

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

PRODUCCION COMPARATIVA DE MICELIO DE
Pleurotus ostreatus POR EL METODO DE CULTIVO
SUMERGIDO, CON FINES ALIMENTICIOS HUMANOS

46

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARIA SILVIA CABRERA SALINAS
GABRIELA ELEONORA MOULLER CHAVEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Biblioteca Central

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS _____
NO _____ M-45 (1974)
ESCHA _____ 1974
REC _____ Nit-43



QUÍMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE	Julio Terán Zavaleta
VOCAL	Alfredo Echegaray Alemán
SECRETARIO	Jorge Soto Soria
1er. SUPLENTE	Carmen Reyna Bordes
2o. SUPLENTE	Josefina García Díaz

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**Laboratorio de Microbiología de la Facultad
de Química**

NOMBRE DE LA SUSTENTANTE:

Maria Silvia Cabrera Salinas

NOMBRE DEL ASESOR DEL TEMA:

Julio Terán Zavaleta

Al Quim. Julio Terán Zavaleta
por el apoyo que proporcionó -
en el desarrollo de este trabajo.

Al. Q. B. P. Jorge Soto Soria
por la ayuda valiosa y desinteresada
que prestó para poder realizar un -
trabajo mejor.

A MIS PADRES .

Con gran cariño y el más
sincero agradecimiento -
por la comprensión que -
siempre me han brindado.

A MIS HERMANOS .

GI SELA

NIVARDO

TERESA

BEATRIZ

ALEJANDRO

A MIS AMIGOS.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE	Julio Terán Zavaleta
VOCAL	Alfredo Echegaray Alemán
SECRETARIO	Jorge Soto Soria
1er. SUPLENTE	Carmen Reyna Bordes
2o. SUPLENTE	Josefina García Díaz

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio de Microbiología de la Facultad
de Química.

NOMBRE DE LA SUSTENTANTE:

Gabriela Eleonora Moeller Chávez

NOMBRE DEL ASESOR DEL TEMA:

Julio Terán Zavaleta

Al Quim. Julio Terán Zavaleta
por el apoyo que proporcionó -
en el desarrollo de este trabajo.

Al Q. B. P. Jorge Soto Soria
por la ayuda valiosa y desinte-
resada que prestó para poder -
realizar un trabajo mejor.

**A mis padres:
con cariño y mi más sincero
agradecimiento.**

A mi abuelita

**A mis amigos y a todas - -
aquellas personas quienes
de una u otra manera han -
contribuido a mi formación.**

A Jorge

INDICE

	Página
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	4
MATERIALES Y METODOS	24
RESULTADOS Y DISCUSION	47
CONCLUSIONES Y RESUMEN	93
BIBLIOGRAFIA	97

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La explosión demográfica que actualmente es mayor que la producción de alimentos trae como consecuencia una presión ejercida sobre la provisión alimenticia; de acuerdo a las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud, más de mil millones de hombres sufren de mala nutrición (1). México es de los países más afectados con este problema, ya que investigaciones hechas por el Instituto Nacional de la Nutrición han revelado que cerca de la mitad de la población padece desnutrición (2) (carencia de alimentos), y otro tanto padece mal nutrición (deficiencia de alimentos); porque la dieta del mexicano es insuficiente, proporciona poca energía al organismo, es baja en proteínas y pobre en varias de las vitaminas y minerales que se necesitan consumir diariamente.

Los carbohidratos y grasas proveen la energía necesaria para el metabolismo corporal; pero la escasez grave en el mundo se hace sentir particularmente en proteínas de buena calidad que suministren los aminoácidos adecuados para que el organismo construya sus propias proteínas. Urge así descubrir nuevos alimentos ricos en ellas y fomentar la producción de los ya existentes para aliviar tal deficiencia porque sin un aumento y una mejoría en la dieta básica para lograr una alimentación balanceada, los países subdesarrollados no pueden tener esperanzas de industrializarse y elevar su nivel socioeconómico.

El alimento para el futuro bien podría ser a base de microorganismos ya que pueden suministrar proteínas, grasas y carbohidratos en grandes cantidades y rápidamente; lo cual está siendo comprobado en varias investigaciones realizadas con ellos.

Tratando de contribuir en algo a la solución de este problema en México, el presente trabajo tiene como propósito producir en cantidades grandes por el método de cultivo sumergido y a bajo costo, el micelio de Pleurotus ostreatus, un hongo con un elevado contenido de proteínas de alta calidad utilizando para ello diferentes medios elaborados con materiales muy baratos para que sea costeable su adición como complemento en forma de polvo a algunos alimentos básicos en la dieta mexicana.

GENERALIDADES

GENERALIDADES

a) Importancia de los microorganismos.

El papel de los hongos en la naturaleza tiene gran importancia para el hombre. Los hongos patógenos son la causa de enfermedades en plantas y animales. Las especies no patógenas incluyen aquellas especies que destruyen materia orgánica en el suelo; los que deterioran y destruyen maderas, textiles, alimentos y otros productos; y aquellos con importancia industrial como los que intervienen en la maduración del queso y en la producción de ácidos orgánicos de valor comercial, preparación de enzimas, salsas y productos relacionados.

La malnutrición protéica es frecuente en aquellos lugares donde la ración alimenticia está principalmente compuesta por cereales o alimentos almidonosos y la gente consume pocos o nada de alimentos protéicos de buena calidad como son la carne, el huevo y la leche. Los niños en edad preescolar, por las altas necesidades nutricionales que impone el crecimiento, sufren más frecuentemente este padecimiento, estado que puede retardar el desarrollo físico y quizá el mental, ya que el cerebro alcanza el 80% de su peso final en los primeros tres años de vida (3), y además aumenta la susceptibilidad a infecciones.

Las proteínas son compuestos de peso molecular elevado, formadas por las diversas uniones de 20 aminoácidos, de los cuales 8 no pueden ser sintetizados por el

hombre, por lo cual reciben el nombre de aminoácidos indispensables o esenciales, - siendo proteínas de buena calidad aquellas que los contienen en cantidad y proporción ideal.

En general, los aminoácidos más escasos en los alimentos son el triptofano, la lisina y la metionina.

Una de las mejores maneras de ayudar a resolver el problema de la desnutrición protéica es aumentando el valor nutricional de las proteínas de una dieta mezclando varios alimentos de diverso tipo, puesto que las carencias de unos se complementan con los excedentes de otros y viceversa, por ello casi siempre una mezcla tiene un valor nutricional mayor que el de los componentes considerados separadamente (4).

Una fuente rica de proteína son los microorganismos, haciendo notar que se reproducen a una razón de crecimiento 500 veces mayor que las cosechas y 10,000 veces más que el ganado (5), siendo esta una enorme ventaja para su uso, como puede observarse del siguiente cuadro.

CUADRO 1

CRECIMIENTO COMPARATIVO DE PLANTAS Y ANIMALES PARA LA OBTENCION
DEL MISMO PESO DE PROTEINA. (5)

<u>ORGANISMO</u>	<u>TIEMPO DE CRECIMIENTO</u>
Levaduras y bacterias	20 a 120 minutos
Microorganismos complejos como algas	2 a 48 Hs.
Cosechas de pastos y alfalfa	1 a 2 semanas
Pollos	2 a 4 semanas
Cerdos	4 a 6 semanas
Ganado	1 a 2 meses

Es conocido que los hongos han sido utilizados con fines alimenticios al parecer desde épocas muy antiguas; su uso con este fin ha desarrollado en la actualidad una verdadera industria, como ejemplos tenemos la producción de champiñones en medios de cultivo especiales y en instalaciones oscurecidas, y el establecimiento de industrias de antibióticos, solventes y proteínas por métodos de cultivo sumergido.

b) Clasificación.

La clasificación de los hongos está basada en gran parte en su ciclo particular de vida y en la morfología de las estructuras reproductoras y esporas producidas.

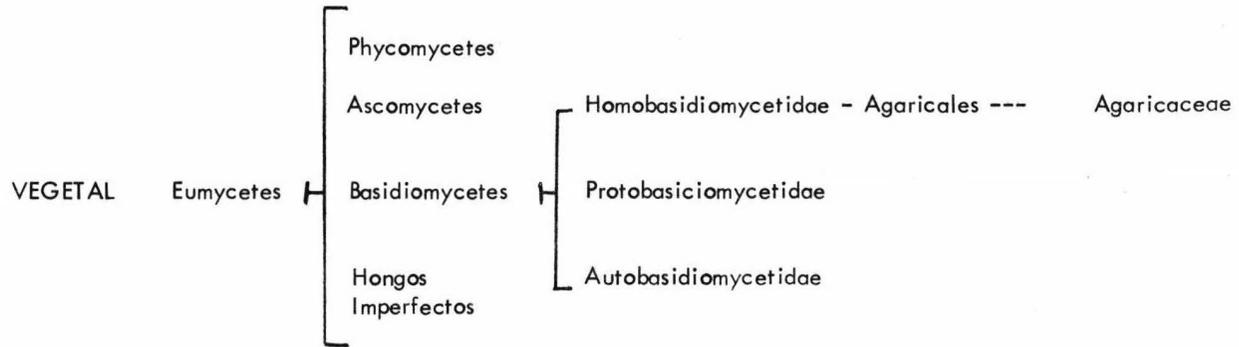
Los hongos verdaderos son miembros de la División del Reino Vegetal conocida como Thallophyta. No poseen clorofila y no están diferenciados en hojas, tallo y raíces verdaderos. Están ampliamente distribuidos, especialmente en el suelo.

Los hongos verdaderos pueden ser divididos en 4 clases principales; Los Phycomycetes, que poseen micelio no septado; los Basidiomycetes, que tienen micelio septado y forman esporas sexuales exogenadamente sobre las hifas y endogenadamente en sacos; los Ascomycetes que tienen micelio septado y forman esporas sexuales endogenadamente en sacos; y los Hongos Imperfectos, que poseen micelio septado pero frecuentemente no producen esporas sexuales.

b.1) Pleurotus ostreatus .

Sinónimos: Agaricus brumalis; Pleurotus insignior; Pleurotus parthenopeius; Dendrosarios juglandi; Pleurotus avellanus; Pleurotus glandulosus (7) .

REINO DIVISION CLASE SUBCLASE ORDEN FAMILIA (#)



(#)

TRIBU	GENERO	ESPECIE
Agariceae	<u>Pleurotus</u>	<u>ostreatus</u>

CUADRO No. 2. Clasificación taxonómica de Pleurotus ostreatus, según el Sistema de Engler - Dills

" Sylabus der Pflanzenfamilien ", Berlín (1936) (6).

Se conoce como seta ostión, nombre dado probablemente al parecido de su parte superior a una concha de ostión; "Oreja de Cazahuate"; "Hongo de Cazahuate"; "Cazahuate" (Tepoztlán Mor.); "Oreja Blanca" (Lagunas de Zempoala, Edo. de Méx., Huautla de Jiménez, Oax.); "Hongo de Maguey (Calacuaya Edo. de Méx., San Lorenzo Zacamulpa, Edo. de Mex.); "Hongo de Encino" (Te huacán, Pue.). (8)

Es muy variable con respecto a su forma y coloración.

b.2) Habitat

Estos hongos viven en troncos y codos, en maderas muertas o en las hoquedades de árboles vivos en los bosques, desde otoño, hasta bien entrado el invierno. Crece en la zona templada de los hemisferios Norte y Sur. También es posible que haya algunas formas tropicales, por lo que puede considerársele cosmopolita.

b.3) Uso

Excelente hongo comestible, de sabor agradable preparado en cualquier forma; adecuado para encurtirse.

c) Cultivo Sumergido

La producción de micio de hongos en cultivo sumergido para uso como-

alimento o en productos alimenticios es relativamente reciente comparada con la antigua industria que produce cuerpos fructificantes de hongos o esporóforos sobre compostas en camas.

La idea de producir micelio de hongos en medios líquidos en tanques con aireación y bafleados surgió, de los proceso de fermentación de Penicilina y otros antibióticos durante la Segunda Guerra Mundial. De esta manera, un hongo comestible podría ser producido en cualquier parte durante todo el año, usando como sustrato materiales de bajo costo como son los desperdicios de las industrias: azucarera, lechera y cátrica. Además, el producto seco puede ser constante y adecuado para usarse en alimentos formulados y deshidratados, tales como sopas y salsas instantáneas (9).

c.1) Técnicas de Obtención de Cultivo Sumergido.

Los métodos de cultivo sumergido para crecimiento de micelio usan recipientes con aireación y agitación para obtener condiciones más uniformes que en un cultivo estático, y consecuentemente rendimientos más altos de micelio.

Los métodos para cultivo sumergido en escala de laboratorio más comúnmente empleados caen en dos grupos: sin agitación mecánica y con agitación mecánica (10).

c.1.1.) Sin Agitación Mecánica.

Este método se basa en pasar corrientes vigorosas de aire a través del cul-

tivo líquido, para prevenir la formación de una película superficial y mantener las partículas de crecimiento en movimiento constante dentro del medio de cultivo.

c.1.2.) Con Agitación Mecánica.

Son métodos que requieren equipo más complicado y caro; Existen dos tipos de agitación mecánica: por propulsores y por máquinas agitadoras.

c.1.2.1.) Por Propulsores

Este tipo de agitación en medios de cultivo a escala de laboratorio es el más incómodo y difícil de operar, ya que utiliza un motor de alta velocidad que gira el propulsor ocasionando una agitación más o menos violenta, lo cual teóricamente es la mejor manera de asegurar una aireación eficiente. La dificultad mayor de este tipo de agitador a escala de laboratorio es el lograr una conexión entre el propulsor y el recipiente de fermentación sin alterar la esterilidad del medio de cultivo durante el período de crecimiento. La ventaja principal es que previene la acumulación de grandes masas de micelio manteniéndolo en pequeñas partículas distribuidas homogéneamente en el medio de cultivo.

c.1.2.2.) Por máquinas agitadoras.

A escala de laboratorio, estos métodos de agitación son los más versátiles y simples de operar. Su ventaja mayor, que ningún otro método posee, es que provee

un ambiente físico y uniforme reproducible para mayor número de experimentos y - estandariza el complejo aireación-agitación que es fundamental en las actividades metabólicas del cultivo.

En general, se usan dos tipos de máquinas agitadoras: el tipo rotatorio y el tipo recíproco.

c.1.2.2.1) Agitadores de Tipo Rotatorio.

Tienen una base que contiene los matraces sujetos individualmente con resortes o de alguna otra forma y que describe una órbita circular en plano horizontal preferiblemente de radio variable (1 - 5 cm.) y una velocidad de 100 a 400 -- r.p.m. regulada por un motor colocado abajo de ella. La aireación se lleva a cabo porque el oxígeno de la atmósfera atraviesa el tapón de algodón y se disuelve en - la fina capa del medio líquido provocada por la fuerza centrífuga.

c.1.2.2.2.) Agitadores de Tipo Recíproco.

Tienen una base que mueve los matraces linealmente en forma horizontal con una velocidad de 60 a 120 golpes por minuto. Este tipo de agitador es más simple mecánicamente y más barato (12).

c.2.) Factores Importantes para una Fermentación Industrial.

La producción de micelio de hongos es similar a otras fermentaciones co-

merciales en las que la selección y mantenimiento de cepas adecuadas del organismo son factores clave en la obtención de un producto de calidad uniforme.

Aunque hay muy poca información en la literatura a este respecto, los factores más importantes en una fermentación son los siguientes:

c.2.1.) Un microorganismo seleccionado, eficiente, con el que se lleve a cabo la fermentación.

c.2.2.) Un medio de cultivo de composición química satisfactoria.

c.2.3.) Condiciones físicas en el fermentador para propiciar el crecimiento y acumulación del producto.

c.2.4.) Un método para la recuperación del producto en líquido de fermentación al final del ciclo de fermentación.

c.2.5.) Una metodología adecuada para analizar el producto final deseado.

c.3) Factores que afectan el Cultivo Sumergido y Materias Primas.

c.3.1.) Fuentes energéticas.

Distintos tipos de carbohidratos no solo contribuyen con átomos de Carbono, sino sirven como la mejor fuente de energía en la fermentación.

Es de notarse, que un buen número de materiales de desecho pueden utilizarse con este fin, por ejemplo, jugo de tallos de espárrago, suero de queso, des-

perdicios del enlatado del maíz y calabaza, desperdicios de cítricos, licor sulfítico, vinasa, etc.

La concentración de sustrato para crecimiento micelial varía ampliamente dependiendo del organismo y de la pureza de la fuente de carbohidrato. En algunos casos, solo una fracción del carbohidrato total presente en el sustrato puede ser utilizado por el micelio. En general, las concentraciones de carbohidrato purificado están en el rango de 2 a 10 % y es generalmente el componente del medio -- más utilizable.

c.3.1.1.) Melaza

Es la fuente de carbohidratos más barata; es un subproducto de las industrias azucareras del maíz, remolacha y caña. Las melazas son las "aguas madres" de las cuales se ha removido por cristalización la mayor parte del azúcar. Su composición varía no solamente de ingenio a ingenio sino de año a año. Si la producción de células es el único factor a considerar, esta variabilidad no es muy importante, pero si este material se requiere por ejemplo, para la producción de ácido cítrico, la variabilidad es muy importante y afecta el rendimiento (12). En el cuadro número 3 se reporta un análisis químico de las melzas.

c.3.2.) Fuente de Nitrógeno.

El hongo debe tener también átomos de nitrógeno para crecer. En algunas

fermentaciones, se suministra adicionándolo al medio como sal inorgánica, por ejemplo, un compuesto simple y muy barato del cual el microorganismo puede extraer fácilmente el nitrógeno es el sulfato de amonio. Normalmente se usan concentraciones de menos de 0.5% a 1%, porque niveles más altos son extremadamente tóxicos a muchos de los microorganismos fermentadores. En general, fuentes de nitrógeno satisfactorias son sales de amonio, nitratos, proteínas, peptonas, aminoácidos, urea y licor de cocimiento de maíz.

CUADRO No. 3

ANALISIS DE MELAZAS (como %) (12)

	<u>Remolacha</u>	<u>Caña</u>	<u>Caña Refinada</u>
Sólidos Totales	78 - 85	78 - 85	78 - 85
Azúcar Total (como invertido)	48 - 58	50 - 58	70 - 86
N	0.2 - 2.8	0.08 - 0.5	0.05 - 0.25
P_2O_5	0.02 - 0.01	0.009 - 0.07	0.03 - 0.22
CaO	0.15 - 0.7	0.15 - 0.8	0.15 - 0.35
MgO	0.01 - 0.1	0.25 - 0.8	0.12 - 0.25
K_2O	2.2 - 2.45	0.8 - 2.2	0.2 - 0.7
SiO_2	0.1 - 0.5	0.05 - 0.3	0.07 - 0.25
Al_2O_3	0.005 - 0.06	0.01 - 0.04	0.002 - 0.01
Fe_2O_3	0.001 - 0.02	0.001 - 0.01	0.001 - 0.005
C	28 - 34	28 - 33	28 - 36
Cenizas Totales	4 - 8	3.5 - 7.5	1.8 - 3.6

c.3.2.1) Licor de Cocimiento de Maíz.

Es probablemente la fuente de nitrógeno más universalmente usada, es un subproducto de la obtención de glucosa y almidón a partir del maíz que al ser tratado con solución diluida de SO_2 extrae del grano materiales nitrogenados, minerales y vitaminas; este líquido se concentra por evaporación a 50 - 55% de sólidos totales (11). En el cuadro número 4 se reporta el análisis químico del Licor de Cocimiento de Maíz.

c.3.2.2.) Alfalfa.

La alfalfa es un forraje muy apreciado por su alto rendimiento por hectárea, por su fácil adaptación a muchos climas y suelos, por su alto contenido de proteína, carotenos, minerales, y especialmente porque puede ser cortada repetidamente, lo que da un suministro seguro durante un período bastante largo del año (13).

c.3.2.3) Cola

Es un producto nitrogenado amorfo obtenido de residuos animales. Es producida por una sustancia llamada colágena que por una larga cocción con agua dan soluciones de cola, es decir, todas las porciones membranosas del cuerpo animal y la oseína que es la sustancia orgánica de los huesos que queda después de tratar a estos con ácidos diluidos, en particular al HCl .

Los componentes de la cola de carpintero común y corriente son la gluti-

na (gelatina libre de todas las mezclas) y la condrina (de cartílagos), así como -- sus productos de descomposición. Aunque su estructura es desconocida se cree que contenga grupos de unidades polipeptídicas (14). Esta es una forma orgánica compleja de nitrógeno, subproducto de otra industria, cuesta considerablemente más que las sales que contienen nitrógeno; pero tiene la ventaja de suministrar al microorganismo con varios paquetes preconstruídos conteniendo nitrógeno, tales como aminoácidos y ácidos nucleicos, junto con vitaminas y otros estimulantes del crecimiento.

c.3.3) Minerales y Elementos Traza

Humfeld (15) establece que los elementos P, K, S, Mg, Ca, Fe, Mn, Zn, Cu y Co son importantes para el crecimiento de ciertos hongos; además comprobó que la concentración de sales inorgánicas en el medio debe ser limitada a niveles requeridos para el crecimiento y para prevenir el desarrollo de un sabor amargo en el micelio de Agaricus campestris. Sin embargo, la concentración de constituyentes inorgánicos específicos en el medio de crecimiento puede variar considerablemente cuando se incorporan al medio materiales orgánicos complejos de composición variable, tales como melazas o licor de cocimiento de maíz.

CUADRO No. 4

COMPOSICION DEL LICOR DE COCIMIENTO DE MAIZ (como % p/v) (12)

CONSTITUYENTE	MUESTRA A	MUESTRA B
Sólidos Totales	52	50.7
Nitrógeno Total	4.3	3.7
Acidez como ácido láctico	15	17.4
Azúcares Reductores libres	5.6	--
Azúcares Reductores Totales (después de hidrólisis)	6.8	<0.2
Dióxido de Azufre	--	0.067
Cenizas	7.9	--
Gravedad específica	1.25	1.22
pH	4.0	3.9

CUADRO No. 5

AMINOACIDOS PRESENTES EN EL LICOR DE COCIMIENTO DE MAIZ .

(Rhodes y Fletcher , 1966). (12)

AMINOACIDO	% DE NITROGENO
Alanina	25
Arginina	8
Acido Glutámico	8
Leucina	6
Prolina	5
Isoleucina	3.5
Treonina	3.5
Valina	3.5
Fenilalanina	2
Metionina	1
Cistina	1

c.3.4.) Temperatura.

Aunque algunos hongos crecen en un rango amplio de temperatura, de -- 22 a 32° C, es de gran importancia encontrar la temperatura más adecuada para cada uno, ya que de ello depende la obtención de velocidades mayores de crecimiento y por lo tanto mejores rendimientos.

c.3.5.) pH

El rango de pH más favorable para la mayoría de los hongos está entre 5 y 7; el uso de un pH ligeramente ácido es aconsejado para inhibir la contaminación bacteriana (15).

En general, cuando se usan sales de amonio como fuente de nitrógeno, el pH disminuye durante el crecimiento micelial como resultado de la asimilación del ión amonio y los efectos consecuentes de aniones ácidos libres del medio tales como cloruros, sulfatos o fosfatos, y porque la mayoría de los microorganismos producen cantidades considerables de ácidos orgánicos de los azúcares del medio. Si estos ácidos no son neutralizados, el medio se vuelve tan ácido que detiene el crecimiento de los microorganismos antes de alcanzar el rendimiento máximo. El límite inferior de estos valores de pH depende de la acción amortiguadora de los constituyentes del medio y del micelio (autólisis); por lo cual el carbonato de calcio tiene un doble papel, por un lado contribuyendo con iones calcio y por otro al regular cambios en la acidez.

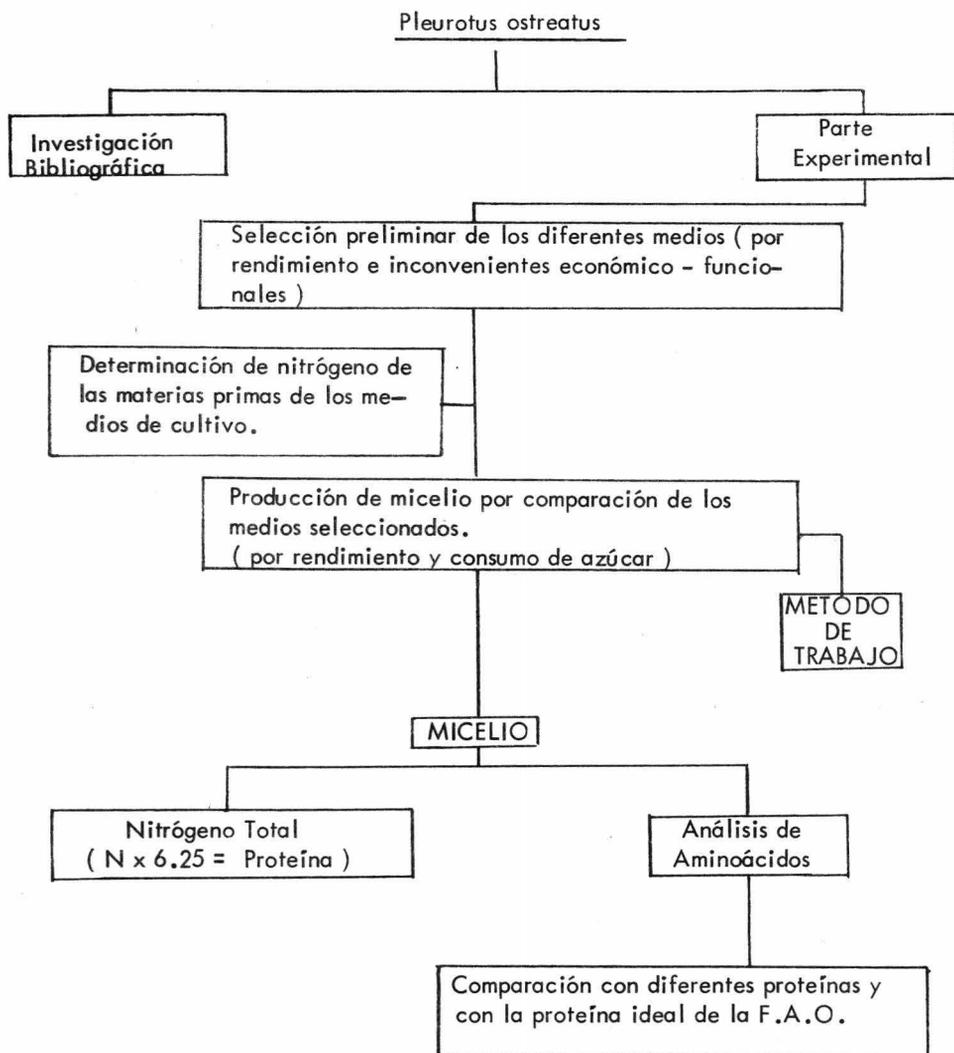
c.3.6) Aireación y Agitación.

Desgraciadamente, solo unos cuantos reportes especifican las condiciones de aireación y agitación empleadas en el cultivo de micelio de hongos, ya que es difícil reproducir el resultado de otros experimentos o elevar la escala de los datos de laboratorio a operaciones de planta - piloto y operaciones a escala comercial, cuando las proporciones de aireación se dan en términos cualitativos tales como suave o intenso, o aún en términos de volúmenes de aire por volumen de medio por unidad de tiempo.

Idealmente, se debería especificar la geometría del recipiente y las proporciones de aireación expresadas como mM O_2 por litro por hora (16).

MATERIALES Y METODOS

DIAGRAMA No. 1

DIAGRAMA GENERAL DEL DESARROLLO DEL TEMA

Material Biológico : Cepa de Pleurotus ostreatus

Equipo :

Cristalería en general

Matraces Erlenmeyer de 300 ml. bafleados según Solomons (12)

Equipo para Microkjeldahl

Autoclave Marsh Instrument Co. (160° C - 1.5 Kg. /cm²)

Balanza Analítica Mettler

Potenciómetro Beckmann con electrodo de vidrio

Agitador Rotatorio Leland Motor de 24 matraces

Cutler - Hammer de 40 matraces

Bomba de vacío H. O. Velman

Prensa Hidráulica

Estufa Robertshaw (0° - 300° C)

Baño María. Precision Scientific Co. (115 volts - 2000 watts)

Centrífuga Wifug (0 - 9000 r.p.m.)

Microscopio Ernest Leitz Wetzlar

Licuada Osterizer

Separador Westfalia 12,000 r.p.m.

Autoanalizador de Aminoácidos: Beckmann Mod. 116. Automático

MEDIOS DE CULTIVOI. - MEDIO DE CONSERVACION

Licor de Cocimiento de maíz.....	2%
Harina de Soya.....	2%
Glucosa.....	2%
Agar.....	2%
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

pH 5.6

Esterilizar a 121° C durante 15 min.

II. - MEDIO DE PROPAGACION

Melaza.....	5%
Licor de Cocimiento de Maíz.....	1%
Sulfato de Amonio.....	0.2%
Carbonato de Calcio.....	0.5%
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.	100 ml.

pH = 5.6

Esterilizar a 121° C durante 15 min.

MEDIOS DE FERMENTACION

Los siguientes medios de fermentación se preparan con melaza limpia (L) dando un rango de 1.4 - 1.8 g% de sacarosa determinados como azúcares reductores y 1500 mg de Nitrógeno por litro (17).

(L) La melaza normal se diluyó con agua destilada hasta una densidad de $\pm 70^{\circ}$ Brix, se colocó en un recipiente adecuado para ser autoclaveada durante 15 minutos a 121° C con el fin de precipitar impurezas; una vez fría se colocó en el separador de donde se recolectó un líquido que se ajustó a 60° Brix.

III.- MEDIO DE COLA

Licor de Cocimiento de Maíz.....	1%
Carbonato de Calcio.....	0.5%
Melaza (L).....	4.1 ml.
Cola (seca 2 Hs. a 90° C).....	1.0%
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.	100 ml.

pH = 5.6

Esterilizar a 121° C durante 15 min.

La cola se disuelve previamente en un poco del agua de mar 1 : 3 en baño maría.

IV.- MEDIO DE SULFATO DE AMONIO

Licor de cocimiento de Maíz.....	1 %
Carbonato de Calcio.....	0.5 %
Melaza (L).....	4.1 ml.
Sulfato de Amonio..... (Seco a 200° C por 3 Hs)	0.7078%
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.....	100 ml.

pH = 5.6

Esterilizar a 121° C por 15 min.

V.- MEDIO DE ALFALFA (de forraje)

Licor de Cocimiento de Maíz.....	1 %
Carbonato de Calcio.....	0.5 %
Melaza (L).....	4.1 ml.
Alfalfa (Seca a 70 - 80° C por 2 hs. 62.2 % de humedad).....	4 %
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.	100 ml.

pH = 5.6

Esterilizar a 121° C durante 15 min.

La alfalfa se seca y se pulveriza en mortero.

VI.- MEDIO DE ARROZ

Licor de Cocimiento de Maíz.....	1 %
Carbonato de Calcio.....	0.5 %
Melaza (L).....	4.1 ml.
Arroz quebrado (Seco a 70 - 80° C 2 hs.).....	3 % (#)
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.	100 ml.

pH = 5.6

Esterilizar a 121° C durante 15 min.

(#) Sin tomar en cuenta su contenido de nitrógeno.

Se pulveriza antes de secarse.

VII.- MEDIO DE LICOR DE COCIMIENTO DE MAIZ

Licor de Cocimiento de Maíz.....	3.4%
Carbonato de Calcio.....	0.5%
Melaza (L).....	4.1 ml.
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.	100 ml.

pH = 5.6

Esterilizar a 121° C durante 15 min.

Tiempo de incubación máximo : 5 días (Medios del III al VII)

Los siguientes Medios de Fermentación se preparan con melaza normal -- pura (P), que da un rango de 4.5 - 6.0 g% de sacarosa (19) determinados como azúcares reductores y aproximadamente 1500 mg de Nitrógeno por litro (17).

VIII.- MEDIO DE COLA 1%

Licor de Cocimiento de Maíz.....	1 %
Carbonato de Calcio.....	0.5 %
Melaza (P).....	10 %
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.	100 ml .
Cola	1 %

pH = 5.6

Esterilizar a 121° C durante 15 min.

La cola se disuelve en parte del agua de mar 1 : 3 en baño maría.

IX.- MEDIO DE COLA 2.5 %

Licor de cocimiento de Maíz.....	1 %
Carbonato de Calcio.....	0.5 %
Melaza (P).....	10 %
Cola (Seca a 90° C por 2 hs.).....	2.5 %
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.	100 ml .

pH = 5.6

Esterilizar a 121° C durante 15 min.

La cola se disuelve en parte del agua de mar 1 : 3 en baño maría.

X.- MEDIO DE ALIMENTO PARA GANADO

Licor de Cocimiento de Maíz.....	1 %
Carbonato de Calcio.....	0.5 %
Melaza (P)	10 %
Alimento para Ganado.....	2 %
(Seco a 90° C por 2 hs.)	
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.	100 ml.

pH = 5.6

Esterilizar a 121° C durante 15 min.

XI.- MEDIO DE ALFALFA FRESCA

Licor de Cocimiento de Maíz.....	1 %
Carbonato de Calcio.....	0.5 %
Melaza (P).....	10 %
Alfalfa Fresca.....	8 %
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.	100 ml.

pH = 5.6

Esterilizar a 121° C durante 15 min.

La alfalfa fresca se corta en pequeños trozos y se licúa con un volumen pequeño de agua de mar 1 : 3.

Tiempo de incubación 10 a 30 días.

XII.- MEDIO DE JUGO DE ALFALFA 5 %

Licor de cocimiento de Maíz.....	1 %
Carbonato de Calcio.....	0.5 %
Melaza (P)	10 %
Jugo de Alfalfa.....	5 ml.
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.	100 ml.

pH = 5.6

Esterilizar a 121° C durante 15 min.

El jugo se obtiene exprimiendo la alfalfa fresca en una prensa hidráulica.

XIII.- MEDIO DE JUGO DE ALFALFA 20 %

Licor de Cocimiento de Maíz	1 %
Carbonato de Calcio	0.5 %
Melaza (P)	10 %
Jugo de Alfalfa	20 ml.
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.	100 ml.

pH = 5.6

Esterilizar a 121° C durante 15 min.

El jugo se obtiene exprimiendo la alfalfa fresca en una prensa hidráulica.

Tiempo de incubación hasta 10 días (Medios del VII al XIII)

XIV.- MEDIO DE ALFALFA FRESCA - COLA

Licor de Cocimiento de Maíz.....	1 %
Carbonato de Calcio	0.5 %
Melaza (P)	10 %
Alfalfa Fresca	4 %
Cola	0.5 %
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.	100 ml .

pH = 5.6

Esterilizar a 121° C durante 15 min.

La cola se disuelve en parte del agua de mar 1 : 3 en baño maría, y la alfalfa fresca se corta en trozos pequeños y se muele en licuadora con una pequeña cantidad de agua de mar 1 : 3.

XV.- MEDIO DE JUGO DE ALFALFA - COLA

Licor de cocimiento de maíz.....	1 %
Carbonato de Calcio	0.5 %

Melaza (P)	10 %
Jugo de Alfalfa	10 ml .
Cola	0.5 %
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.....	100 ml .

pH 5.6

Esterilizar a 121° C durante 15 min.

El jugo se obtiene exprimiendo la alfalfa fresca en una prensa hidráulica.

La cola se disuelve en parte del agua de mar 1 : 3 en baño maría.

Tiempo de incubación hasta 30 días (Medios XI, XIV y XV).

XVI.- MEDIO DE BAGAZO DE CAÑA

Licor de cocimiento de maíz	1 %
Carbonato de Calcio	0.5 %
Melaza (P)	10 %
Bagazo de Caña	1 %
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.	100 ml .

pH = 5.6

Esterilizar a 121° C durante 15 min.

El bagazo de caña se micropulverizó.

XVII.- MEDIO DE ASERRIN

Licor de Cocimiento de Maíz	1 %
Carbonato de Calcio	0.5 %
Melaza (P)	10 %
Aserrín.....	1 %
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.	100 ml.

pH = 5.6

Esterilizar a 121° C durante 15 min.

XVIII.- MEDIO DE CONEJAZA

Licor de Cocimiento de Maíz	1 %
Carbonato de Calcio	0.5 %
Melaza (P)	10 %
Conejaza	1 %
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.	100 ml.

pH = 5.6

Esterilizar a 121° C y durante 15 minutos.

XIX.- MEDIO DE PAPEL PERIODICO

Licor de cocimiento de maíz	1 %
-----------------------------------	-----

Carbonato de Calcio	0.5 %
Melaza (P)	10 %
Papel Periódico	0.5 %
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.	100 ml .

pH = 5.6

Esterilizar a 121° C durante 15 min.

el papel periódico se micropulverizó.

XX.- MEDIO DE ALMIDON

Licor de Cocimiento de Maíz	1 %
Carbonato de Calcio	0.5 %
Melaza (P)	10 %
Almidón	1 %
Agua de Mar 1 : 3 c.b.p.	100 ml .

pH = 5.6

Esterilizar a 121° C durante 15 min.

Tiempo de incubación hasta 10 días (Medios del XVI - XX).

MÉTODOS ANALÍTICOSDETERMINACION DE NITROGENO TOTAL

Se hizo por el método de Microkjeldahl (18) (Proteína = $N \times 6.25$).

Se hacen las siguientes observaciones al método:

- 1.- Pulverizar la muestra
- 2.- Ponerla a peso constante antes de pesarla
- 3.- Hacer lentamente la digestión.
- 4.- Lavar el aparato de destilación después de cada determinación.

DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES.

La determinación de azúcares reductores totales, previa hidrólisis con - HCl concentrado (19) se llevó a cabo por el método de Underkoffler (20), que por muchas investigaciones su reactivo y procedimiento se han encontrado enteramente satisfactorios para el análisis de rutina de azúcares reductores en medios de fermentación.

Es una modificación del método de Shaffer - Somogy (21) para determinar un máximo de 11 mg de azúcar en 5 ml. de solución.

REACTIVOS

- 1.- Una solución conteniendo 12.5 % de KI y 25 % de $K_2C_2O_4 \cdot H_2O$

- 2.- Una solución de H_2SO_4 7.5 N
- 3.- Solución estándar de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.05 N
- 4.- Solución indicadora de almidón al 1 % en solución saturada de NaCl.
- 5.- Reactivo U/G (Underkoffler - Guymon)

REACTIVO U - G

<u>Componentes</u>	<u>Peso en g/litro</u>
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	37.5
$\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (Sal de Rochella)	125.0
Na_2CO_3 (anhidro).....	53.0
KI.....	1.0
Na_2SO_4 (anhidro).....	50.0
KIO_3 (exactamente).....	3.56665
NaOH Solución saturada para ajustar en el potenciómetro el pH a 9.48	

PROCEDIMIENTO.

Se toman con pipeta volumétrica 5 ml. de reactivo U - G y se colocan en tubos de ensaye de 25 x 10 mm.; se colocan 5 ml. de la solución problema dentro del tubo mezclando con agitación. Se tapa el tubo con un tapón de hule provisto con un pequeño tubo capilar. En este caso, se modificó la técnica, usándose frascos de vidrio de 250 ml. de capacidad con un tapón de rosca de bakelita, el cual -

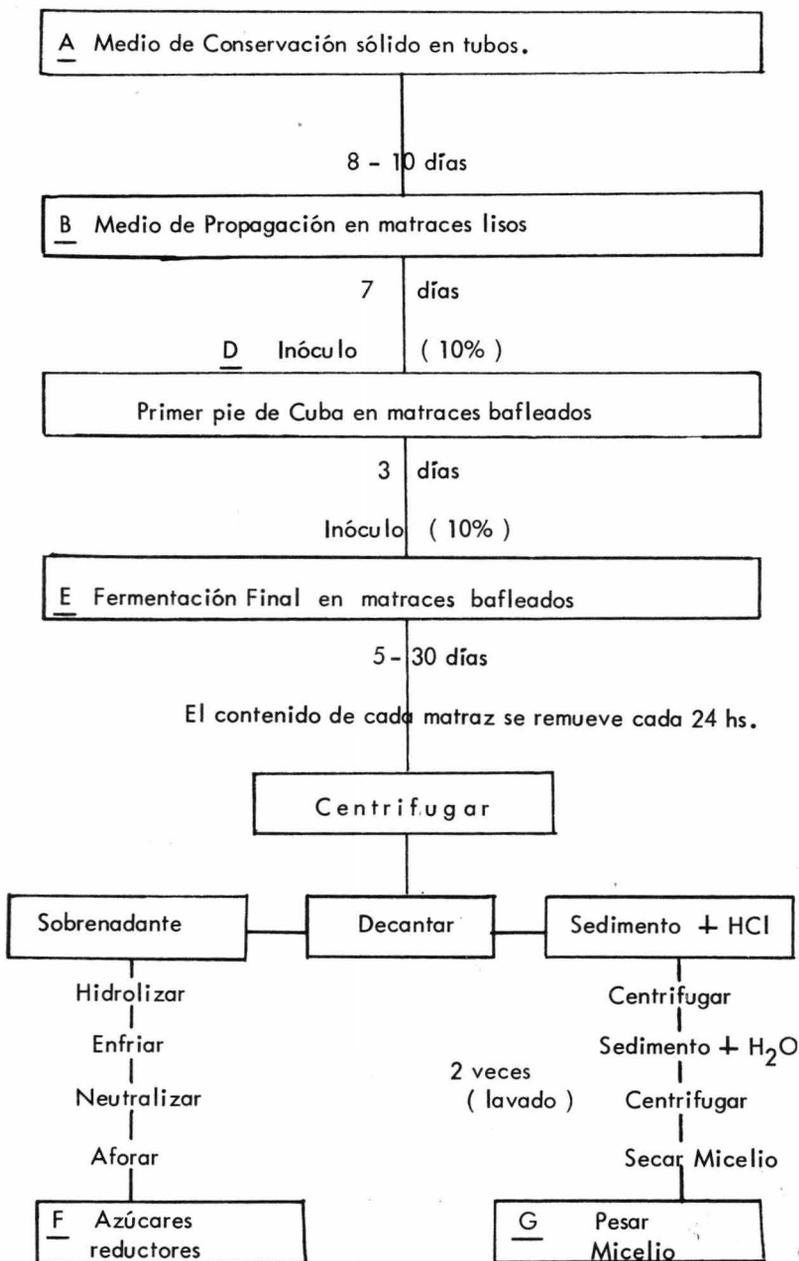
se inserta girándolo ligeramente; utilizando 1 ml. de solución problema neutralizada y 4 ml. de agua destilada.

Los frascos se colocan en un baño de agua a ebullición por 30 min. Se enfrían por inmersión en agua fría a $\pm 30^{\circ}$ C. Se adicionan 2 ml. de la solución de $\text{KI} - \text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ y se mezcla por agitación. Cuidadosamente se adicionan 2 ml. de H_2SO_4 7.5 N resbalando lentamente por las paredes para evitar el desprendimiento de CO_2 que significaría pérdida de yodo. Según Underkoffler, el mejor método para ello es inclinar el tubo de manera que el líquido forme una superficie lo más grande posible y entonces permitir que el ácido resbale por las paredes y mezclar ligeramente en esa posición hasta una evolución violenta de CO_2 , siendo esta una de las razones por las cuales se usaron los frascos mencionados. Se deja el tiempo necesario para permitir la disolución total de óxido cuproso y la clarificación de la solución. Finalmente, el exceso de yodo es titulado con la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.05 N usando el indicador de almidón cerca del punto final. Por ser inestables las soluciones de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ menores de 0.01 N (22), esta solución se va lora diariamente.

Para obtener una equivalencia directa de los ml. de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastados en la muestra problema a mg por ml de azúcares reductores del problema es necesaria la construcción de una curva estándar, para lo cual es necesario determinar un blanco que se corre de la misma manera utilizando 1 ml. de agua como problema. Esta curva fue preparada utilizando sacarosa hidrolizada y neutralizada.

Para obtener una curva de pendiente positiva, los ml. de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastados en el problema son restados a los ml. de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastados en el blanco.

DIAGRAMA GENERAL DEL METODO DE TRABAJO



MÉTODOS DE TRABAJO

A.- Conservación de la cepa.

Con el fin de mantener el cultivo vivo, puro y en crecimiento típico y reconocible (23); se prepara el medio I, se distribuye en tubos de ensayo de 15 x 150 mm. inclinándose después de su esterilización; una vez sólidos y probada su esterilidad incubándose en estufa a 28° C por 24 hs. mínimo, se inoculan con una asada de la cepa, se incuban a 28° C durante 8 - 10 días. Haciéndose una resiembra mensual.

B.- Preparación del inóculo

Se prepara el medio II y se coloca en matraces Erlenmeyer bafleados en cantidades de 50 ml., se controla su esterilidad incubándose en estufa a 28° C por 24 hs. Mínimo. Los matraces se inoculan con varias asadas obtenidas de los tubos anteriores y se incuban en agitación durante 7 días. Esta forma de inoculación es factible en este caso porque es a nivel de matrás; ya que es difícil obtener grandes cantidades de inóculo para fermentaciones industriales con hongos filamentosos, debido a que el estado vegetativo de estos hongos consiste de micelio cuyas hifas están entrelazadas formando una masa de tejido compacto. Por lo cual generalmente se utiliza como inóculo de estas fermentaciones una suspensión de esporas, ya que frecuentemente son unicelulares y pueden ser dispersadas a través de grandes cantidades de-

medio de fermentación ocasionando esto muchos focos de inóculo (24).

C.- Preparación del medio de fermentación (Medio III al XX).

Según Humfeld (25) el micelio seco se obtiene con mayor contenido de nitrógeno cuando el medio de crecimiento le provee mayor cantidad del mismo, por lo cual se vió la necesidad de determinar el contenido de nitrógeno por el Método de Microkjeldahl en: cola, alfalfa, arroz y alimento para ganado; de las otras sustancias usadas como fuente de nitrógeno, se conocía su valor; comprobando esos resultados con la determinación de harina de soya y gérmen de trigo de valores conocidos por el mismo método.

Se prepara suficiente cantidad del medio en estudio para distribuirse 50 ml. en cada matríz de los necesarios para destinar 3 de ellos como Pie de Cuba que servirán de inóculo para los matraces restantes que están destinados para la fermentación final. La esterilidad de todos ellos fué previamente controlada en estufa a 28° C por 24 hs. mínimo.

D.- Inoculación.

El uso de esporas como inóculo es un método insuficiente si se desea una fermentación rápida (porque las esporas deben crecer y germinar). Una técnica de inoculación mucho mejor es empleando una suspensión de trozos de micelio vegetativo que ha sido fragmentado bajo condiciones estériles (24). El inóculo así prepara-

do consiste de medio vegetativo activo que puede empezar a crecer y fermentar tan pronto como se introduce en el fermentador.

Para este efecto se homogeneiza el cultivo en licuadora en condiciones de esterilidad durante 10 segundos. De este homogeneizado se toman con una pipeta invertida 5 ml. de inóculo (10%) que se descarga en la pared del matr az con el medio de fermentación.

E. - Fermentación Final.

Para tener mayor confiabilidad en los resultados y previniendo el riesgo a una contaminación, se inoculan los matraces por duplicado de la manera anteriormente descrita, se colocan en la máquina agitadora y se incuban a una temperatura de 28  C. Inmediatamente se retiran 2 de los matraces inoculados que servirán como testigos y 2 cada 24 hs. El contenido de cada matr az se centrifuga a 4,000 r.p.m. - durante 20 min., se decanta y se determinan azúcares reductores totales en el sobrenadante. El sedimento, constituido por micelio y esporas es conservado para la determinación de la biomasa.

F. - Determinación de Azúcares Reductores Totales

F.1) Hidrólisis

Para esta determinación es necesaria una hidrólisis previa con HCl (19) - (26) para lo cual el sobrenadante se coloca en un matr az Erlenmeyer de -

125 ml. adicionándosele 1 ml. de HCl concentrado y se calienta a 70°C durante 10 min.

F.2) Inmediatamente se enfría en agua.

F.3) Se filtra, ya que este proceso provoca turbiedad en el líquido y una clarificación es recomendada para mayor precisión (20).

F.4) Neutralizar el papel tornasol con solución de sosa.

F.5) Aforar una alícuota de este líquido a un volumen cuya concentración -- quede dentro de la sensibilidad del método.

F.6) Determinar azúcares reductores en esta solución por el método de Underkoffler.

F.7) Comparar los resultados con una curva estándar de sacarosa siguiendo los pasos F.1 a F.6

G.- Micelio Producido.

G.1) El sedimento se suspende en solución de HCl al 1% con objeto de eliminar el carbonato de calcio presente.

G.2) Centrifugar a 4,000 r.p.m. durante 15 min. tirando el sobrenadante.

G.3) El sedimento vuelve a suspenderse en agua destilada.

G.4) Centrifugar a 4,000 r.p.m. durante 15 min.

G.5) Repetir el lavado y la centrifugación.

a vacío la suspensión.

El sedimento a 50 - 60° C por 60 min.

El sedimento (Micelio + residuos sólidos no fermentados) .

RESULTADOS Y DISCUSION

MATERIA PRIMA	(%) NITROGENO	(%) PROTEINA
Cola	15.748	98.425
Alfalfa	4.02	25.125
Arroz	1.2	7.5
Alimento para Ganado	7.25	45.31

TABLA No. 1. Composición de nitrógeno y proteína (N x 6.25) de las materias primas utilizadas. Determinación hecha por el método Microkjeldahl en base seca.

MEDIO DE CULTIVO	(%) NITROGENO TOTAL	% PROTEINA
Conservación (I) (1,280 mg/litro)	2.3	14.375
Cola 1% (VIII) (1,500 mg/ litro)	6.32	39.5

TABLA No. 2. Contenido de nitrógeno y proteína (N x 6.25) del micelio de de Pleurotus ostreatus cultivado en medio de cultivo con diferente contenido de nitrógeno.

Horas de Cultivo	Sacarosa (%)		Rendimiento de Micelio g.de micelio por 100 g. de sacarosa			Proteína (%)	Eficiencia Protéica g/100 g. de Sacarosa	
	Inicial	Utilizada	g/litro	Inicial	Utilizada		Inicial	Utilizada
0	1.866	0	1.5					
24	1.866	0.716	3.55	19.02	49.5	39.5	751	1955
48	1.866	1.366	14.722	78.8	107.7	39.5	3112	4254
72	1.866	1.316	16.580	88.8	125.9	39.5	3507	4973
96	1.866	1.516	18.058	96.7	119.1	39.5	3819	4704
120	1.866	1.446	19.316	103.5	133.5	39.5	4088	5273
168	1.866	1.329	19.878	106.5	149.5	39.5	4206	5905

TABLA No. 3. Rendimientos de micelio de *Pleurotus ostreatus* y Eficiencias de utilización del Medio de Cola 1% (III).

Horas de Cultivo	Sacarosa (%)		Rendimiento de Micelio g. de micelio por 100 g. de sacarosa			Proteína (%)	Eficiencia protéica g/100 g. de sacarosa	
	Inicial	Utilizada	g/litro	Inicial	Utilizada		Inicial	Utilizada
0	1.421		1.396					
24	1.421		3.210	22.5		39.5	488	
48	1.421	0.276	6.757	47.5	244.8	39.5	1876	9669
72	1.421	0.882	11.125	78.2	126.1	39.5	3088	4980
96	1.421	1.212	15.695	110.4	129.4	39.5	4360	5111
120	1.421	1.057	6.142	43.2	58.1	39.5	1706	2294

TABLA No. 4. Rendimientos de micelio de Pleurotus ostreatus y Eficiencias de Utilización del medio de Sulfato de Amonio (IV).

Horas de Cultivo	Sacarosa (%)		Rendimiento de Micelio g. de micelio por 100 g. de sacarosa			Proteína (%)	Eficiencia protéica g/100 g. de sacarosa	
	Inicial	Utilizada	g/litro	Inicial	Utilizada		Inicial	Utilizada
0	1.616		12.48					
24	1.616		27.02	167		39.5	6596	
48	1.616		30.66	189		39.5	7465	
72	1.616		31.428	194		39.5	7678	
96	1.616		32.41	200		39.5	7919	
120	1.616	0681	33.16	205	536	39.5	8101	21191

TABLA No. 5. Rendimientos de micelio de Pleurotus ostreatus y Eficiencias de utilización del medio de Alfalfa de Forraje (V).

Horas de Cultivo	Sacarosa (%)		Rendimiento de Micelio			Proteína (%)	Eficiencia Protéica	
			g. de micelio por 100 g. de sacarosa		g/100 g. de sacarosa			
	Inicial	Utilizada	g/litro	Inicial		Utilizada		Inicial
0	3.25		3.66					
24	3.25	0.25	1.91	5.8	76.4	39.5	229	3017
48	3.25	0.375	2.5	7.6	66.6	39.5	300	2630
72	3.25	0.77	3.89	11.9	54.2	39.5	470	2140
96	3.25	2.217	3.292	10.1	14.8	39.5	398	588
120	3.25	2.59	0.996	3.0	3.8	39.5	118	150

TABLA No. 6. Rendimientos de micelio de Pleurotus ostreatus y Eficiencias de utilización del medio de Arroz. (VI)

Horas de Cultivo	Sacarosa (%)		Rendimiento de Micelio g. de Micelio por 100 g. de sacarosa			Proteína (%)	Eficiencia protéica g/100 g, de sacarosa	
	Inicial	Utilizada	g/litro	Inicial	Utilizada		Inicial	Utilizada
0	1.516		2.03					
24	1.516	0.581	2.338	15.4	40.2	39.5	608	1587
48	1.516	0.741	5.680	37.4	76.6	39.5	1477	3025
72	1.516	0.891	6.780	44.7	76.0	39.5	1765	3002
96	1.516	0.966	8.860	58.4	91.7	39.5	2306	3622
120	1.516	0.904	11.54	76.1	127.6	39.5	3005	5040
168	1.516	1.054	11.946	78.7	113.3	39.5	3108	4475

TABLA No. 7. Rendimientos de micelio de Pleurotus ostreatus y Eficiencias de utilización del medio de Licor de Cocimiento de Maíz (VII).

Horas de Cultivo	Sacarosa		Rendimiento de Micelio g. de micelio por 100 g. de sacarosa			Proteína (%)	Eficiencia Protéica g/100 g. de sacarosa	
	Inicial	Utilizada	g/litro	Inicial	Utilizada		Inicial	Utilizada
0	4.74		1.534					
24	4.74	0.06	2.252	4.0	375	39.5	158.0	14812
72	4.74	1.55	39.442	83.0	254	39.5	3278.0	10033
120	4.74	2.449	34.006	71.0	139	39.5	2804.5	5490
168	4.74	3.73	53.816	113.0	144	39.5	4463.5	5688
216	4.74	3.91	50.469	106.0	129	39.5	4187.0	5095

TABLA No. 8. Rendimientos de micelio de Pleurotus ostreatus y Eficiencias de Utilización del Medio de Cola 1% (VIII).

Horas de Cultivo	Sacarosa (%)		Rendimiento de Micelio			Proteína	Eficiencia Protéica	
			g. de micelio por 100 g. de sacarosa				g/100 g. de sacarosa	
	Inicial	Utilizada	g/litro	Inicial	Utilizada	(%)		
0	4.74		1.534					
24	4.74	0.42	6.117	12	145	39.5	474	5727
72	4.74	1.48	2.430	5	16	39.5	197	632
120	4.74	1.97	2.052	4	10.4	39.5	158	410.8
168	4.74	2.11	2.234	4	10.7	39.5	158	422
216	4.74	2.26	2.558	5	11.3	39.5	197	446

TABLA No. 9. Rendimientos de micelio de *Pleurotus ostreatus* y Eficiencias de utilización del Medio de Cola 1% (VIII).

Fermentación llevada a cabo en matraz Erlenmeyer normal.

Horas de Cultivo	Sacarosa (%)		Rendimiento de Micelio g. de micelio por 100g. de sacarosa			Proteína (%)	Eficiencia Protéica g/100 g. de sacarosa	
	Inicial	Utilizada	g/litro	Inicial	Utilizada		Inicial	Utilizada
0	4.4		1.204					
24	4.4	0.66	6.192	14	93.8	39.5	553	3705
72	4.4	3.4	6.556	14.9	19.2	39.5	588	758
120	4.4	3.9	2.952	6.7	7.5	39.5	264.6	296
168	4.4	3.87	3.513	7.9	9.0	39.5	312	355
216	4.4	3.92	3.320	7.5	8.4	39.5	296	331

TABLA No. 10. Rendimientos de micelio de Pleurotus ostreatus y Eficiencias de Utilización del medio de Cola 2.5% (IX).

Horas de Cultivo	Sacarosa (%)		Rendimiento de Micelio			Proteína (%)	Eficiencia Protéica	
			g. de micelio por 100g. de sacarosa				g/100 g. de sacarosa	
	Inicial	Utilizada	g/litro	Inicial	Utilizada		Inicial	Utilizada
0	4.5		2.794					
24	4.5	1.44	4.132	9.1	28.6	39.5	359	1129
72	4.5	1.25	2.284	5.0	18.2	39.5	197	718
120	4.5	2.58	4.768	10.5	18.4	39.5	414	726
168	4.5	2.38	2.040	4.5	8.5	39.5	177	335.7
216	4.5	2.47	7.136	15.8	28.8	39.5	624	1137

TABLA No. 11. Rendimientos de micelio de Pleurotus ostreatus y Eficiencias de Utilización del Medio de Alimento para Ganado (X).

Horas de Cultivo	Sacarosa (%)		Rendimiento de Micelio			Proteína (%)	Eficiencia Protéica	
			g. de micelio por 100 g de sacarosa				g/100 g. de sacarosa	
	Inicial	Utilizada	g/litro	Inicial	Utilizada		Inicial	Utilizada
0	5.0		10.24					
24	5.0		10.18	20.3		39.5	801	
72	5.0		7.01	14.02		39.5	553	
120	5.0	0.5	24.72	49.45	494.5	39.5	1953	19532
168	5.0	0.04	6.67	13.3	1668	39.5	525	65886
216	5.0	0.73	9.140	18.2	125.2	39.5	718	4945

TABLA No. 12. Rendimientos de micelio de Pleurotus ostreatus y Eficiencias de utilización del Medio de Alfalfa Fresca (XI).

Horas de Cultivo	Sacarosa (%)		Rendimiento de Micelio			Proteína (%)	Eficiencia Protéica	
			g. de micelio por 100g de sacarosa				g/100 g. de sacarosa	
	Inicial	Utilizada	g/litro	Inicial	Utilizada		Inicial	Utilizada
0	5.0		1.572					
24	5.0		0.142	0.28		39.5	11	
72	5.0	1.37	1.118	2.23	8.1	39.5	88	319
120	5.0	2.85	0.044	0.08	0.1	39.5	3.0	4.0
168	5.0	3.31	0.798	1.5	2.4	39.5	59	94

TABLA No. 13. Rendimientos de micelio de Pleurotus ostreatus y Eficiencias de utilización del medio de Jugo de Alfalfa 5% (XII).

Horas de Cultivo	Sacarosa (%)		Rendimiento de Micelio			Proteína (%)	Eficiencia Protéica	
			g. de micelio por 100 g. de sacarosa		g/100 g. de Sacarosa			
	Inicial	Utilizada	g/litro	Inicial	Utilizada		Inicial	Utilizada
0	4.6		4.584					
24	4.6		0.536	1.1		39.5	43	
72	6.18	0.9	2.828	6.1	31.4	39.5	240	1240
120	6.18	0.64	1.378	2.9	215	39.5	114	849
168	6.18	0.56	0.728	1.5	13	39.5	59	513

TABLA No. 14. Rendimiento de micelio de Pleurotus ostreatus y Eficiencia de utilización del medio de Jugo de Alfalfa 20% (XIII).

Horas de Cultivo	Sacarosa (%)		Rendimiento de Micelio g. de micelio por 100 g de sacarosa			Proteína (%)	Eficiencia Protéica g/100 g. de sacarosa	
	Inicial	Utilizada	g/litro	Inicial	Utilizada		Inicial	Utilizada
0	6.0		0.384					
12	6.0	5.452	5.168	8.61	9.5	39.5	340	375.2
16	6.0	5.634	5.241	8.73	9.3	39.5	344	327.3
21	6.0	5.688	5.909	9.84	10.3	39.5	388	406.8
26	6.0	5.688	5.249	8.74	9.2	39.5	345	363
30	6.0	5.7	4.928	8.21	8.6	39.5	324	432

TABLA No. 15. Rendimientos de micelio de Pleurotus ostreatus y Eficiencias de utilización del Medio de Jugo de Alfalfa - Cola (XV).

Días de Cultivo	Sacarisa (%)		Rendimiento de Micelio			Proteína (%)	Eficiencia Protéica	
			g. de micelio por 100 g. de sacarosa				g/100 g. de sacarosa	
	Inicial	Utilizada	g/litro	Inicial	Utilizada		Inicial	Utilizada
0	6.0		1.853					
12	6.0	5.707	7.515	12.52	13.1	39.5	494	517
16	6.0	5.284	3.559	5.9	6.7	39.5	233	264
21	6.0	5.45	7.733	12.8	14.1	39.5	505	556
26	6.0	5.5	7.134	11.9	12.9	39.5	470	509
30	6.0	5.55	6.941	11.56	12.5	39.5	456	493

TABLA No. 16. Rendimientos de micelio de Pleurotus ostreatus y Eficiencias de utilización del Medio del Alfalfa Fresca - Cola (XIV).

Días de Cultivo	Sacarosa (%)		Rendimientos de Micelio			Proteína (%)	Eficiencia Protéica	
			g. de micelio por 100 g. de sacarosa				g/100 g. de sacarosa	
	Inicial	Utilizada	g/litro	Inicial	Utilizada		Inicial	Utilizada
0	4.4		6.937					
12	4.4	3.544	7.735	17.5	21.8	39.5	691	861
16	4.4	3.817	12.002	27.2	31.4	39.5	1074	1240
21	4.4	3.713	5.119	11.6	13.7	39.5	458	541
26	4.4	3.463	14.149	32.1	40.8	39.5	1267	1611
30	4.4	4.05	6.875	15.6	16.9	39.5	616	667

TABLA No. 17. Rendimientos de micelio de Pleurotus ostreatus y Eficiencias de utilización del Medio de Alfalfa Fresca (XI).

Medio Número	Horas de Cultivo	Sacarosa (%)		Rendimiento de Micelio			Proteína (%)	Eficiencia Protéica	
				g. de micelio por 100g. de sacarosa				g/100 g. de Sacarosa	
				Inicial	Utilizada	g/litro		Inicial	Utilizada
III	168	1.866	1.829	19.878	106.5	149.5	39.5	4206	5906
IV	96	1.421	1.202	15.695	110.4	129.4	39.5	4360	5111
VI	72	3.25	0.77	3.89	11.9	54.2	39.5	470	2140
VII	168	1.516	1.054	11.946	38.7	113.3	39.5	3108	4475
VIII	168	4.74	3.73	53.816	113.0	1440.0	39.5	4463	5688
X	216	4.5	2.47	7.136	15.8	28.8	39.5	624	1137
XII	72	5.0	1.37	1.118	2.23	8.1	39.5	88	319
XIII	72	6.18	0.9	2.828	6.1	31.4	39.5	240	1240

TABLA No. 18. Máximos Rendimientos de Micelio de Pleurotus ostreatus; Eficiencias de utilización y tiempo requerido para ello, de los medios seleccionados.

AMINOACIDO	% EN MUESTRA	% EN PROTEINA
Lisina	2.13	5.38
Histidina	0.96	2.43
Arginina	2.12	5.37
Ac. Aspártico	3.75	9.49
Treonina	2.01	5.08
Serina	2.23	5.64
Ac. Glutámico	4.33	10.96
Prolina	1.92	4.86
Glicina	1.89	4.79
Alanina	2.57	6.51
Valina	1.87	4.73
Metionina	0.64	1.61
Isoleucina	1.58	3.99
Leucina	3.31	8.39
Tirosina	1.40	3.54
Fenilalanina	6.29	15.93
Triptofano (#)	0.29	0.74
Proteína (##)	39.50	

(#) Determinación colorimétrica.

(##) N. x 6.25

El resto de aminoácidos determinados por cromatografía de intercambio iónico.

TABLA No. 19. Composición de Aminoácidos en la muestra del micelio de Pleurotus ostreatus cultivado en el medio de Cola 1% (VIII).

Aminoácido	Composición (g/100 g de nitrógeno total)					FAO (27) Proteína Ideal
	Agaricus campestris	Morchella esculenta	Morchella spp.	Tricholoma nudum	Pleurotus ostreatus	
Alanina	-	4.81	11.12	-	6.51	-
Arginina	6.49	7.95	4.32	4.63	5.37	-
Ac. Aspártico	-	4.97	6.02	-	9.49	-
Cistina	-	0.27	0.80	-	-	-
Ac. Glutámico	-	14.81	13.45	-	10.96	-
Glicina	-	2.94	2.75	-	4.79	-
Histidina	-	2.12	1.94	2.96	2.43	-
Isoleucina	14.7	2.70	3.45	3.15	3.99	4.2
Leucina	7.77	5.12	6.06	6.66	8.39	4.8
Lisina	-	3.84	5.38	6.66	5.38	4.2
Metionina	4.64	0.90	1.41	1.66	1.61	2.2
Fenilalanina	-	2.51	2.82	3.70	15.93	2.8
Prolina	-	4.15	4.78	-	4.86	-
Serina	-	3.05	3.90	-	5.64	-
Treonina	-	2.98	3.37	3.70	5.08	2.8
Triptofano	1.64	0.86	1.43	3.52	0.74	1.4
Tirosina	-	1.72	2.49	-	3.54	-
Valina	10.5	3.36	3.86	3.89	4.73	4.2

TABLA No. 20 Tabla comparativa del contenido de Aminoácidos de Pleurotus ostreatus con otros hongos (9).

<u>Aminoácido</u>	<u>Composición (g/100 g de Proteína</u>									
	Gluten de Maíz	Gluten de Trigo	Prot. de Soya	Prot. de Le- vadura	Zeina	Gelat.	Musc. de Buey	Caseína	Albúmina de Huevo	Pleurotus ostreatus
Arginina	3.1	3.9	7.1	5.4	1.6	9.2	7.2	4.3	5.9	5.37
Histidina	1.6	2.2	2.3	2.9	0.8	0.9	2.9	2.1	1.7	2.43
Lisina	0.8	1.9	5.8	7.6	0.0	5.3	8.2	7.6	5.0	5.38
Tirosina	6.7	3.8	4.4	3.7	5.4	0.3	4.4	6.7	4.3	3.54
Triptofano	0.7	1.0	1.2	1.4	0.1	0.0	1.4	1.2	1.5	0.74
Fenilalanina	6.4	5.5	5.0	4.4	6.7	2.4	5.0	5.0	5.4	15.39
Cistina	1.5	1.9	1-2	1.0	0.9	0-0.2	1.1	0.35	1.9	-
Metionina	2.5	2-3	1.9	2.0	2.4	1.1	3.4	3.4	5.1	1.61
Treonina	4.0	2.7	4.2	5.5	2.5	1.7	5.0	3.8	4.0	5.08
Leucina	25.0	7.5	6.6	73.0	25.0	3.6	7.7	9.7	10.0	8.39
Isoleucina	5.0	3.7	4.7	6.0	4.0	1.2	6.3	6.3	7.1	3.99
Valina	4-5	4.2	4.2	5.0	2-3	2.7	5.8	6.5	6.8	4.73
Ac. Glutámico	24.5	40.0	21.0	-	36.6	11.6	15.6	23.3	17.5	10.96
Ac. Aspártico	-	-	-	-	3.4	9.6	6.1	6.1	8.1	9.49
Glicina	4.3	7.2	-	-	0.6	26.6	5.1	0.5	3.2	4.79
Alanina	-	5.0	-	-	10.0	10.4	5.0	5.5	72.0	6.51
Prolina	-	-	-	-	9-12	17.2	-	7-8	4-5	4.86
Serina	-	-	-	-	-	3.7	5.5	7.7	7.4	5.64

TABLA No. 21. Tabla comparativa del contenido de aminoácidos de la proteína de Pleurotus ostreatus con algunas proteínas vegetales y animales. (28).

Agua de Mar y Tolerancia de los Hongos al Cloruro de Sodio.

Por ser el objeto de este trabajo encontrar un medio de fermentación al menor precio posible y que propicie el mayor crecimiento de Pleurotus ostreatus, debemos tener en mente el costo de su preparación y de las materias primas necesarias para ello; ya que el costo del producto final se elevará si las materias primas utilizadas para su obtención son caras.

Sabiendo que los microorganismos, en general, tienen en promedio un 5% en peso de minerales (11) que deben estar contenidos inicialmente en el medio, se pensó en la utilización del agua de mar ya que contiene los minerales esenciales (#) para el crecimiento de los microorganismos en la proporción reportada en el cuadro número 8.

El Co, Mn, Zn, Fe, B, Mo, Cu, Mg y I que se requieren en microcantidades, también están contenidos en el agua de mar.

En la preparación de los medios de fermentación se usó agua de mar adicionada de agua de la llave en proporción 1:3, debido al estudio hecho por Tresner (30), sobre la tolerancia al cloruro de sodio de 975 especies de hongos terrestres seleccionados taxonómicamente de las clases mayores; y en el que, Los Basidiomycetes fueron decididamente los menos tolerantes, con más de la mitad de sus especies incapaces de crecer en más de 2% de NaCl.

Debido a la predominación del NaCl en el agua de mar, se siguió el siguiente razonamiento:

Concentración total de elementos = 33,222.2 ppm.

Peso total de elementos = 3.32222 g% (en forma de sales)

El NaCl comprende el 90.6% en peso de las sales totales, entonces:

$$\begin{array}{rcl} 100\% & \underline{\hspace{2cm}} & 3.32222 \text{ g.} \\ 90.6\% & \underline{\hspace{2cm}} & x = 3.0099 \text{ g. de NaCl} \end{array}$$

Al diluír el agua de mar 1:3 se evita la concentración limitante de 2% de

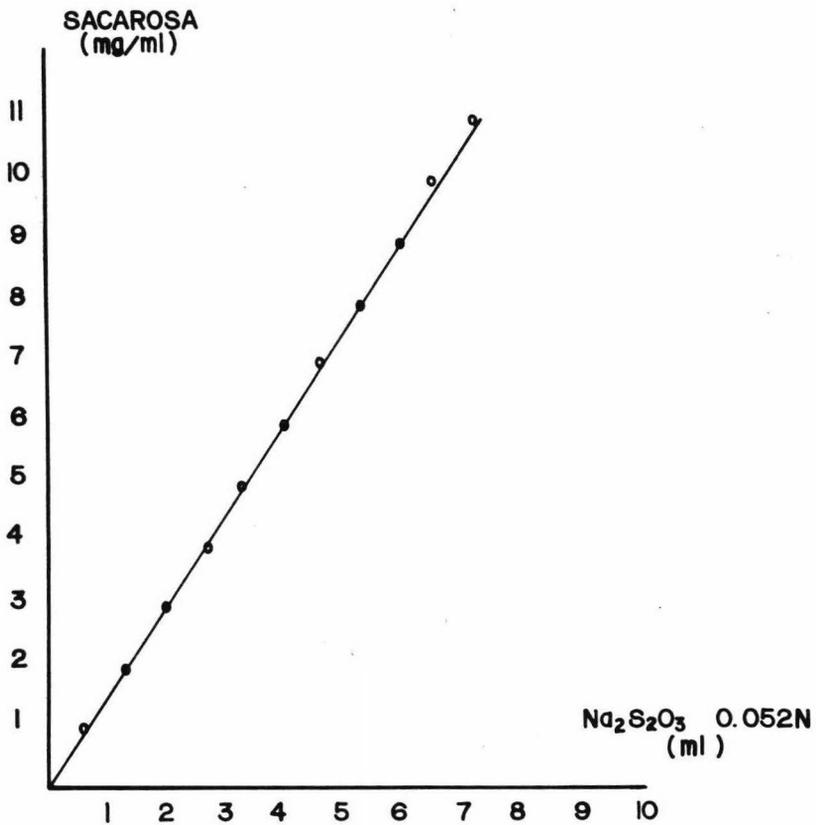
NaCl o sea:

Agua de mar = 3.0099 g.% de NaCl

Agua de mar 1:3 = 1.0033 g.% de NaCl.

ELEMENTO		CONCENTRACIONES EN PPM.
Elementos Mayores	Cl	19,361
	Na (#)	10,768
	Mg (#)	1,298
	S (#)	880
	Ca (#)	408
	K (#)	388
	Be	66
	C	28
Elementos Menores (conc. de 1 a 100 ppm).	Sr	13
	B	4.6
	Si	4.0
	F	1.3
	N	1.0
Elementos Traza (menor de — 1 ppm.)	Al	1.0
	Rb	0.2
	Li	0.1
	P, etc.	
	Total	33,222.2

CUADRO No. 8. Concentración de elementos presentes en el agua de mar (29).



GRAFICA No.1

CURVA ESTANDAR DE SACAROSA .
DETERMINADA POR EL METODO DE UNDERKOFLEK .

TABLA No. 2

En este experimento, uno de los resultados más significativos fué la comprobación del marcado efecto que produce el contenido de nitrógeno total del medio de cultivo en el micelio seco.

GRAFICA No. 1

La elaboración de una curva estándar de mg/ml de sacarosa vs. ml. de tiosulfato de sodio 0.052 N (Gráfica 1) tuvo por objeto permitir una equivalencia directa de los ml. de tiosulfato de sodio gastados por cada muestra de medio de fermentación al determinar los azúcares reductores por el Método de Underkoffler.

Esta curva se elaboró con sacarosa, porque ésta requiere de hidrólisis ácida para la liberación de sus azúcares reductores y como para estimar la eficiencia de fermentación por consumo de sustrato en los medios de cultivo, es necesario determinar azúcares reductores totales, ya que el microorganismo puede disponer en cualquier momento de materiales energéticos como almidones que no se detectan como azúcares reductores libres, y como la fuente de carbohidratos suministrada a los medios de fermentación en éstos experimentos, es de composición compleja (melaza, alfalfa, licor de cocimiento de maíz), también necesitan de previa hidrólisis ácida para la liberación de los azúcares reductores totales, habiendo así mayor similitud en ambas determinaciones y por lo tanto menor error.

Como el Método de Underkoffler requiere de muestras neutras, se tomó -- una alícuota de este hidrolizado, se neutralizó y se aforó para su determinación. Una vez obtenida la equivalencia por medio de la curva estándar fué necesario el empleo

de la siguiente fórmula para llegar a la concentración original en la muestra y obtener una composición porcentual.

$$\text{g\% de Sacarosa} = \frac{\text{mg/ml. de la curva} \times \text{aforo}}{\text{ml de alícuota problema}} \times 0.1$$

Como primer paso llevado a cabo en este trabajo fué la comparación de rendimiento por diferentes fuentes nitrogenadas en medios de cultivo mediante una fermentación preliminar en la que se estudiaron los siguientes medios: III al VIII, X, XI y XVI al XX.

La eliminación de los siguientes medios no obstante de tener un rendimiento aceptable, comparable en algunos casos con los mejores obtenidos en este trabajo se debió a las siguientes razones:

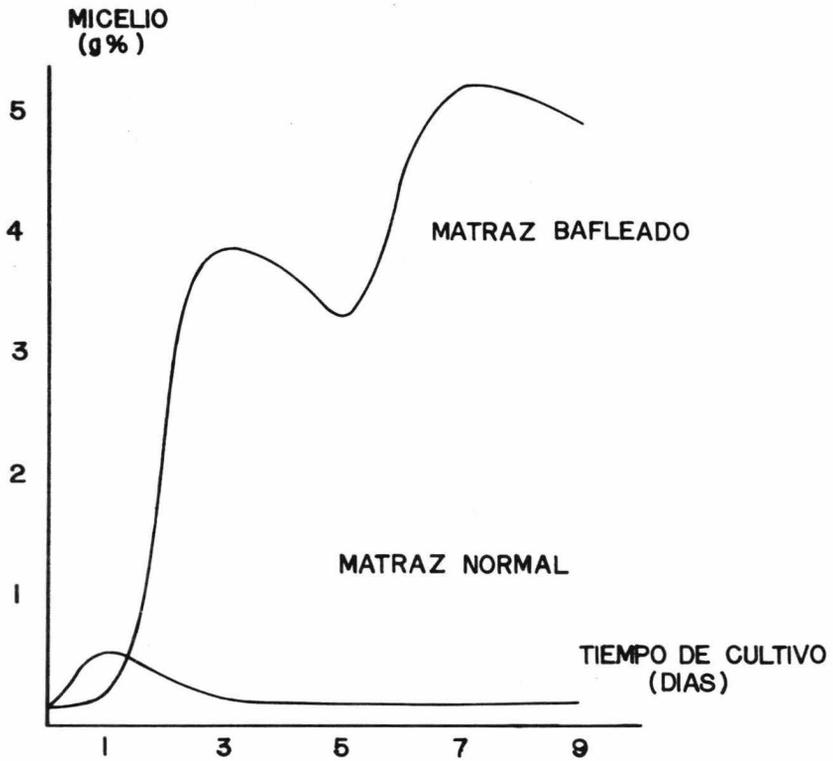
Medio de Papel Periódico (XIX): Por notarse obscurecimiento del medio ocasionado por la tinta, y por la difícil separación del micelio de las partículas fibrosas del papel.

Medio de Aserrín (XVII): Por el problema funcional que se presenta para la separación del micelio de las partículas de aserrín no metabolizadas, ya que quedan englobadas en el micelio.

Medio de Bagazo de Caña (XVI): Por la misma razón que el anterior.

Medio de Conejaza (XVIII): Por la misma razón que los anteriores y por el problema que representaría obtener ésta materia de composición constante para una producción a escala industrial.

El inconveniente económico común en estos medios sería la elevación del



GRAFICA No.2

EFFECTO DEL BAFLEADO EN LOS MATRACES DE FERMENTACION SOBRE EL RENDIMIENTO DE MICELIO DE Pleurotus ostreatus. COMPARACION HECHA EN EL MEDIO DE COLA 1% (VIII) .

costo de producción y por lo tanto del producto final que ocasionaría el paso de la separación aumentado al proceso.

Medio de Almidón: (XX): Por no observarse desarrollo del hongo en un período de 10 días después de su inoculación.

Con los medios restantes se llevaron a cabo las fermentaciones y de los resultados obtenidos se elaboraron gráficas y tablas de las que se deduce lo siguiente:

GRAFICA No. 2

Estas curvas demuestran claramente, que la aireación, es un factor limitante en la velocidad de crecimiento y por lo tanto del rendimiento del micelio. En este caso, el uso de matraces bafleados según Solomons (12) proporcionan una aireación más eficiente.

El grado de aireación del cultivo líquido en el matraz de agitación es inversamente proporcional al volumen del líquido, por lo tanto, el efecto del volumen es notable y los resultados dependen directamente del volumen del medio. En este trabajo se usó un volumen de 50 ml de medio en matraces Erlenmeyer bafleados de 300 ml. porque para la mayoría de los experimentos de cultivo sumergido a escala de laboratorio, se encontró que un volumen de 40 ml. de medio en matraces Erlenmeyer de 250 ml. es satisfactorio (10).

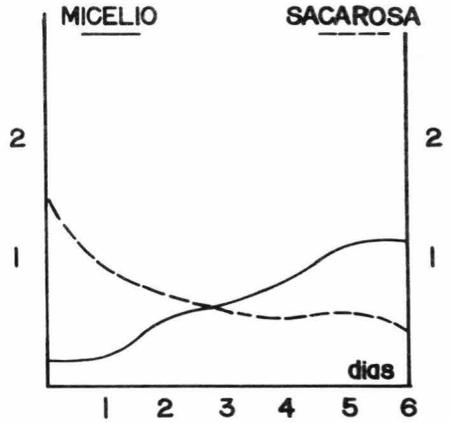
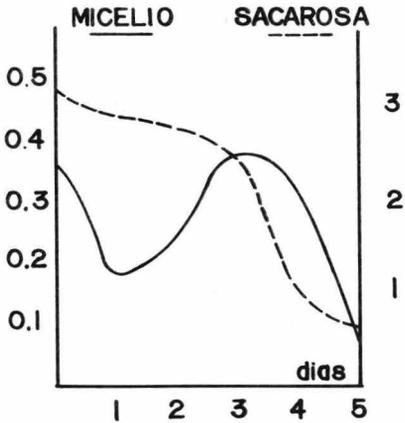
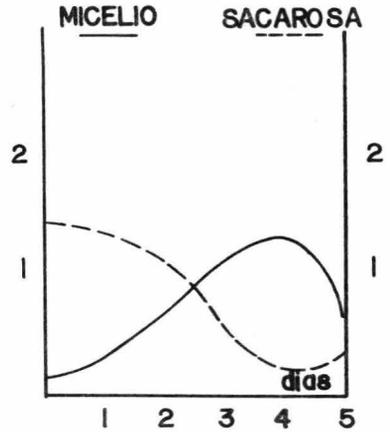
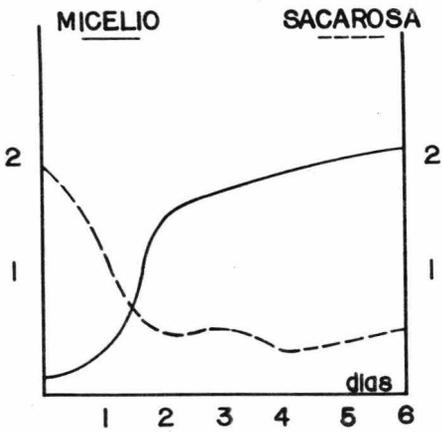


FIGURA No.1 GRAFICAS DE PRODUCCION DE MICELIO (g%) Y CONSUMO DE SACAROSA (g%) V.S. TIEMPO DE CULTIVO EN LAS FERMENTACIONES DE LOS MEDIOS QUE LLEVAN UN RANGO DE CONCENTRACION DE 1.4-1.8g% DE SACAROSA.

FIGURA No. 1

Usando medios de cultivo con un rango de concentración de 1.4-1.8 g% de sacarosa se obtienen las curvas de rendimiento micelial que se presentan en la figura número 1, cuando se llevaron a cabo las fermentaciones directas, es decir, que se iniciaron de un inóculo común proveniente del medio II; por tratarse de la fermentación de volúmenes pequeños de medio, se eliminó el Pie de Cuba, cuya función es permitir la adaptación del microorganismo a un medio de cultivo, lo cual es necesario en fermentaciones de grandes volúmenes de medio, porque reduce la fase inicial de adaptación con la que se alcanza el rendimiento óptimo en menor tiempo.

En esta forma, las características de las curvas obtenidas de acuerdo a las fases de una curva típica de crecimiento son las siguientes:

GRAFICA No. 3

De la fermentación del Medio de Cola 1% (III).

Es una curva bastante típica que representa una fase de adaptación pequeña, de más o menos 24 hs., seguida por una fase logarítmica corta con respecto a tiempo, lo cual es interesante porque se obtiene el mayor rendimiento en más o menos 48 hs.

Aún en la fase estacionaria, de 5 días, aumenta un poco el peso de sedimento, que en este caso, es casi exclusivamente micelio, ya que el sedimento de este medio no es apreciable. Esta velocidad de crecimiento puede deberse a la fuente orgánica nitrogenada del Medio de Cola.

La disminución de azúcar en el medio concuerda con el aumento de sedimento.

GRAFICA No. 4

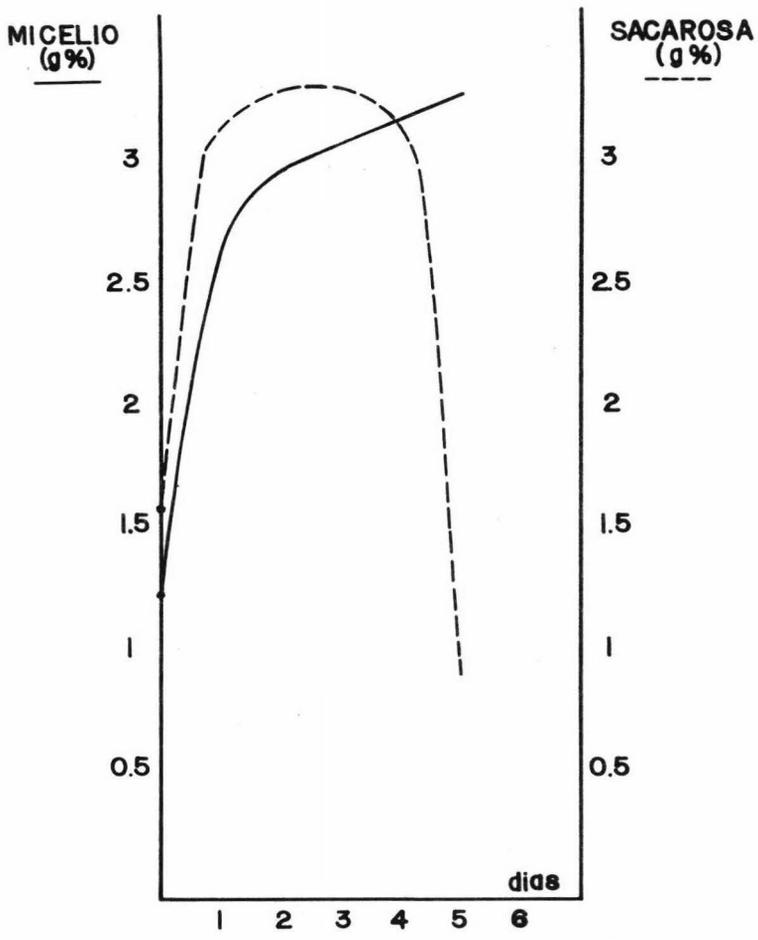
Esta curva presenta una fase de adaptación tan pequeña, que se confunde con la fase logarítmica que es más o menos larga, de 3 días, seguida de una fase estacionaria casi nula, siendo la única curva de este ensayo que muestra una fase decli-
natoria debida a autólisis por las malas condiciones imperantes en el medio ambiente.

Con respecto al consumo de azúcares, en esta fermentación, se observa una disminución lógica de sustancias reductoras que no necesariamente son azúcares, y un ligero aumento en las últimas 24 hs., que coincide con la disminución de micelio por lo que suponemos se trata de una autólisis celular.

GRAFICA No. 5

Es necesario aclarar en este caso, que el arroz no se usó como fuente nitrógenada, ya que la cantidad de este elemento es muy baja, sino más bien como un sustrato energético para Pleurotus ostreatus debido a que en México, esta fuente es accesible y barata.

Se observa una disminución de sedimento debido probablemente a la hidrólisis de los almidones y no necesariamente a una desaparición de micelio, el cual en realidad se encuentra en la fase de adaptación; del segundo al tercer día hay un aumento de sedimento que puede deberse a la producción de micelio, esto se prolonga muy poco tiempo, puesto que del tercero al quinto días se observa una disminución de



GRAFICA No.7

PRODUCCION DE MICELIO Y CONSUMO DE SACAROSA EN LA FERMENTACION DEL MEDIO DE CULTIVO DE ALFALFA DE FORRAJE (V).



QUIMICA

sedimento que puede atribuirse a una autólisis celular, por ser un medio muy pobre en nitrógeno.

La curva de consumo de azúcares señala una utilización muy grande de azúcares con respecto al rendimiento tan bajo, lo que indica que probablemente se utilizó una gran parte de este sustrato con fines energéticos.

GRAFICA No. 6

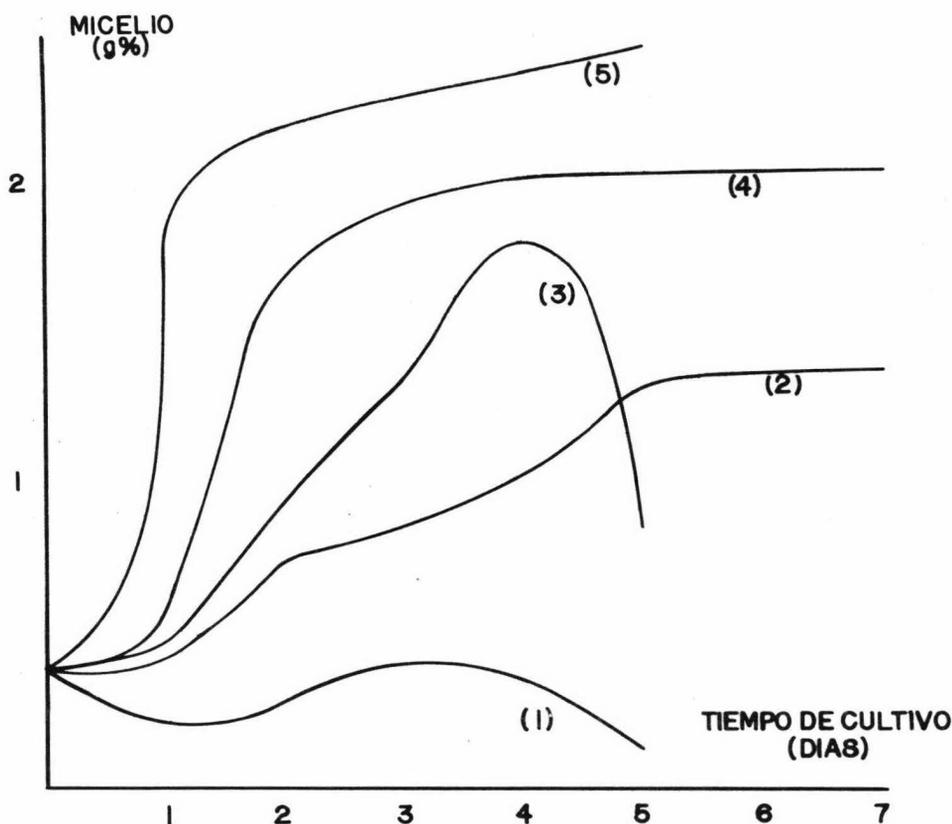
Presenta una fase estacionaria bastante lenta y una fase logarítmica bastante tendida, lo que indica una reproducción muy lenta (4 días), encontrándose al séptimo día de fermentación aún en fase estacionaria.

La curva de consumo de azúcares presenta un comportamiento lógico.

GRAFICA No. 7

Este medio indica ser muy apropiado para el crecimiento de Pleurotus ostreatus, ya que no se observa una fase estacionaria, sino iniciándose la fermentación a las 0 hs. en escala logarítmica y siendo muy corta con respecto a tiempo (24 hs) y pasando rápidamente a la fase estacionaria.

En lo que se refiere al consumo de azúcares, a las 24 hs., hay un aumento considerable de azúcares reductores con respecto a la concentración inicial, lo cual se debe al desdoblamiento de pectinas y probablemente parte de celulosa, lo cual no afecta el peso del sedimento, lo que hace suponer que como el crecimiento del hongo es tan rápido en su fase logarítmica, no permite detectar una disminución del sedimento. Esta concentración se mantiene más o menos constante durante 3 días, sufrien



- CURVA No.5 ALFALFA DE FORRAJE
- CURVA No.4 COLA 1%
- CURVA No.3 SULFATO DE AMONIO
- CURVA No.2 LICOR DE COCIMIENTO DE MAIZ
- CURVA No.1 ARROZ

FIGURA No. 2 PRODUCCION COMPARATIVA DE MICELIO DE Pleurotus ostreatus EN DIFERENTES MEDIOS DE FERMENTACION CON UN RANGO DE CONCENTRACION DE 1.4-1.8 g% DE SACAROSA.

do una disminución repentina en 24 hs. lo cual no es recíproco a un aumento de sedimento, por lo que nos indica que los azúcares se están usando solo con fines energéticos.

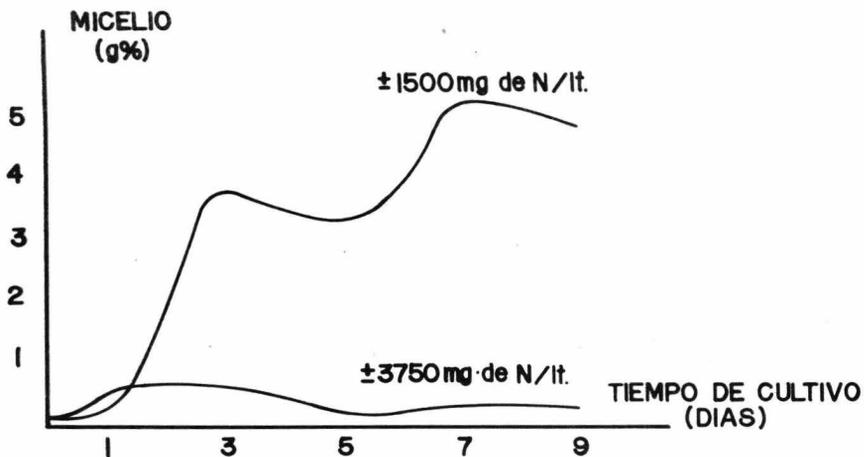
FIGURA No. 2

Las curvas de rendimiento micelial en función de tiempo que se presentan en esta gráfica se hacen coincidir en un mismo punto de partida (suponiendo un mismo sedimento inicial y no en cero, porque la curva (1), correspondiente al medio de fermentación de arroz quedaría negativa). Con el objeto de establecer una comparación que a primera vista indique aparentemente cual es el medio más favorable para el crecimiento de Pleurotus ostreatus.

Se observa que la curva (5) es la de mayor rendimiento, quedando la curva (4) en segundo lugar; esta apariencia es relativa porque, como se dijo antes, se determina sedimento total, que en el caso del medio de Alfalfa está constituido en su mayor parte por residuo que es celulosa que no se alcanza a hidrolizar, y el contenido de micelio que no se determinó por la dificultad que representa su separación, es bastante menor que en el caso del Medio de Cola en el que el sedimento es en mayor parte micelio y casi nulo su residuo; de esto puede inferirse que el medio de Cola 1% es el más favorable.

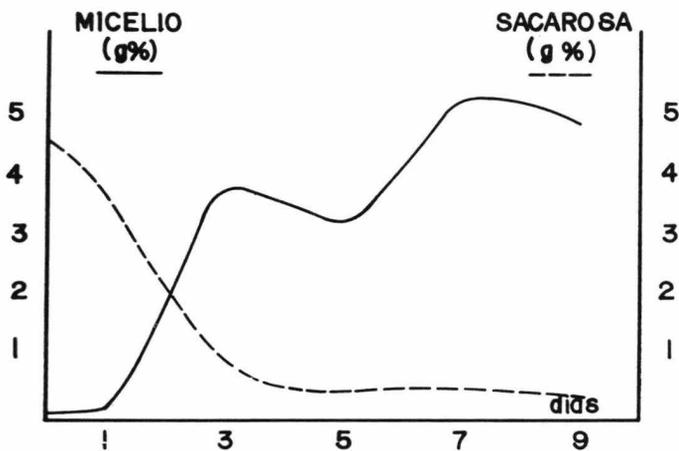
La curva (3) de esta figura alcanza un rendimiento igual al de la curva (4), pero en el doble de tiempo, lo que indica que Pleurotus ostreatus utiliza más satisfactoriamente una fuente orgánica de nitrógeno que una inorgánica.

En la curva (2) que representa la fermentación con Licor de Cocimiento -



GRAFICA No.8

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE NITROGENO DEL MEDIO DE FERMENTACION, SOBRE EL RENDIMIENTO DE MICELIO Pleurotus ostreatus .



GRAFICA No.9

PRODUCCION DE MICELIO DE Pleurotus ostreatus Y CONSUMO DE SACAROSA EN EL MEDIO DE COLA 1% (VIII) .

de Maíz, a pesar de ser la fuente de nitrógeno orgánico más ampliamente usada en las fermentaciones es desplazada en este experimento por la cola, lo cual es explicable por su mayor contenido protéico que proporciona mayor cantidad de aminoácidos; aunque el suministro de nitrógeno sea igual en ambos medios.

La curva (1) dá el rendimiento más bajo, lo que señala que el crecimiento de Pleurotus ostreatus no es favorable en una fuente abundante en almidones y pobre en nitrógeno, por lo tanto, se elimina como un medio de fermentación para la producción de su micelio a mayor escala.

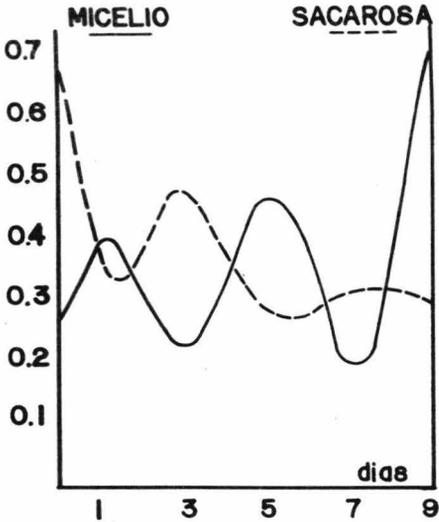
Cuando se utilizan Medios de Fermentación con un rango de concentración de 4.4 - 6.0 g% de sacarosa se obtienen las siguientes gráficas:

GRAFICA No. 8

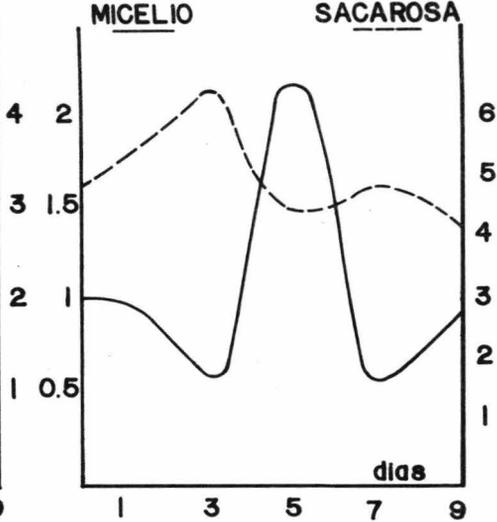
Estas curvas indican que la concentración de 1500 mg N₂/lt. de medio - aconsejada por Humfeld (17) para la producción de A. campestris en cultivo sumergido, es también aplicable para Pleurotus ostreatus, puesto que al probar una concentración mayor como es 3,750 mg N₂/litro el crecimiento es muy inferior.

GRAFICA No. 9

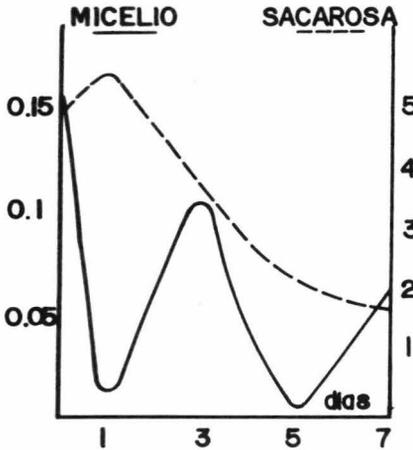
Esta curva muestra que después del tercer día hay una disminución de sedimento que puede indicar una autólisis que no sería debida a falta de azúcares, sino que probablemente se deba a un agotamiento de la fuente de nitrógeno y de esta manera libera sustancias que actúan como estimulantes del crecimiento y ocasionan -- una nueva elevación de la cantidad de sedimento.



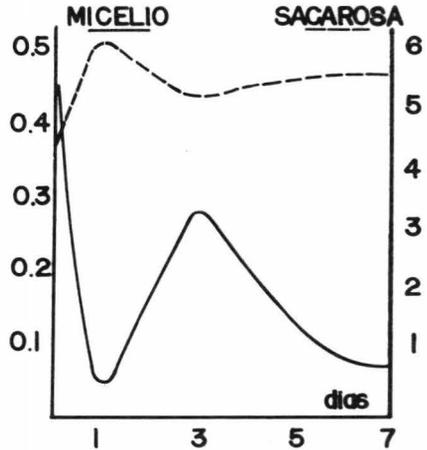
GRAFICA No. 10
ALIMENTO PARA GANADO



GRAFICA No. 11
ALFALFA FRESCA



GRAFICA No.12
JUGO DE ALFALFA 5%



GRAFICA No.13
JUGO DE ALFALFA 20%

FIGURA No.3 PRODUCCION DE MICELIO (g%) DE *Pleurotus ostreatus* Y CONSUMO DE SACAROSA (g%) EN LAS FERMENTACIONES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO QUE LLEVAN UN RANGO DE CONCENTRACION DE 4.4 - 6g% DE SACAROSA.

La curva de consumo de azúcares asevera que la disminución del sedimento es una autólisis que es aprovechada para un nuevo crecimiento, porque de lo contrario, denotaría una elevación por sustancias reductoras liberadas por este fenómeno.

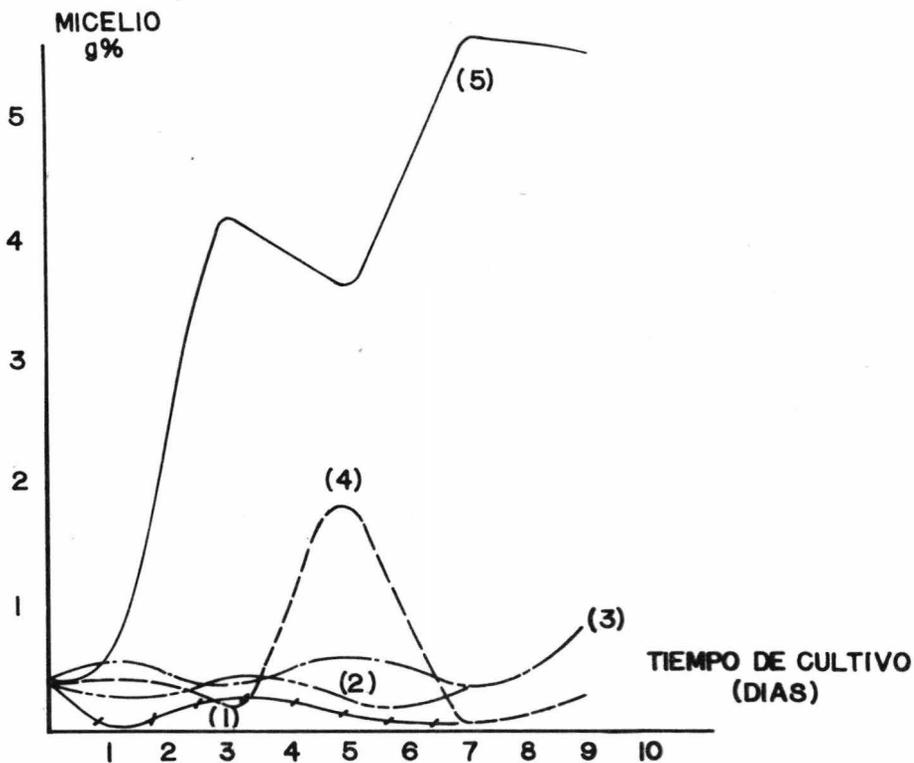
FIGURA No. 3

Las gráficas de esta figura se discuten en conjunto por presentar comportamientos similares, haciendo notar que los puntos más importantes son los siguientes:

- Por tratarse de medios de cultivo de composición compleja, no se puede deducir con precisión que es lo que realmente sucede durante la fermentación, por ejemplo, el Medio de Alimento para Ganado presenta sustancias tales como carbohidratos, grasas, proteínas, minerales, vitaminas, estimulantes del crecimiento, etc., por lo que no se sabe cual de ellas es la que está actuando en un momento determinado.

- Por la razón anterior, la curva de consumo de azúcares no puede formar un criterio confiable con respecto al comportamiento fúngico porque sus variaciones pueden deberse a la aparición de agentes reductores provenientes de los componentes del medio de cultivo (almidones y celulosa) y del micelio.

- A pesar de esto, se debe hacer notar el desfase marcado entre las curvas de producción de micelio y las curvas de consumo de azúcares; o sea que los máximos de la curva de azúcares coinciden con los mínimos de la curva de produc—



- CURVA No.5 COLA 1%
- - - - - CURVA No.4 ALFALFA FRESCA
- · - · - CURVA No.3 ALIMENTO DE GANADO
- · — · — CURVA No.2 JUGO DE ALFALFA 5 %
- / - / - CURVA No. 1 JUGO DE ALFALFA 20%

FIGURA No.4 PRODUCCION COMPARATIVA DE MICELIO (g%) DE Pleurotus ostreatus EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO CON UN RANGO DE CONCENTRACION DE 4.4 - 6 g% DE SACAROSA .

ción de micelio y viceversa, por lo que puede suponerse en general, que cada aumento de azúcares sea debido a una autólisis o a un desdoblamiento de materiales sólidos fermentables ocasionando cualquiera de estas posibilidades una disminución en la curva de crecimiento micelial, y que una disminución en la curva de azúcares se deba a un aumento por crecimiento micelial.

- El que los mínimos en la curva de crecimiento se mantengan a la misma altura, parece indicar que una parte del micelio se autolisa, pues si las disminuciones se debieran solamente a la hidrólisis de los materiales nutritivos, la tendencia general de esos mínimos sería a subir por aumento de micelio.

FIGURA No. 4

Las curvas de rendimiento micelial vs. tiempo, representadas en esta figura, se obtuvieron de un segundo lote de fermentaciones efectuadas con medios de cultivo con un rango de concentración de 4.4 - 6.0 g% de sacarosa, que se hacen coincidir en el mismo punto al tiempo cero con el fin de hacer una comparación visual sobre el mejor de los medios, y aunque, como se dijo antes, esta no es confiable sino hasta al hacer la comparación por eficiencia de producción, en este caso nos permite asegurar que el mejor de los medios probados para tal efecto es el de Cola 1% por 2 razones:

- La primera, concerniente a esta gráfica es porque la superioridad de su curva (5) sobre las otras cuatro es obvia, y la segunda es porque este resultado es una repetición del resultado obtenido en la curva (4) de la Fig. No. 2, a pesar

de tratarse de una fermentación en un medio con mayor concentración de azúcares reductores.

TABLA No. 18

Además de probar en este trabajo que el contenido de nitrógeno es fundamental para el rendimiento de micelio de Pleurotus ostreatus (Gráfica No. 8), se probó la gran importancia que tiene el contenido de azúcares reductores en el medio con respecto a economía por lo que puede observarse en los resultados que se obtuvieron al hacer dos lotes de fermentaciones con diferentes concentraciones de azúcares reductores y que son presentados en la tabla No. 18.

Como la producción de micelio en cultivo sumergido se puede medir en base a peso seco o en base a contenido de nitrógeno se notará que ambos valores varían ampliamente entre los diferentes sustratos que se proporcionaron al microorganismo. Sin embargo, en cualquier evaluación económica que se haga para la producción de micelio de Pleurotus ostreatus a escala comercial se deben considerar tanto las velocidades de crecimiento como los rendimientos totales.

Con el fin de establecer comparación entre los medios seleccionados, para obtener el mejor, en la tabla No. 18 se presentan los rendimientos óptimos y el tiempo requerido para ello de cada uno de ellos.

Al observar los datos de la columna de rendimiento de micelio por 100 g. de sacarosa inicial el mejor medio es el VIII (Cola 1%), pero estudiando su relación con rendimiento de micelio por 100 g. de sacarosa utilizada, se aprecia que esa gran diferencia es debida a que está utilizando muy poca azúcar del inicial y por

lo tanto, está habiendo un desperdicio de la misma, o sea, que al observar mayor diferencia entre la inicial y la utilizada (que siempre es mayor) se trata de un desperdicio de azúcar y por lo tanto menos eficiencia desde el punto de vista económico. - Ahora bien, fijando la atención en el tiempo de fermentación, que viene a ser de-- terminante, se encuentra que el medio IV es el mejor por varias razones deducidas - de esta tabla:

- Porque proporciona mayor rendimiento de micelio / 100 g. de sacarosa inicial con respecto a todos los demás en el menor tiempo. Se hace notar que aunque el rendimiento por 100 g. de sacarosa utilizada haga parecer que el mejor medio es - el III, por tomarse en cuenta el tiempo de fermentación, queda excluido.

- Aunque en la figura No. 2 se vea lo contrario, y es lógico como ya se explicó al respecto, por partir de una fuente de nitrógeno inorgánico necesita más - energía y mayor tiempo de fermentación para llegar a su óptimo rendimiento, pero - desde el punto de vista económico este tiempo es corto porque alcanza mayor rendi- miento que el de cola a las 72 hs. de fermentación tomándose ese tiempo para la --- comparación porque en ese medio sería el mejor, ya que sería incosteable prolongar la fermentación para la obtención de un aumento de micelio poco significativo; y con respecto a los demás no hay discusión.

Las fermentaciones con alfalfa se excluyen de esta comparación por el in- conveniente anteriormente señalado de su contaminación del sedimento con celulosa.

TABLAS No. 15, 16 y 17

Cuando se observó que las figuras 2 y 4 hacían deducir que aparentemente los medios de Cola 1% y Alfalfa eran los mejores, y que el de alfalfa presentaba el problema de separación de micelio y residuos no fermentados, se intentó lograr un mejor rendimiento por sinergismo entre ambos medios (se quería probar si era posible la hidrólisis total de la celulosa), en una proporción que dá aproximadamente 1500 mg. de N₂/litro.

Con este propósito, en este nuevo lote de fermentaciones, se hicieron las determinaciones de micelio producido y azúcares reductores a los 12, 16, 21, 26 y - 30 días al cabo de los cuales se vió que no se consiguió lo que se deseaba porque el hongo manifestó en las otras fermentaciones, un ciclo de crecimiento que en 12 días había iniciado y terminado, puesto que en las últimas 5 determinaciones indican que hay un comportamiento casi estático de 12 a 30 días. Esto indica, que a los 12 días probablemente se ha estabilizado el hongo por agotamiento total de nitrógeno del medio, aunque cuente aún con la celulosa como sustrato energético.

TABLAS No. 19, 20 y 21

Estas tablas indican el contenido de aminoácidos de la proteína de Pleurotus ostreatus, debiendo recordar que en este caso, para convertir el contenido de nitrógeno a proteína se usó el factor 6.25 solo para computar el contenido protéico en la misma base, que en la literatura se reportan en alimentos humanos y para ganado, lo cual es cuestionable porque si la proteína purificada tiene menor contenido de nitrógeno el contenido de proteína será mayor y viceversa.

La calidad de una proteína, se puede conocer teóricamente al comparar la proporción de los distintos aminoácidos indispensables que contiene con una combinación de referencia recomendada por la FAO, llamada proteína ideal, porque -- tiene una proporción de aminoácidos que teóricamente tendría un 100% de utilización; esta comparación de la proteína del micelio de Pleurotus ostreatus obtenido de la fermentación del medio VIII, se encuentra en la tabla No. 20, la que revela que contiene todos los aminoácidos esenciales con las siguientes diferencias importantes por notar:

- Contiene la mitad del triptofano requerido, por lo que viene a ser un aminoácido limitante (aminoácido que está en menor cantidad de acuerdo a las necesidades del organismo y que restringe la utilización de los demás).

- Contiene un 0.73 de la metionina requerida.

- Con respecto a la fenilalanina que es muy elevada, le proporciona una ventaja que es utilizar este micelio o su proteína para suplemento de otra proteína - en la que este aminoácido fuera el limitante .

Como la proteína real que más se aproxima a la proteína ideal es la que contiene el huevo entero, y que es recomendada también por el Comité Mixto de Expertos de FAO/OMS para que sea utilizada como proteína de referencia, se proporciona la tabla No. 21 en la que la comparación resulta bastante homogénea, exceptuando en el triptofano, y además se puede comparar con las proteínas de otros productos vegetales y animales.

CONCLUSIONES Y RESUMEN

CONCLUSIONES

En las fermentaciones a nivel industrial, el conocimiento de los requerimientos nutricionales del microorganismo que se utilice es fundamental para poder hacer deducciones acertadas sobre la probable composición química adecuada de un sustrato cualquiera, de aquí la importancia de dos de las conclusiones de este trabajo como son:

- El requerimiento de \pm 1500 mg. de nitrógeno por litro de medio, y - si el aspecto económico no es el factor limitante, que una fuente orgánica de nitrógeno, como es la cola, es más satisfactoriamente empleada que una fuente inorgánica.

- El requerimiento de una concentración de 1.4-1.8 g% de azúcares reductores para un mejor rendimiento de micelio del hongo en 100g. de azúcares.

Por lo que se refiere a estos puntos, se recomienda que, para estudios posteriores sobre el tema, se prueben otras concentraciones de cola y de azúcares reductores por arriba y por abajo de las mencionadas, sin alejarse demasiado de ellas.

La conclusión principal obtenida de este trabajo es que el Medio de Sulfato de Amonio (IV) es el mejor, según se explicó anteriormente al discutir los resultados anotados en la tabla no. 18, encontrándose además las siguientes ventajas:

- 1.- Un menor costo de producción por lo que se refiere a un tiempo de fermentación y al costo del sulfato de amonio.
- 2.- Por la disponibilidad y constancia de pureza del sulfato de amonio.

La validez de estos resultados es restringida en su reproducibilidad debido a las condiciones imperantes en el desarrollo de este trabajo como son: variaciones imprevisibles de temperatura, de agitación, de inoculación y el uso de varios matrazes y no de un solo líquido para las determinaciones.

Con respecto al aspecto nutricional de Pleurotus ostreatus, aunque el análisis de su proteína sea bastante satisfactorio, es desafortunado que en la literatura no existan reportes concernientes al valor biológico de la proteína del micelio de hongos. Es de señalarse que hay una verdadera necesidad de esta información antes de que sea posible concluir que el micelio de hongos pueda usarse como suplemento alimenticio.

RESUMEN

Este trabajo se llevó a cabo con el fin principal de producir en forma masiva y en cultivo sumergido a Pleurotus ostreatus para ser utilizado como fuente proteica barata para soliviantar en algo el problema de la desnutrición en México. Para ello, se usaron en su cultivo substratos baratos como: cola, sulfato de amonio, licor de cocimiento de maíz, etc., como fuentes de nitrógeno, melazas como fuente de energía y agua de mar diluída 1:3 para evitar la adición de sales minerales.

Con el objeto de llevar a cabo la selección del mejor medio de cultivo, - desde el punto de vista económico, se efectuaron fermentaciones con los diferentes - medios, y se les determinó rendimiento de micelio y consumo de azúcares para hacer una comparación posterior de los resultados obtenidos, no basándose en el comportamiento metabólico observado según las curvas obtenidas al graficar g% de sacarosa consumida vs. g% de micelio producido, ya que de esta forma la conclusión es que - el mejor de los medios es el de Cola 1% (III), pero al considerarse la economía como el factor limitante de este trabajo, la comparación se basó en el rendimiento de - micelio en gramos por cada 100 gramos de sacarosa suministrada, de lo cual se puede deducir que el medio de Sulfato de Amonio (IV) es el mejor.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Lowenberg, M.E., et. al.
Food & Man
John Wiley & Sons, Inc.
New York (1968).
- 2.- I.N.N. Encuestas Nutricionales en México (1963).
- 3.- Lapedes, D.N.
Helpfull Microorganisms.
The World Publishing Co.
Cleveland, Ohio (1968).
- 4.- I.N.N. Importancia de las Mezclas Protéicas. Boletín de Educación. División de Nutrición. II, 12, (1969).
- 5.- Saiba, Humprey, A. E. & Millis, N.S.
Biochemical Engineering
1st Ed.
Academic Press
New York (1965).
- 6.- Verna, L.C., Herrero, I.J.
Micología
Ed. Ateneo.
México (1952).
- 7.- Pilat, A.
Mushrooms.
Spring Book.
London, N.Y.
- 8.- Herrera, T., Guzmán, G.
Principales Hongos Comestibles de México. Taxonomía y Ecología.
An. Inst. Biol. Mex. XXXII.
Mex. (1961)

- 9.- Pepler, H.J.
Microbial Technology
Reinhold Publishing Co.
New York (1967).
- 10.- Foster, J.W.
Chemical Activities of Fungi
Academic Press Inc. Publ.
New York (1949).
- 11.- Hahn, P.A.
Chemicals from Fermentation
Doubleday & Co. Inc.
New York (1968).
- 12.- Solomons, G.L.
Materials & Methods in Fermentation.
Academic Press
New York (1969).
- 13.- Altschul, A.
Processed Plant Protein Foodstuffs
Academic Press Inc.
New York (1958).
- 14.- Dueñas, M.R.
Monografía de Cola y Grenetina
Tesis. U.N.A.M. (1968).
- 15.- Humfeld, T.F., Sugihara, F., Mushrooms Mycelium Production
by Submerged Propagation. Western Research Lab. Albany, --
California, Food Tech. 3, 355, (1949).
- 16.- Litchfield, J.H., et. al. J. Agr. Food Chem, 11, 158, (1963).
- 17.- Prescott, S.C., Dunn, C.G.
Industrial Microbiology
3rd Ed.
Mc Graw Hill Book Co. Inc.
New York (1959).

- 18.- Horwitz W. Ed.
Official Methods of Analysis of the Association of
Analytical Chemists.
11th Ed.
Washington, D.C. (1970).
- 19.- Bateman, J.V.
Nutrición Animal. Manual de Métodos Analíticos
Herrero Hermanos Sucesores, S.A.
México, (1970).
- 20.- Underkoffler, L.A., et. al. Semimicromethod for the
Determination of Reducing Sugars in Fermentation Media.
Iowa State College. J. Sci. 17, 251-56 (1943).
- 21.- Shaffer, P.A. & Somogy, M. Copper-iodometric reagents
for Sugar Determination. J. Biol. Chem. 100, 695-713,
(1933).
- 22.- The Pharmacopeia of the United States of America.
18th Revision.
Mc. Publishing Co.
Easton, PA. (1970).
- 23.- Society of American Bacteriologists.
Manual of Microbiological Methods.
Mc Graw Hill Book Co. Inc.
New York (1957).
- 24.- Gray, W.D.
The Use of Fungi as Food.
Butterworth & Co.
London (1970).
- 25.- Humfeld, H. & Sugihara, T. The Nutrient Requirements of
A. campestris Grown in Submerged Culture, *Mycology*, 44,
(5): 605-620, (1952).
- 26.- Osol, A., et al. Ed.
The Dispensatory of the United States of America
J.B. Lippincott
Philadelphia (1951).

- 27.- FAO, Nutritional Studies No. 16, Food & Agricultural Organization of the United Nations. Rome (1957).
- 28.- Hawk, P.B., et al.
Química Fisiológica Práctica.
Ed. Interamericana, S.A.
México (1949).
- 29.- Summer, N.L.
Selected Papers on Desalination & Ocean Technology.
Dover Publications Inc.
New York (1968).
- 30.- Tresner, H.D., Hages, J.A., Sodium Chloride Tolerance of Terrestrial Fungi. (Lederle Lab. Div., Am. Cyanamid Co., Pearl River, N.Y.), *Appl. Microbiol*, 22, 210-213, (1971).