746309		
30	6					2.680653	
328	3						5.467400
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5.143.

b Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Cuadro 80. Comparación de medias por el método de Duncan para la proteína producida por 6 cepas pertenecientes al género *Pleurotus* a los 28 días de incubación en fermentación líquida.

Cepa	N	Subconjunto para alfa = .05			
		2	3	4	1
50	2	6.786916			
267	2		10.348598		
30	2		11.967757		
194	2			15.732710	
328	2			15.927570	
98	2				18.471028
Sig.		1.000	.141	.845	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

Cuadro 81. Correlación entre la producción de celulasa y proteína de las cepas elegidas a los 28 días de incubación en medio líquido Solka Floc.

		Celulasas	Proteínas
Celulasas	Correlación de Pearson	1	.412
	Sig. (bilateral)		.183
	N	33	12
Proteínas	Correlación de Pearson	.412	1
	Sig. (bilateral)	.183	
	N	12	12

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).