



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**CRECIMIENTO EN CULTIVO SUMERGIDO DE
AGARICUS SP. CON FINES BROMATOLOGICOS**

189

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

JOSE MARIO GAYTAN ALCOCER

1976



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

CLASE Tesis
AÑO 1976
FECHA Mt

191



QUINDÍO

JURADO ASIGANDO ORIGINALMENTE SEGUN
EL TEMA:

PRESIDENTE	NATALIA SALCEDO OLAVARRIETA
VOCAL	CARLOS DEL RIO ESTRADA
SECRETARIO	ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN
1er. SUPLENTE	CATALINA OROZCO VICTORIA
2do. SUPLENTE	JORGE SOTO SORIA .

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD
DE QUIMICA .

SUSTENTANTE:

JOSE MARIO GAYTAN ALCOCER

ASESOR DEL TEMA:

DR. CARLOS DEL RIO ESTRADA .

Está en nuestro poder hacer un mundo bueno

¡ Que otros tengan éxito donde mi generación fracasó ¡

BERTRAND RUSSELL .

Sigue tu naturaleza y verás al Tao

Ten paz, cesa de preocuparte

A MIS QUERIDOS PADRES

Y A TODA MI FAMILIA

A MI COMPAÑERA LEONOR.

MI RECONOCIMIENTO Y ADMIRACION AL
CIENTIFICO: DR. CARLOS DEL RIO E .

MI CARIÑO Y SIMPATIA AL HOMBRE;
CARLOS DEL RIO ESTRADA .

MI AGRADECIMIENTO A:

LOS MICOLOGOS DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA DE LA UNAM, POR SU VALIOSA Y DESINTERESADA COLABORACION.

A LA COMPAÑIA COMERCIAL "HONGOS DE MEXICO, S.A.", POR HABERME BRINDADO SU AYUDA PARA EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

CONTENIDO

CAPITULO	I	INTRODUCCION
	II	GENERALIDADES
	III	MATERIALES Y METODOS
	IV	RESULTADOS EXPERIMENTALES
	V	RESUMEN
BIBLIOGRAFIA		

INTRODUCCION

OBJETIVO DE LA TESIS .

Obtener un alimento conocido, de buena calidad desde el punto de vista nutricional, abundante y barato, en un mínimo de tiempo, a partir de materia prima disponible y costeable .

La innovación propuesta en esta tesis para el desarrollo y crecimiento del hongo conocido como champiñón (Agaricus campestris), es la de evitar fundamentalmente su lento cultivo en grandes extensiones de terreno que suponen atmósferas controladas (humedad, temperatura y obscuridad para inhibir el crecimiento y competencia por la asimilación de nutrientes del medio, por parte de vegetales fotosintéticos) y el contacto con estiércol, que siempre implica una posible infección con el bacilo del tétanos (Clostridium tetani).

En la antigüedad, aunque eran escasos los conocimientos - que de los hongos se tenían, estos eran considerados alimentos finos y selectos. En los tiempos de los emperadores romanos, era muy buscada Amanita caesarea (16), la cual en opinión de muchos expertos es la mejor de todas las setas y algunos la denominan "reina de las setas".

La verdadera oronja también llamada así vulgarmente, es excelente al paladar y se puede diferenciar fácilmente de otro tipo de amanitas (la mayoría de ellas venenosas), por su sobrerillo anaranjado de bordes estriados, lamelas, anillo y pedicelo de color amarillo más o menos acentuado. La volva, blanca, de bastante espesor, es la más carnosa de las volvas de amanitas.

En 1601 aparece el primer tratado de micología, impreso en Amberes por el flamenco Charles de L'Ecluse (cuyo seudónimo era Carolus Clusius) y titulado: "Fungorum in Pannoniis observatorum brevis Historia". Clusius vivía en Viena, en la corte de Maximiliano II, como director de los jardines imperiales.

En México, también existe una importante tradición etnomicológica, debido a que desde tiempos prehispánicos, ya eran utilizados los hongos por los indígenas para su alimentación, medicina y en las festividades de carácter religioso. (7)

En Náhuatl, a los hongos se les daba el nombre genérico de Nanácatl (que significa carnes).

Hay diversos documentos que prueban que los indígenas de la época prehispánica rendían un culto muy especial a los hongos alucinantes.

Fray Bernardino de Sahagún en su "Historia General de las cosas de la Nueva España" nos habla sobre la existencia del "Honggo divino o Teonanácatl", encontrándose en su obra cuatro pasajes en los que menciona brevemente a los hongos alucinantes. En una de ellas indica "que el Teonanácatl se crea bajo el heno, en

los campos, que es un hongo redondo de pie alto, de mal sabor, y que al ser comido daña la garganta y emborracha; comido en gran cantidad, provoca lujuria y visiones" .

Fray Bernardino, también hace mención de la utilidad de los hongos alucinantes en la medicina, indicando "que son medicina para la calentura con frío y para la gota" .

Fernando de Alvarado Tezozómoc, en su "Crónica Mexicana", y Diego Durán en su "Historia de las Indias de Nueva España", hablan sobre las festividades religiosas que realizaba Moctezuma II, en las que mencionan el gran consumo de hongos alucinantes que en éstas se hacía .

Gaspar de Cobarrubias, en la "Relación de las Minas de Temazcaltepec", indica también el uso de los hongos en esta región, con los que la gente se emborrachaba . Menciona, como dato curioso, que los indios tenían la costumbre de pagar el tributo a su Señor con fibra de henequén y hongos, con los que el pueblo se embriagaba, fiesta que en otomí recibe el nombre de "intzacho-chui" .

En los testimonios de los archivos de la inquisición, se comprueba que los hongos alucinantes siguieron siendo utilizados después de la conquista española .

Dichos hongos fueron utilizados también en Michoacán, donde los llamaban "caniqua tenequa" . Los Zapotecas, los llamaban Feacéo, y los Mixtecas, Max-Mux .

Recientemente, el Dr. Alfonso Caso ha dado una reinterpretación a las páginas 24 y 25, del Código Vindobonensis, en la cual indica que en las representaciones (de éstas páginas) se observa una junta de los dioses del panteón mexicano, los cuales se encuentran reunidos en una festividad de hongos .

Por otro lado, los informantes de Sahagún, en el "Códice

Florentino" mencionaron y describieron varios hongos comestibles y venenosos, indicando, por si esto fuera poco, los remedios utilizados para contrarrestar los efectos de los venenosos. Indicaron, que los hongos del bosque no son comestibles sin cocer, pero que bien cocidos son muy sanos. Hicieron mención de que cualquiera clase de hongo comido crudo, causa indigestión.

Entre los hongos que ellos describieron encontramos los siguientes:

Tzonteconanácatl.- Hongo redondo y grande.

Xelhuaznanácatl.- Tiene el cuerpo dividido, cilíndrico y escarificado, como algo hendido.

Chimalnanácatl.- Es redondo, como los nenúfares (especie acuática de la fam. Ninféáceas (8)); llega a tomar una forma de escudo o de tortilla. Indica el texto que todos los hongos de este tipo son comestibles. Crecen en los bosques y todos son muy duros; para comerse necesitan estar bien cocidos, y son muy sanos.

Menanácatl.- Es redondo, blanco como las ostras y frágil. Se indica que se utilizaba como remedio, sin especificar contra qué enfermedad, y que es comestible y muy sabroso.

Zacananácatl.- El tallo es largo, delgado y oscuro; la cabezuela es verticilada y aplanada. Es comestible y sabroso y se indica que es un remedio. Crece en el pasto, únicamente cuando llueve.

Cuahnanácatl.- Crece en los bosques, es comestible ya sea cocido o asado.

Alonso de Molina, en su "Vocabulario en Lengua Castellana y Mexicana" publicado en 1571 (según Heim R., 1963), da nombres a cinco especies de hongos:

Xochinanácatl ("Hongo Flor").

Tepexinanácatl ("Hongo de Montaña").

Ixtlahuacan nanácatl ("Hongo de praderas").

Mazahuacan nanácatl ("Hongo de los lugares que frecuentan los ciervos").

Teyhuinti nanácatl ("Hongo que emborracha").

Francisco Hernández relata, con cierta extensión, la utilización de los hongos entre los indígenas; habla de la existencia de numerosas y variadas especies de hongos; a algunos de los hongos les anota el nombre de Citlananacame ("Hongo de estrella"), los cuales son mortíferos. También cita la existencia de hongos comestibles, a los que les da el nombre de Iztacnanacame ("Hongos blancos"). Habla además de las variadas coloraciones de los hongos, así como de sus diversas formas y tamaños; a los hongos rojos les da el nombre de Tlapalnanacame y a los amarillos de Chimalnanacame.

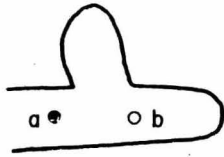
En varios documentos indígenas, se indica que éstos utilizaban las tortillas enmohecidas para la curación de las heridas, con muy buenos resultados, de manera que, aparentemente, el uso de la penicilina se había ya iniciado en una forma empírica. Los mayas también usaban en forma empírica Penicillium con el nombre de "cuxum".

En su "Contribución al Conocimiento de la Nomenclatura-Micológica Náhuatl" (15), Rafael Martín del Campo, nos habla de los múltiples nombres vernáculos, empleados para designar a las especies mexicanas de hongos macroscópicos. Por el interés de este trabajo solo mencionaremos a los hongos que sean comestibles.

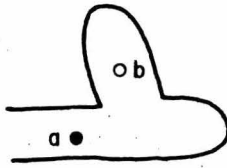
NOMBRE EN NAHUATL	NOMBRE CIENTIFICO
Cazahuate	<u>Pleurotus ostreatus</u>
Huitlacoche (de cuitlacoche)	<u>Ustilago maydis, U. zeae</u>
Chana	<u>Boletus felleus</u>
Chichiman	<u>Amanita caesarea</u>
Chilnanacate	<u>Hypomyces lactifluorum y H. - macrosporus</u>
Chilpan	<u>Lactarius deliciosus</u>
Elote (de olotl)	<u>Morchella esculenta</u>
Iztacnanácatl	<u>Russula delica</u>
Mazayel	<u>Boletus edulis</u>
Pípila (de pipiltin)	<u>Agaricus silvaticus</u>
Sopitza (de xopitzactli)	<u>Armillariella mellea</u>
Tachalotito	<u>Amanita calyptroderma</u>
Totopixtle	<u>Russula delica</u>
Yotito (de yoyotli)	<u>Agaricus campestris</u>

YOTITO es el diminutivo castellano de la contracción de yoyotli, la cual significa (según Molina) "cascabel de árbol", fruto también llamado codo de fraile.

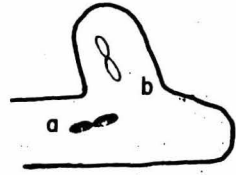
GENERALIDADES .



I



II



III



IV



V

Fig. 1.- Formación de ffbulas en algunos micelios secundarios de los Agaricales.

Como se ha visto, desde tiempos remotos el hombre ha estado interesado por esta clase de vegetales. Los hongos pueden desarrollarse a expensas de organismos vivos o de sustancia orgánica en descomposición; en el primer caso consiguen vivir solamente si hay una planta huésped (herbácea o arbórea) con la cual unen íntimamente sus filamentos de micelio a las raíces superficiales o profundas; esta unión o asociación, que se realiza mediante órganos especiales llamados "micorrizas", constituye la simbiosis de tipo nutricional, por medio de un mecanismo complejo.

En el segundo caso el hongo puede vivir y desarrollarse a expensas de sustancias orgánicas en descomposición, es decir, en forma saprofítica.

También desde otro punto de vista los hongos se pueden clasificar por su tamaño. Los hongos macroscópicos (como el champiñón) taxonómicamente corresponden a los basidiomicetes (8), cuyos esporofitos contienen micelios pluricelulares con membranas muy ricas en quitina.

Son heterótrofos y sus esporas denominadas basidiosporas (forma de reproducción sexual), se forman sobre hemibasidios o basidios. Además de la reproducción sexual por basidiosporas, esta clase de hongos pueden también multiplicarse asexualmente por conidios. El micelio de algunos basidiomicetos pasa por tres estadios diferentes de desarrollo (1), el primario, el secundario y el terciario, antes de que el hongo complete su ciclo de vida.

Un mecanismo interesante de reproducción ha sido encontrado en una gran mayoría de basidiomicetos, aunque no en todos, este mecanismo garantiza la aparición de dos células hijas durante la división celular. Y cuenta con unas estructuras especializadas llamadas fíbulas (los micelios secundarios de los agaricales pueden o no presentar fíbulas (20), por ejemplo *Agaricus campestris* a veces las presenta pero otras veces no (1), las cuales se forman (como se esquematiza en la fig. 1) durante la división nuclear.

Clasificación taxonómica de Agaricus campestris,

según el sistema de Engler- Dills (27).

REINO	DIVISION	CLASE	SUBCLASE	ORDEN	FAMILIA	TRIBU	GENERO	ESPECIE
		Phycomycetes						
		Ascomycetes						
			Hemibasi- diomycetidae	Agaricales	Agaricaceae	Agariceae	Agaricus	
Vegetal	Eumycetes	Basidiomyce- tes	Protobasi- diomycetidae					<u>A. campes- tris.</u>
			Autobasidio- mycetidae					<u>A. sp.</u>
		Hongos imperfectos						

Un trabajo muy interesante fue realizado en el microscopio electrónico por Moore y Mc Alear (17) en 1962. Ellos estudiaron Ascomycetes, Deuteromycetes y Basidiomycetes, y encontraron que el micelio secundario de los Basidiomycetes estudiados, presentaba una estructura notablemente distinta de las de los micelios secundarios de los Ascomycetes y Deuteromycetes. A dicha estructura la llamaron septodoliporo (L. dolium - recipiente grande).

Agaricus campestris sí la presenta, pero dicha estructura será reconocible, siempre y cuando la preparación sea excelente, y solo será observable al microscopio electrónico.

EL CHAMPIÑÓN.

La especie de hongo más cultivada en todo el mundo es el champiñón, seta Agaricus campestris (Psalliota campestris, Pratella campestris) (3), vulgarmente conocida con los nombres de "yotito" en Náhuatl, "pan de lobo", "robahielos" y, en catalán "Girgola blanca" y "Camperol", que se encuentra en forma espontánea en los jardines, campos no cultivados, bosques y prados, sobre el estiércol, en parajes húmedos, desde el principio del verano hasta mediados del otoño.

Tiene forma de sombrerillo hemisférico, convexo, grueso, de fondo blanco y recubierta por un cierto número de ligeras escamas de matiz rojo castaño lo cual le da un notable contraste.

De laminillas (o lamelas) dentadas, ventradas, frágiles, libres, de color blanco rosáceo en principio, que se oscurecen luego hasta el negro. Alcanzan diámetros de 10-15 cm. y alturas hasta de 12 cm.

El pedicelo es grueso, más bien corto, cilíndrico, liso, macizo, membranoso, de poca consistencia, anillado en sus dos tercios y de color blanco. Sin volva.

Su carne blanca en un principio, va cambiando de matiz -

al contacto con el aire, debido a oxidaciones de tipo enzimático- (tirosinasas, fenil oxidasas, etc.), de exquisito sabor y olor agradable.

Ninguna Psalliota es francamente tóxica (16), una sola ingesta, Agaricus xanthoderma.

Otra, Psalliota radicata, no es tolerada por algunas personas, a las cuales les provoca afecciones gastrointestinales.

Desde el punto de vista dietético, los champiñones representan un alimento de notable valor nutritivo, tanto por su alto contenido proteínico (37.52% de proteína (N x 6.25, en peso seco)), como por el complejo vitamínico: Tiamina, Riboflavina, Nicotinamida, Ac. Pantoténico y Ubiquinonas (Co Q) (4.10, 4.22, 4.25), así como sales minerales, el fósforo es abundante en los champiñones frescos y jóvenes (más de 130 mg/100 g de peso fresco), conteniendo también: fierro, azufre, magnesio, potasio, cobre, zinc, cobalto y en menor cantidad calcio (3).

Los champiñones frescos son ricos en ácidos orgánicos (4.9) (málico, cítrico, succínico, fumárico, isocítrico, carboxilpirrolidona. Se ha encontrado el ác. málico en proporción mayor en el carpóforo), muy importantes en la activación de los procesos respiratorios.

Durante muchos años se ha practicado el cultivo de los hongos o setas, en especial la del champiñón. La producción del champiñón de cama o psalliota se realiza utilizando un medio de cultivo creado artificialmente con el auxilio de estiércol dispuesto en montones. Estos montones son instalados en cuevas o cuartos diseñados ex-profeso.

Cualquiera que sea el local elegido, es indispensable tener en cuenta su temperatura, que para permitir una fructificación conveniente, no debe bajar de 8 grados centígrados (3), manteniéndose de preferencia, entre 12 y 15 grados, aún pudiendo alcanzar

los 19 o 20 grados. Al mismo tiempo, se vigilará la ventilación, - que debe a la vez permitir la renovación del aire y mantener en - la superficie del montón una humedad suficiente. Si esta no fuera suficiente, convendría rociar diario con un vaporizador.

El cultivo en cajoneras se puede realizar en primavera. - Después de haber igualado la superficie de la cama, se procede a la introducción de la "semilla" o blanco de champiñón (micelio - del hongo sobre el grano de algún cereal, como el trigo por ejemplo) en pequeñas placas, a 5 cm. de profundidad, dispuestas a 12- ó 15 cms. de distancia en todos sentidos. Se rellenan los agujeros de plantación comprimiendo ligeramente la superficie del suelo. - Regulando la aireación, se pueden recoger los primeros champiñones entre dos y tres meses más tarde.

Como se mencionó anteriormente el objetivo primordial de éste trabajo es el desarrollo de hongos comestibles (Agaricus), por un procedimiento mucho mas rápido y económico, que el método - clásico descrito anteriormente, a base de usar cámaras húmedas - que ocupan un gran espacio, utilizando más tiempo.

En 1947, Humfeld y Sugihara (10, 11, 12, 13) sugirieron - que el micelio de las setas también podría tener valor alimenticio - y se descubrió que ciertas cepas de la seta A. campestris podían desarrollarse en un medio de cultivo sumergido, con agitación y - aeración.

Estos investigadores trabajaron con varias cepas seleccionadas de A. campestris.

Especies de setas desarrolladas en un cultivo
sumergido sobre medio sintético. (18)

ESPECIE	NUM. DE CULTIVO ¹	ORIGEN ²	CARACTERISTICAS DE DESARROLLO	RENDIMIENTO g. DE MATERIA SECA/100 g. DE GLUCOSA
<u>Agaricus campestris</u> (var. blanca).....	M5; NRRL 2334	F	Disperso, hay esporas	55-60
<u>A. campestris</u> (var. crema).....	M16; NRRL 2335	H	Disperso, hay esporas	40-50
<u>A. campestris</u> (var. blanca).....	M28; NRRL 2336	G	Disperso, hay esporas	45-55
<u>A. placomyces</u> ...	M86	A	Disperso, hay esporas	50-60
<u>A. rodmanii</u>	M21	B	Colonias granulares	30-40
<u>Armillaria mellea</u> .	M6	E	Disperso, hay esporas	50-60
<u>Cantharellus cibarius</u>	M83; NRRL 2370	A	Colonias granulares	20-30
<u>Collybia umbulata</u> ..	M82	A	Colonias granulares	20-30
<u>C. velupites</u>	M70; NRRL 2367	D	Colonias granulares	30-40
<u>Coprinus comatus</u>	M46	B	Disperso, hay esporas	40-50
<u>C. comatus</u>	M67	D	Disperso, hay esporas.	40-50
<u>Hebeloma sinapizans</u>	M84	A	Colonias granulares	20-30
<u>Lepiota naucina</u>	M73; NRRL 2368	C	Colonias granulares	40-50

<u>L. procerum</u>	M44	B	Colonias granulares	40-50
<u>L. rachodes</u>	M76	A	Disperso, hay esporas	40-50
<u>Lycoperdon umbrinum</u>	M85; NRRL 2372	A	Colonias granulares	20-30
<u>Morchella sp.</u>	M34	C	Colonias granulares	40-50
<u>M. crassipes</u>	M37; NRRL 2369	C	Colonia granulares	40-50
<u>Pleurotus ostreatus</u>	M69; NRRL 2366	B	Colonias granulares	40-50
<u>Polyporus sulphureus</u>	M72	D	Colonias granulares	30-40
<u>Psilocybe sp.</u>	M77	A	Colonias granulares	30-40
<u>Schizophyllum commune</u>	M71	D	Colonias granulares	30-40
<u>Tricholoma nudum</u>	M81; NRRL 2371	A	Disperso, hay esporas	40-50

(22) Sugihara, T. F. y Humfeld, H. Appl. Microbiol., 2 (3): 170 (1954).

1 Las cepas designadas con NRRL están en la colección de cultivos de la U.S. Northern Utilization Research and Development División, del Departamento de Agricultura de EE.UU., y las iniciales corresponden a las palabras: Northern Regional Research Laboratories, en Peoria, Illinois.

Origen:

- A, recogido por los autores. (Humfeld y Sugihara).
B, S. Bellici, San Francisco, Calif.
C, J.W. Sinden, Pennsylvania State College, State College, Pa.
D, R. Davidson, Bureau of Plant Industry, Departamento de Agricultura de EE.UU. Beltsville, Md.
E, P.A. Ark, Departamento de Fitopatología, Univ. de Calif., - Berkeley, Calif.
F, Cave Mushroom Co., Santa Cruz, Calif.
G, G. Kennedy, Redwood City, Calif.
H, I.J. Hutchings, H.J. Heinz Co., Pittsburgh, Pa.

La técnica de cultivo sumergido se justifica, ya que los microorganismos que normalmente se desarrollan lentamente en medio sólidos (Saboraud, Czapeck, papa-dextrosa-agar, agar-malta, etc.), cuando se ubican en medios líquidos con agitación mecánica y aeración (siempre y cuando sean aerobios), se desarrollan en corto tiempo, asimilando más rápido los nutrientes del medio y eliminando sus productos de desecho eficazmente. De ahí la gran economía en tiempo para el desarrollo fúngico, además del ahorro de espacio y de personas encargadas del control en dicho proceso.

VALOR NUTRITIVO.

El siguiente estudio realizado por los mismos investigadores pone de manifiesto el valor alimenticio del micelio de A. campestris cultivado por la técnica de cultivo sumergido.

Datos comparativos de la composición bioquímica de los micelios de setas (A. campestris) desarrolladas por propagación sumergida y las cultivadas comercialmente (18).

(Referido a producto seco)

Componentes	MICELIOS DE CULTIVO SUMERGIDO		CULTIVO USUAL
	setas, var. blanca, %	Setas, var. oscura, %	Setas comerciales %
Proteínas (N x 6.25) ..	35.00	45.3	37.52
Grasas (extracto etéreo)	3.3	-	1.81
Extracto no nitrogenado (carbohidratos y almidones)	48.8	-	38.19
Fibras	6.92	-	10.38
Cenizas	4.59	5.24	12.00
Calcio	0.123	0.106	0.023
Fósforo	1.28	1.24	1.42
Fierro	Indicios	Indicios	0.019

Contenido de vitaminas del complejo B del micelio de seta, setas comerciales, levadura y trigo expresados en mg/100 g de peso seco (18).

Vitamina	<u>Agaricus blazei</u>	Setas blanca oscura		Setas comerciales de <u>A. campestris</u>	Levadura <u>Torula</u>	<u>S. cerevisiae</u>	Trigo.
Tiamina.....	0.2	0.9	0.9	1.2	0.7-4.2	10	0.58
Riboflavina.	3.4	4.7	9.0	5.2	2.4-4.7	5.8	0.16
Nicotinamida.....	14.6	19.0	29.0	58.0	37-69	39.0	4.8
Ac. pantoténico.....	6.9	-	-	23.0	10-18	-	-

Aminoácido	<u>Agaricus</u> <u>campestris</u>	<u>Pleurotus</u> <u>ostreatus</u>	<u>Tricholoma</u> <u>nudum</u>	Proteína Ideal (FAO)
Alanina	-	6.51	-	-
Arginina	6.49	5.37	4.63	-
Ac. aspártico	-	9.49	-	-
Cistina	-	-	-	-
Ac. Glutámico	-	10.96	-	-
Glicina	-	4.79	-	-
Histidina	-	2.43	2.96	-
Isoleucina	14.7	3.99	3.15	4.2
Leucina	7.7	8.39	6.6	4.8
Lisina	-	5.38	6.6	-
Metionina	4.64	1.61	1.66	2.2
Fenilalanina	-	15.93	3.70	2.8
Prolina	-	4.86	-	-
Serina	-	5.64	-	-
Treonina	-	5.08	3.70	2.8
Triptofano	1.64	0.74	3.52	1.4
Tirosina	-	3.54	-	-
Valina	10.5	4.73	3.89	4.2

Tabla comparativa del contenido de Aminoácidos de Agaricus campestris con otros hongos y la Proteína Ideal de la FAO (?). De acuerdo con la -FAO, una proteína ideal es aquella que reúne la mayor parte de los amino-ácidos esenciales. La composición se expresa en g/100 g de nitrógeno-total.

Técnicas de fermentación en cultivo sumergido.-

Las técnicas más comunes del cultivo sumergido para escala de laboratorio son dos: con y sin agitación mecánica.

A.- Con agitación mecánica.- Ya sea por máquinas agitadoras o propulsores (como por ejemplo, la agitadora de tipo New Brunswick con capacidad para 40 matraces de 350 ml, a 160 r. p. m., y temperatura, 30° C).

B.- Sin agitación mecánica.- Pasando corrientes de aire, previamente esterilizado (a través de filtros por ejemplo), con el objeto de mantener las partículas de crecimiento en movimiento - continuo dentro del líquido de cultivo.

Se han proyectado gran variedad de fermentadores para utilizarlos en fermentaciones sumergidas en escala de laboratorio, instalación semipiloto y piloto.

La aeración y transferencia de oxígeno, es de extraordinaria importancia en el abastecimiento adecuado de oxígeno a la célula, durante la fermentación. También la esterilización del aire es esencial en la mayoría de las fermentaciones.

Regulación de la formación de espuma.- En la mayoría de las fermentaciones en cultivo sumergido es necesario regular la formación de espuma. La espuma se puede eliminar utilizando agentes antiespumantes químicos, dispositivos mecánicos antiespumantes y otros métodos diversos (18).

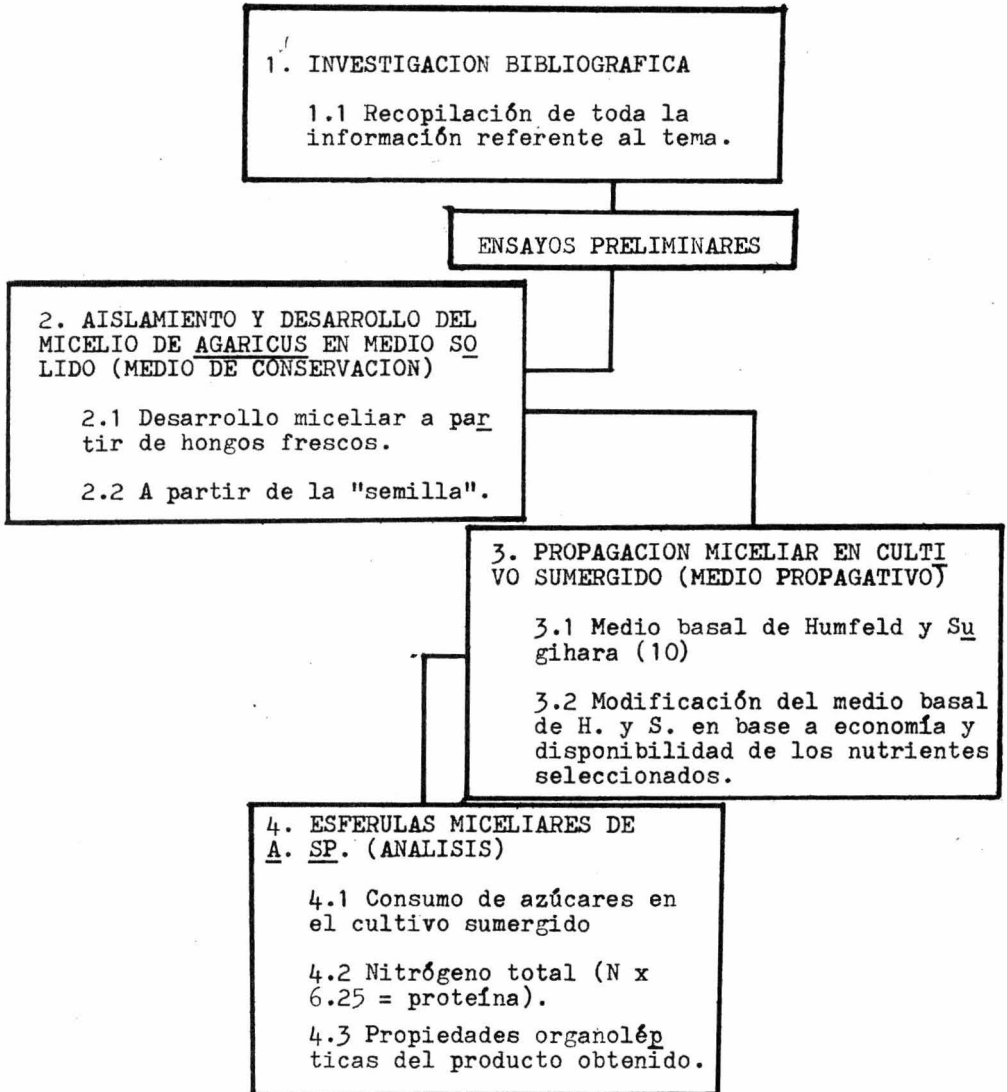
Regulación del pH.- Aunque algunas fermentaciones se verifican sin necesidad de regular el pH, se estima que en la mayor parte de los casos se logran mejorar mucho los rendimientos usando un pH controlado continuamente.

Otros tipos de dispositivos de control.- En diversas fases -

de las industrias de fermentación se utilizan cierto número de dispositivos de control variados, tales como reguladores de temperatura, reguladores de presión, medidores de flujo, analizadores de \bar{O} y CO_2 , y registros automáticos de oxidación - reducción (18).

MATERIALES Y METODOS

ESPECIFICACION DE OBJETIVOS GENERALES DE LA TESIS



Material Biológico: Hongos frescos (champiñones), hifas-impregnando cereales ("semilla") de A. campestris, proporcionada por Hongos de Méx. S.A.

Equipo: Matraces erlenmeyer de 300 ml bafleados según Solomons (23).

Matraces de Kjeldahl de 30 ml.

Colorímetro Fotoeléctrico de Klett-Summerson.

Potenciómetro (pH. meter E512, Metrohm Herisau)

Agitador rotatorio Leland Motor de 24 matraces

Cutler-Hammer de 40 matraces

Bomba de vacío H.O. Velman.

Espectrofotómetro PM Q II.

ENSAYOS PRELIMINARES EFECTUADOS.

I.- TECNICAS PARA OBTENCION DE ESPORAS.-

Hay una gran variedad de métodos para la obtención de esporas de los hongos (4.11, 18) y una vez obtenidas se hacen las observaciones siguientes:

- a) Forma de las esporas .
- b) Tamaño (máximo, medio y mínimo).
- c) Color.
- d) Características y distribución .

En esta tesis solo se hicieron los métodos que presentaban menor grado de dificultad en el aspecto técnico, debido a la escasez de material de laboratorio (material de vidrieria, instrumental adecuado como micromanipulador, etc.).

A.- Método de la caja doble.

Material Biológico: Hongos maduros (Champiñones).

Material y Reactivos:

2 cajas de 20 x 30 cms. (pueden ser de cartón, madera o cualquier otro material accesible).

cajas de petri

Vasos de precipitado.

probeta graduada

Sol. de benzalconio al 50% o en sol. de mertiolato diluída con agua.

Metodología:

En una de las cajas de cartón o de madera se introducen en el fondo 2 ó más cajas de petri sin tapadera, en la tapa de la caja se practicarán dos agujeros algo más pequeños que el pñleo de los hongos que se van a utilizar, y dichos agujeros estarán separados unos cuantos cms. con el objeto de que las esporas que se van a recibir en las cajas de petri no se mezclen. Una vez realizado esto, los hongos se barnizan con la sol. de benzalconio o de mertiolato y se introducen en la tapa donde se han practicado los dos agujeros, posteriormente, se coloca sobre esto otra tapa la que se sella con cinta adhesiva o masking tape (Ver. fig. 2).

Todas las cajas se esterilizaron previamente en el horno a 160° C durante 1 hora y los hongos fueron barnizados con soluciones desinfectantes para evitar dentro de lo posible una contaminación bacteriana o fúngica.

Las cajas se colocan a una temperatura de 28 a 30°C por espacio de 1 a 2 semanas, después de esta incubación los hongos Agaricus que previamente se habían comprado maduros, deberán soltar las esporas, las cuales caerán en las cajas de petri.

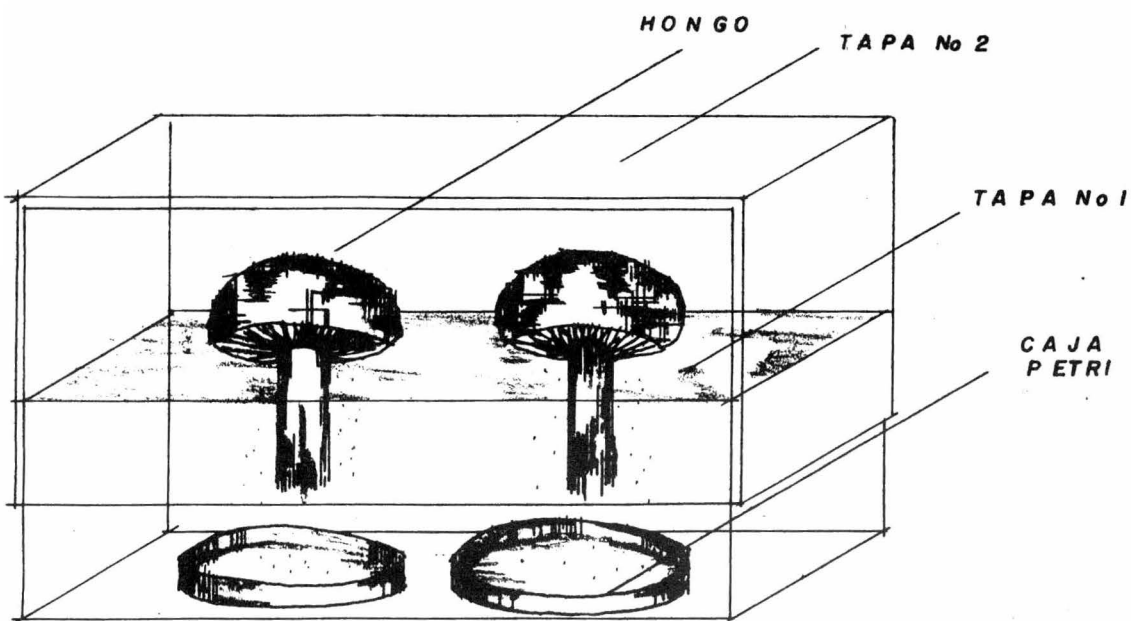


Fig. 2.- Ilustración representativa del método de la doble caja.

B.- Método del vaso.

Material Biológico: Champiñones maduros.

Material y Reactivos:

Recipiente de material transparente (plástico, vidrio, etc) que sea lo suficientemente grande como para que un vaso común - quepa dentro de él.

Cartoncillo blanco

Sol. de benzalconio al 50%.

Procedimiento:

Se barniza el hongo con la sol. de benzalconio, se deja - secar al aire unos minutos, se corta el pedicelo a la distancia de - 0.5 cm. del pñleo y se coloca entonces éste sobre el cartoncillo - blanco.

Si la seta no está lo suficientemente madura, se procede - del siguiente modo para obtener sus esporas (16):

1.- Dispóngase de un cartoncillo cuadrado que pueda colo - carse sobre un vaso.

2.- Póngase agua en este vaso y hágase un agujero en el - cartón que deje pasar el pedicelo de la seta.

3.- Hágase pasar el pedicelo por el agujero; colóquelo to - do ello sobre el vaso, de modo que el pedicelo penetre en el - agua.

4.- Recúbrase el conjunto con una campana o recipiente - de material transparente, y déjese el tiempo suficiente para la es - porulación del hongo.

II.- TECNICAS PARA DEMOSTRACION DE ESPORAS .

Las técnicas utilizadas para la demostración de esporas fueron (14):

- x) Coloración de esporas por Dörner modificada por Snyder .
- z) Coloración de esporas por Carbolfucsina de Ziehl-Neelsen .

2.0 Métodos para el aislamiento y desarrollo micelial de Agaricus en medios sólidos (medio de conservación).

2.1 Medio de Agar - Malta (A-M):

Ingredientes por l	de solución	pH = 4.6
Maltosa		12.75 g
Dextrina		2.75 g
Glicerol		2.35 g
Peptona		0.78 g
Agar		15.0 g

a) Tomar del centro del estípite ó carpóforo de un Agaricus fresco, una pequeña parte (hifa) con pinzas, (pueden servir las pinzas para disección) e inocularlo en el medio ya descrito de A-M.

2.2 Utilizando el medio de A-M, pero inoculando la "semilla" - (micelio de A. campestris impregnando un grano de cereal).

Para la limpieza del material biológico, se usaron diversas concentraciones de una solución acuosa de benzalconio. El material de vidrio y metálico fue esterilizado en el autoclave y al horno respectivamente.

3.0 Propagación miceliar en cultivo sumergido .

En esta fase, fue muy importante el trabajo realizado (5, 10, 11, 12, 13, 22, 24), muy notable por cierto, efectuado años atrás por los investigadores Humfeld y Sugihara, quienes publicaron una serie de artículos referentes al tema tratado en esta tesis . Por la importancia tan extraordinaria que jugaron dichas investigaciones, reproduciremos parcialmente algunas de las conclusiones a las que ellos llegaron para determinar lo que denominaron medio basal de Humfeld y Sugihara .

3.1 Medio basal de Humfeld y Sugihara (10).

En 1952 Humfeld y Sugihara publicaron un artículo que denominaron "Los requerimientos nutritivos de *A. campestris* en cultivo sumergido", en dicha referencia ellos utilizan como fuente de carbono un carbohidrato que sea soluble, como fuente de nitrógeno amoníaco, urea y amino ácidos, además de concentraciones específicas de varios minerales . Los carbohidratos que mejor se asimilan son: glucosa, d-galactosa, d-manosa, d-fructosa, d-xilosa, maltosa, manitol, sacarosa y almidón soluble . La lactosa, l-ramnosa y la carboximetil celulsa, no son utilizadas por el hongo .

Posteriormente añaden una mezcla de 20 vitaminas, y observan que no se incrementa el crecimiento fúngico . En este punto cabe hacer un paréntesis y mencionar que estos investigadores coincidieron con el trabajo efectuado en la India por Guha y Banerjee (4.19, 4.24), realizado en 1972, en donde se hace hincapié acerca de los azúcares mejor asimilados por el micelio, así como la escasa o nula asimilación de vitaminas añadidas al medio de cultivo .

Ellos encontraron que la mejor concentración de azúcar era al 5% y en especial el carbohidrato que mayor rendimiento producía era la glucosa .

Nitrógeno.- La urea fué finalmente escogida como fuente de Nitrógeno debido a que su adición no cambia el pH del medio, lo suficiente como para tener un crecimiento desfavorable.

Se encontró que el máximo desarrollo miceliar se daba al tener una concentración de 100 mg/l de solución. Cantidades superiores a 3500 mg/l. inhibían el crecimiento.

Posteriormente ellos encontraron que la cantidad óptima - no sólo para obtener un buen desarrollo miceliar, sino también para producir un olor a hongo era de 1500 a 2000 mg/l.

Aparentemente el pH del cultivo es afectado por la conversión química de urea a amoníaco (la actividad de la ureasa fué demostrada en los cultivos sólidos en agar por medio de la prueba del rojo de fenol).

También la autólisis celular contribuye a elevar el pH. El pH se eleva en los primeros días y tiende a decrecer gradualmente.

Por medio del factor convencional de 6.25 ellos determinaron la cantidad de proteínas y obtuvieron así un máximo de 43% y un mínimo del 12.5% de proteínas (como ya se ha mencionado en el capítulo II).

Fósforo.- Después de la adición de concentraciones variables de ácido fosfórico (85%), el medio fue llevado a un pH 4.5 con NaOH 1N.

Los máximos rendimientos miceliares fueron obtenidos a concentraciones de 50 mg/l. y aumentó después de 4 días de incubación. Sin embargo, para el desarrollo de un aroma de seta es necesario una mayor concentración de este elemento. De este modo se encontró que la concentración óptima era de 300 - 400 mg/l

Potasio.- El requerimiento de potasio es de 200 a 300 -

mg/l. y después de 7 días se observó que el micelio liberó hacia el medio de cultivo el potasio que anteriormente había utilizado.

Azufre .- Aunque 50 mg/l. de azufre son suficientes para un rendimiento máximo, se requieren 200 mg/l. para un agradable aroma, aparentemente el micelio asimila 150 mg/l. y de estos libera al medio 50 mg/l. después de 7 días de incubación.

Magnesio .- Los más altos rendimientos fueron obtenidos después de 3 días de agitación con 20 mg/l. de magnesio. Parece ser que el desarrollo de un buen olor no requiere de una concentración alta de magnesio, como la requerida para su máximo crecimiento.

En un estudio subsecuente se encontró que el magnesio que se había asimilado, fue liberado íntegramente al medio de cultivo por las células del hongo.

Oligoelementos .- Los siguientes elementos fueron requeridos en mínimas cantidades.

Fierro = 2mg/l.

Zinc = 2mg/l.

Manganeso = menos de 1 mg/l.

Cobre = menos de 1 mg/l.

Conclusiones .

La eficacia del medio de cultivo para la producción micelial fue calculada en base a la cantidad de azúcar consumida por el hongo y la cantidad de biomasa en peso seco obtenida.

El nitrógeno fue determinado por el método de Kjeldahl - Gunning-Arnold; el fósforo como fosfomolibdato después de ser oxidado con perclorato; el potasio gravimétricamente con cobaltinitrito; el azufre con sulfato de bario después de ser oxidado con permanganato de potasio; el magnesio por análisis espectrofotométrico.

trico, la glucosa por un micrométodo de reducción del cobre (10).

3.1 Medio basal de Humfeld y Sugihara (H-S) (10):

Ingredientes por l. de solución.

Glucosa	50 g
KH_2PO_4	0.87 g
MgHPO_4	0.40 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.37 g
H_2SO_4 2N	5.1 ml
Sol. de oligoelementos ⁺	20.0 ml
Sol. acuosa de urea al 20%.	15.0 ml

El medio deberá ajustarse a pH = 4.5 con sol. de NaOH 1N.

+ La sol. de oligoelementos se prepara de la siguiente forma:

Ingredientes por l. de solución

FeCl_3 6 H_2O	0.5 g
MnCl_2 4 H_2O	0.36 g
ZnCl_2	0.20 g
CuSO_4	0.05 g

3.2 Medios modificando el medio basal de Humfeld y Sugihara, - en base a economía y disponibilidad en el país, de los nutrientes - necesarios para el óptimo crecimiento micelial de Agaricus.

3.2.1. Variando la fuente de carbono:

Utilizando concentraciones ascendentes de melaza de caña de azúcar (Siendo un subproducto de las industrias azucareras, las melazas son las "aguas madres" de las cuales se ha removido por cristalización la mayor parte del azúcar).

El análisis de melazas como % según White (23):

	Caña	Caña Refinada	Remolacha
Sólidos Totales	78-85	86-92	78-85
Azúcar Total (invertido)	50-58	70-86	48-58
N	0.08-0.5	0.05-0.25	0.2-2.8
P ₂ O ₅	0.009-0.07	0.03-0.22	0.02-0.01
CaO	0.15-0.8	0.15-0.35	0.15-0.7
MgO	0.25-0.8	0.12-0.25	0.01-0.1
K ₂ O	0.8-2.2	0.2-0.7	2.2-2.45
SiO ₂	0.05-0.3	0.07-0.25	0.1-0.5
Al ₂ O ₃	0.01-0.04	0.002-0.01	0.005-0.06
Fe ₂ O ₃	0.001-0.01	0.001-0.005	0.001-0.02
C	28-33	28-36	28-34
Cenizas Totales	3.5-7.5	1.8-3.6	4-8

Aunque el azúcar contenido en las melazas es dado a menudo como total invertido, de hecho no todo el azúcar presente es sacarosa o invertido. Rhodes y Fletcher (1966), reportan en la tabla siguiente el contenido real de azúcares (23).

Análisis de Melazas (23).

%	Melaza de la caña de azúcar
Sacarosa	33.4
Invertido	21.2
Cenizas	9.8
Sustancias que no son carbohidratos	19.6
Agua	16.0

3.2.2. Variando la fuente de nitrógeno:

Se utilizó sulfato de amonio y solución acuosa de urea a diferentes concentraciones.

4. Métodos analíticos practicados a las esférulas miceliares de Agaricus obtenidas.

4.1 Determinación de Nitrógeno total, la digestión fue por Kjeldahl, y la parte colorimétrica por Nesslerización. (2,25).

A. Material y Reactivos

Matraz para microkjeldahl o un tubo de paredes gruesas.

Pinzas para tubos de ensayo H_2SO_4 concentrado

Mechero $CuSO_4$ cristales

5 pipetas de 5 ml. H_2O_2 al 30%

2 pipetas de 1 ml. Sol. de NaOH 2 N

tubos de ensayo medianos Reactivo de Nessler

Matraz aforado de 100 ml $(NH_4)_2SO_4$

Agua destilada

B. Procedimiento

Se pesan aproximadamente 40 mg de muestra y se colocan en el tubo de paredes gruesas, se añaden unas gotas de H_2SO_4 conc. y se calienta suavemente hasta eliminar toda la humedad (hasta que el tubo esté seco).

Añadir 3 ml de H_2SO_4 conc. y unos cristales de $CuSO_4$, y con precaución 5 gotas de H_2O_2 al 30%, se calienta hasta que el contenido del tubo sea transparente y no se desprendan humos blancos.

Se deja enfriar a temperatura ambiente, se afora a 100 ml.

Tomar 1 ml. y añadir 4 ml. de agua destilada; 3 ml. de solución de NaOH 2 N y 2 ml. de reactivo de Nessler.

Dejar reposar 10 minutos y medir el color en un fotocolorímetro, empleando un filtro con una longitud de onda de 420 mm. (filtro azul).

C. Curva estándar

Simultáneamente se preparan soluciones con concentraciones conocidas de sulfato de amonio; la solución estándar deberá contener 0.01 mg N/ml y de esta se toman por ejemplo: 0.1, 0.4, 0.6, 0.8 ml. completando el volumen a 5 ml. con agua en cada caso y seguir la técnica descrita como para la muestra.

El blanco lo constituye una sol. de 3 ml. de NaOH 2 N, - 2 ml. de reactivo de Nessler y 5 ml. de agua. Se traza una curva en papel milimétrico colocando las concentraciones en las abscisas y las lecturas en las ordenadas. Para calcular la concentración problema se extrapola en la curva patrón la lectura obtenida del problema.

CURVA ESTANDAR

TUBO	SOL. 0.01 mg N/ml DE $(\text{NH}_4)_2$ SO_4	AGUA	CONC. REAL mg N/ml	U.K.
B	-	+ 5 ml	-	0
1	0.1 ml	+ 4.9 ml	$0.001/5 = 2 \times 10^{-4}$	13
2	0.4 ml	+ 4.6 ml	$0.004/5 = 8 \times 10^{-4}$	80
3	0.6 ml	+ 4.4 ml	$0.006/5 = 12 \times 10^{-4}$	124
4	0.8 ml	+ 4.2 ml	$0.008/5 = 16 \times 10^{-4}$	177
5	1.0 ml	+ 4.0 ml	$0.01/5 = 2 \times 10^{-3}$	235
6	1.2 ml	+ 3.8 ml	$0.012/5 = 2.4 \times 10^{-3}$	242
7	1.4 ml	+ 3.6 ml	$0.014/5 = 2.8 \times 10^{-3}$	255
8	1.6 ml	+ 3.4 ml	$0.016/5 = 3.2 \times 10^{-3}$	287
9	1.8 ml	+ 3.2 ml	$0.02/5 = 4 \times 10^{-3}$	310
10	2.0 ml	+ 3.0 ml	$0.025/5 = 5 \times 10^{-3}$	345

4.2 Determinación de azúcares reductores en los medios de fermentación por el método de Underkofler et al (26).

Es una modificación al método de Somogyi-Shaffer(19) y - puede determinar satisfactoriamente un máximo de 11 mg. del azúcar en 5 ml. de solución.

4.3 Propiedades organolépticas del producto obtenido.

4.3.1. Color.

4.3.2. Olor.

4.3.3. Sabor.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

ENSAYOS PRELIMINARES

A) Metodo de la caja doble

Este experimento fué realizado en repetidas ocasiones y en todas fué observado lo siguiente:

- 1.- Los hongos estaban totalmente secos (momificados).
- 2.- Las cajas de petri estaban vacías (sin esporas).

B) Método del vaso

Una vez efectuado en repetidas ocasiones este sencillo experimento, se observó:

Las esporas son de color negro-violáceo, pero fueron tan pocas que no se pudieron propagar lo suficiente como para desarrollar un crecimiento fúngico.

2.0 Como ya se mencionó en el capítulo III, el medio seleccionado para el mejor desarrollo miceliar fué el de A-M, ya que se probaron varios medios; entre ellos el de Saboraud, papa-dextrosa-agar, Czapeck, soya-triptosa-agar y el que dió más resultados satisfactorios fué el ya mencionado.

Esta fase de la tesis, fué la más lenta, puesto que los hongos macroscópicos (Basidiomicetes) son sumamente lentos para crecer en medios sólidos, esto aunado a la gran facilidad para contaminarse con otra clase de hongos y de bacterias, da una clara idea del por qué fueron 5 meses los que se necesitaron para el aislamiento de Agaricus en el medio sólido.

Las principales bacterias contaminantes encontradas fueron bacilos cortos Gram negativas, y los principales hongos contaminantes fueron Aspergillus y Penicillium.

Una vez desarrollado el micelio del Agaricus, el siguiente paso era su tipificación, es decir, saber si se trataba de la especie A. campestris.

Fué sugerido que la única manera de identificar y tipificar el micelio sin posibilidad de equivocación, era efectuando una Anastomosis (intercambio genético en cepas de la misma especie) y solo si se anastomosaban se podría decir que dichas cepas eran genéticamente iguales y por lo tanto de la misma especie. El problema sin embargo no era tan sencillo, por lo siguiente:

1.- La Anastomosis es una técnica que no se ha hecho en México para ningún basidiomiceto, (la única referencia bibliográfica encontrada sobre Anastomosis en un Basidiomiceto, fué la de Schizophyllum commune, y fué hecha en E.E.U.U. en 1973 (28).

2.- No podía anastomosarla con otra cepa de la misma es-

pecie, ya que por los estudios efectuados, tanto en el Instituto de Biología, como en el Instituto de Investigaciones Forestales de la Secretaría de Agricultura y Ganadería, no hay cepas de A. campestris mexicanas, aisladas en México.

3.- Además de las dificultades anteriores, se hubiere requerido equipo muy especializado que no se tenía a mano. Por este motivo no se confirmó la especie de Agaricus empleado en este trabajo, aunque corresponde a una cepa comestible que se expende comercialmente.

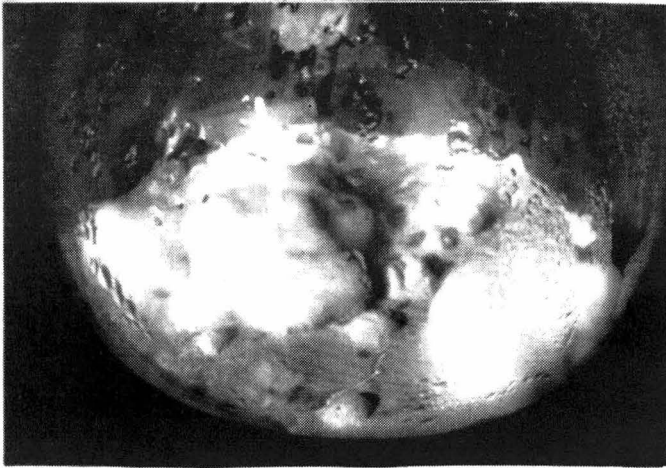


Fig. 3.- Aislamiento y Desarrollo del micelio de Agaricus en medio sólido (medio de conservación).

3.2 Medios de cultivo previos y modificantes al medio basal de Humfeld y Sugihara .

Durante esta etapa, el problema fundamental era encontrar un medio práctico, que no fuera muy elaborado, y que las materias primas fueran de fácil acceso, por su economía y disponibilidad.

Algunos de los medios de cultivo fueron preparados antes de conocer el medio de Humfeld y Sugihara, razón que explica el contraste entre los medios de cultivo iniciales y posteriores .

Todos los matraces fueron inoculados con el micelio de Agaricus desarrollado en la primera fase de este trabajo, ocasionalmente algunos matraces fueron inoculados con la "semilla" proporcionada por la compañía "Hongos de México ., S.A." .

I. MEDIO DE CULTIVO (cantidades requeridas por c/100 ml de medio).

MATRAZ	FUENTE DE C MELAZA	FUENTE DE N LICOR DE CO CIMENTO DE MAIZ Y SUL- FATO DE AMO- NIO	SALES CaCO_3	MINERALES K_2HPO_4	TIEMPO DÍAS DE INC.
A	5 g.	1 ml + 0.7 g.	0.5 g.	0.2 g.	21
B	5 g.	1 ml + 0.5 g.	0.5 g.	0.2 g.	21
C	5 g.	1 ml	0.5 g.	0.2 g.	21

Antiespumante = aceite comestible

pH = 5

Este medio fué preparado, basado en el medio IV de la tesis:
"Producción comparativa del micelio de *P. ostreatus* por el -
método de cultivo sumergido, con fines alimenticios humanos" -
(6).

Crecimiento: negativo.

II.- MEDIO DE CULTIVO (cantidades requeridas por c/100 ml. de medio)

Sólo sales minerales del medio de Humfeld y Sugihara. Sol. urea al 20%				
pH = 4.5				
MATRAZ	FUENTE DE C SACAROSA	FUENTE DE N UREA	CRECIMIENTO	TIEMPO DIAS DE INCUBACION
A ₁	5 g.	7.5 ml	(-)	21
A ₂	5 g.	1.5 ml	(+)	7
A ₂ ⁺ ae	5 g.	1.5 ml	(-)contaminación abundante	7

ae = antiespumante

El pH fue ajustado con solución NaOH 1 N

Crecimiento:

Los matraces A₁ : crecimiento negativo

Los matraces A₂ : presentaron crecimiento micelial a los 7 días de incubación.

Los matraces A₂⁺ ae; contaminación abundante.

III. MEDIO DE CULTIVO (cantidades requeridas por C/100 ml. de medio).

Sólo sales minerales del medio de Humfeld y Sugihara. Sol. urea al 20% pH= 4.5				
MATRAZ	FUENTE DE C MELAZA	FUENTE DE N UREA	CRECIMIENTO	TIEMPO DIAS DE INCUBA-- CION.
K ₃	15 g..	1.5 ml	-	21
K ₄	20 g.	1.5 ml	-	21
K ₅	25 g.	1.5 ml	+ con contami nación	18
K ₆	30 g.	1.5 ml	+ con contami nación	18
K ₇	35 g.	1.5 ml	+	13

El pH fué ajustado con Ac. Acético glacial.

IV. MEDIO DE CULTIVO (cantidades requeridas por c/100 ml. de medio)

Sólo sales minerales del medio de Humfeld y Sugihara. Sol. urea al 20%				
pH = 4.5				
MATRAZ	FUENTE DE C	FUENTE DE N UREA	CRECIMIENTO	TIEMPO DIAS DE INC.
A ₁	5 g. de glucosa	1.5 ml.	+	8
A ₂	5 g. de sacarosa	1.5 ml.	+	8
K ₇	35 g. de melaza	1.5 ml.	-	21
K ₈	40 g. de melaza	1.5 ml.	-	21
K ₉	45 g. de melaza	1.5 ml.	-	21
K ₁₀	50 g. de melaza	1.5 ml.	-	21
K ₁₁	55 g. de melaza	1.5 ml.	-	21
K ₁₂	60 g. de melaza	1.5 ml.	-	21

El pH fué ajustado con Ac. Acético glacial (A₄ al A₁₂) y con sol. de NaOH 1 N para A₁ y A₂.

Crecimiento:

Los matraces A₁, A₂; crecimiento miceliar abundante a los 8 días los demás; crecimiento negativo.

V. MEDIO DE CULTIVO (cantidades requeridas por c/100 ml. de medio).

Sólo sales minerales del medio de Humfeld y Sugihara. Sol. urea al 20%				
				pH = 4,5
MATRAZ	FUENTE DE C	FUENTE DE N UREA	CRECIMIENTO	TIEMPO DIAS DE INC.
A ₁	5 g. de glucosa	1.5 ml.	-	21
A ₂	5 g. de sacarosa	1.5 ml.	-	21
K ₄	20 g. de melaza	1.5 ml.	-	21
K ₅	25 g. de melaza	1.5 ml.	-	21
K ₆	30 g. de melaza	1.5 ml.	-	21
K ₇	35 g. de melaza	1.5 ml.	-	21
K ₈	40 g. de melaza	1.5 ml.	-	21
K ₉	45 g. de melaza	1.5 ml.	-	21
K ₁₀	50 g. de melaza	1.5 ml.	-	21
K ₁₁	55 g. de melaza	1.5 ml.	-	21
K ₁₂	60 g. de melaza	1.5 ml.	-	21

El pH fué ajustado con Ac. Acético glacial (A₄ al A₁₂) y con sol. de NaOH 1 N
pa a A₁ y A₂.

Crecimiento:

Negativo en todos los matraces.

VI. MEDIO DE CULTIVO (cantidades requeridas por c/100 ml. de medio)

Sólo sales minerales del medio de Humfeld y Sugihara. Sol. urea al 20%				
pH= 4.5				
MATRAZ	FUENTE DE C	FUENTE DE N. UREA	CRECIMIENTO	TIEMPO DIAS DE INC.
A ₁	5 g. de glucosa	1.5 ml.	+	8
A ₂	5 g. de sacarosa	1.5 ml.	+	9
	MELAZA			
K ₄	20 g.	1.5 ml.	-	21
K ₅	25 g.	1.5 ml.	-	21
K ₆	30 g.	1.5 ml.	-	21
K ₇	35 g.	1.5 ml.	-	21
K _{7.1}	35 g.	1.0 ml.	-	21
K _{7.2}	35 g.	2.0 ml.	ligero	15
K ₈	40 g.	1.5 ml.	ligero	15
K ₉	45 g.	1.5 ml.	-	21
K ₁₀	50 g.	1.5 ml.	-	21
K ₁₁	55 g.	1.5 ml.	-	21
K ₁₂	60 g.	1.5 ml.	-	21
AK ₁	3 g. de sac. + 35 g. de melaza	2.0 ml.	+	18

El pH de A₁ y A₂ fué ajustado con NaOH 1 N, todos los demás matraces fueron ajustados con Ac. Acético glacial.

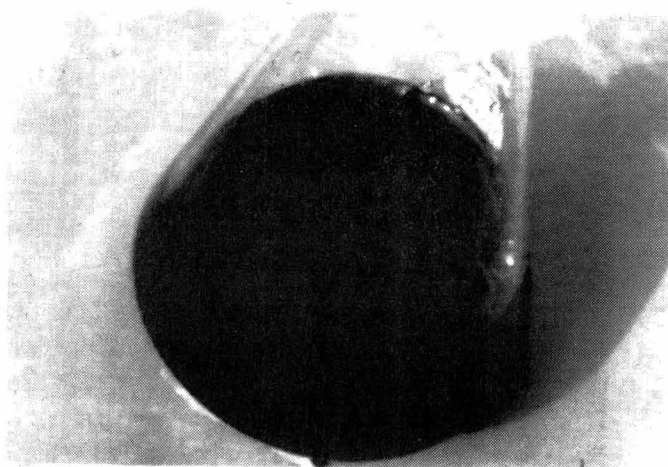


Fig. 4.- Propagación miceliar en cultivo sumergido (medio con melaza).

4.0 Métodos analíticos practicados a los esferulas miceliarias de Agaricus obtenidas.

4.1 Determinación de proteínas a partir del contenido total de Nitrógeno.

Del valor resultante de extrapolar en la curva estándar se determinó la concentración de N total de la muestra.

Este valor se multiplicó por el factor 6.25 para convertir el valor de N en valor de proteína, aunque recientes estudios han indicado que este factor es bajo y que el verdadero valor podría acercarse más a 6.45. No obstante, "hasta que no se acepte un valor con más exactitud, por acuerdo de los químicos clínicos será conveniente retener y usar el valor 6.25 para la razón proteína/ N" (25).

CONTENIDO DE PROTEINA DE LOS MICELIOS DE
AGARICUS SP. CULTIVADOS EN MELAZA Y CON
GLUCOSA.

(REFERIDO A PRODUCTO SECO)

	CON MELAZA %	CON GLUCOSA %
Proteína (N x 6.25)	35	40

4.2 Determinación de azúcares por el método de Underkofler et al.

La cantidad requerida por las esférulas miceliales fué de 5 ± 1 g. de sacarosa o de glucosa, ya que por los experimentos realizados la asimilación de los dos carbohidratos fué muy semejante. (Esto corrobora lo mencionado anteriormente por Humfeld y Sugihara (10), en lo referente a la aceptación por parte del micelio de A. campestris de una gran variedad de carbohidratos solubles).

Las melazas utilizadas en éste trabajo contenían aproximadamente un 33% de azúcares reductores, y se encontró que el rango óptimo para el desarrollo miceliar es entre 30 y 35 g. de melaza por cada 100 ml. de medio de cultivo.

No obstante en los últimos experimentos se vió que una mezcla de 3 a 3.5 g.% de sacarosa + 30 g.% de melaza, fué mejor aprovechado por el micelio del Agaricus.

4.3 PROPIEDADES ORGANOLEPTICAS DEL PRODUCTO OBTENIDO.

4.3.1 COLOR.

En los matraces que fueron cultivados con glucosa y sacarosa, el producto obtenido fué de color blanco y de consistencia algodonosa.

En los matraces cultivados con melaza el color presentó - un tono café claro y café oscuro.

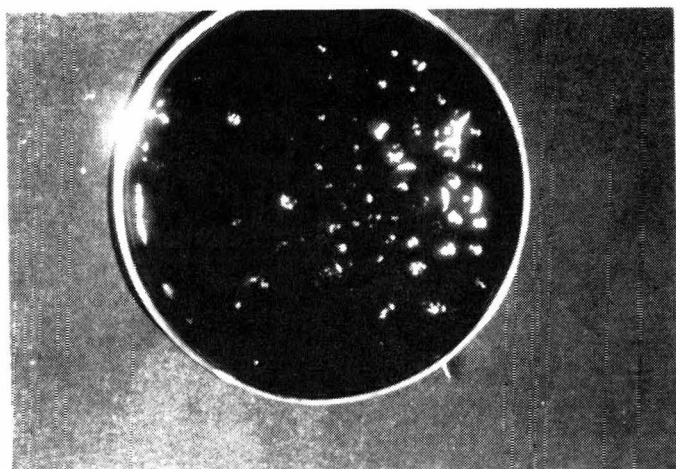
4.3.2 OLOR.

No presentó ningún olor el producto obtenido.

4.3.3. SABOR.

Ligeramente sabor a papel húmedo.

A



B

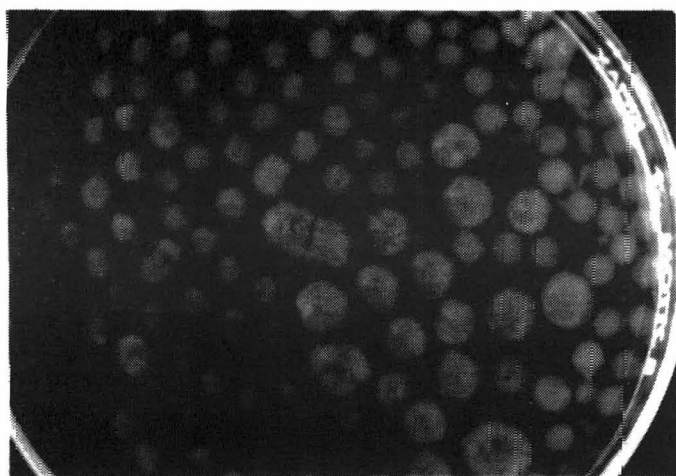


Fig. 5.- Esférulas miceliales de Agaricus sp.
A) Medio con melaza. B) Esférulas lavadas con agua y a mayor aumento.

R E S U M E N

Los objetivos primordiales, propuestos a priori en este trabajo se cumplieron.

Se obtuvo en primer lugar el desarrollo miceliar del Agaricus, que si bien, no se logró tipificar la especie por las razones expuestas anteriormente, sí se puede asegurar que la especie es comestible.

En segundo término se encontró un medio de cultivo, utilizando como materia prima, desechos de industrias (melazas), con lo cual, el costo económico del cultivo disminuye notablemente.

Y finalmente se logró desarrollar el micelio de un basidiomiceto que nunca antes se había aislado en México (al menos en los estudios realizados y referencias encontradas, no se encontró ningún reporte que diga lo contrario).

Además de que las posibilidades en el desarrollo de productos microbiológicos, por la técnica de cultivo sumergido, nos ofrece un amplio panorama en el campo de la tecnología de alimentos.

Esto es en base a su economía y la facilidad de adaptación de cualquier espacio que reúna ciertas características fundamentales (lugares limpios, secos, con cierta ventilación y acondicionados de tal modo que se facilite el transporte de materias primas y productos), se puede realizar este sencillo y práctico método, no sólo para alimentación humana, sino también para especies animales (ganado vacuno, ovino, porcino, etc.).

Esta técnica nos sugiere una visión hacia un futuro no lejano, en el que el ser humano se alimente con productos obtenidos por cultivos sumergidos.

También grandes necesidades alimenticias podrían ser remediadas si los gobernantes de cada país o territorio, dieran una somera observación a estas técnicas, no sólo en el ámbito nacional sino a nivel continental.

El primer paso sería naturalmente un estudio bromatológico de los productos que se pretendan cultivar por este método, para luego efectuar una evaluación de las materias primas abundantes y disponibles que el país o zona geográfica tengan, con la finalidad de obtener un completo éxito.

Los champiñones (Agaricus), son un alimento conocido y degustado por la mayoría de las gentes, y pueden ser abaratados, en sus costos por éste método. Y si bien el producto obtenido no posee la forma y tamaño a que estamos acostumbrados, si posee el mismo valor nutritivo y por lo tanto se podría utilizar como complemento de sopas o en bocadillos y botanas.

Por último no queda sino recomendar una mayor atención y estudio sobre los desechos de las industrias, para aprovechar estas fuentes inagotables de energía, que sabiéndolas manejar, las podemos modificar hasta lograr un propósito común: conocer el medio ambiente que nos rodea y transformarlo para nuestro bienestar.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Alexopoulos C.J.
Introductory Mycology
2o. Ed.
Wiley and Sons
New York (1962).
- (2) Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.)
42.014, 42.016, 45.012, 45.018).
William Horwitz, Ed.
11o. Ed.
Washington, D.C. (1970).
- (3) Balius A.J.
Hay dinero en el champiñón
Editorial Sintes, S.A.
Barcelona, España (1971).
- (4) BIOLOGICAL ABSTRACTS (B.A.)
- (4.1) Mathew, K.T. (U. Cambridge, Engl.). Trans. Brit. Mycol Soc. 44 (2): 285-290. 1961. "Morfogénesis del filamento en el cultivo del hongo Agaricus bisporus".
B.A., (36), 57691 (1961).
- (4.2) Heim Roger y Georges Becker. Agaricaceas. Encyclopedía M. France; 1956; P. 101. Soc. Mycol. France 74 (2): 196-206. Map. 1958. "Psalliota campestris".
B.A., (36), 81852 (1961).
- (4.3) Dehennin, L., J. Stockx; & Vandondriessche (U. Ghent , Belgium). Arch. Inter. Physiol. Biochem. 69 (1); 79-78 . 1961. "Actividad en los Basidiomicetos, de la fosfomonoesterasa en A. campestris".
B. A., (38), 2996 (1962).
- (4.4) Merck Edward L; A. campestris.L. ex fries Dissertation; Absts. 21 (7): 1726. 1961. Abstract. "Un estudio del hon-

- go A. campestris disecado".
B.A., (38), 3629 (1962).
- 4.5) Falanghe H., and P.A. Bobbio (Univ. Sao Paulo P., Brazil). Arch. Biochem. & Biophys. 96 (2): 430-433. "Identificación de la producción de Indigo en cultivo sumergido de una mutante, de A. campestris".
B.A., (39), 3202 (1962).
- (4.6) Molitoris, Peter. (Univ. Gottingen, Germany). Nature - 192 (4825): 316; 1962. "Identificación de A. campestris".
B.A., (40), 20814 (1962).
- (4.7) Hughes, D.T. (Roy, Cancer Hosp. London, England). Brit Jour. Cancer 15 (1): 101-103. Illust.. 1961. "El efecto del hollín del aceite diesel sobre la diferenciación del hongo cultivado A. campestris var. bisporus".
B.A., (42), 7820 (1963).
- (4.8) Edmundowicz, John M., and John C. Wriston, Jr. (Univ. Delaware, Newark, Del., USA.). IN: 47th Annual meeting of the federation of American Societies for Experimental Biology, 1963. Fed. Proc. 22 (2 pt. 1): 240. 1963. - "Biosíntesis de manitol, en A. campestris".
B.A., (43), 11354 (1963).
- (4.9) Le Roux, P. (Center Nat. of Inv. Agron. Versailles, France). Ann. Physiol. Veg. 4 (2): 149-160. 1962. "El metabolismo de ácidos orgánicos en el carpóforo de A. campestris".
B.A., (44), 7786 (1963).
- (4.10) Tsao, George Tsu-Ning. (Unión of Starch and Ref. Co., Granite city, Ill. USA). Appl. Microbiol. 11 (3): 255 1963. "Producción de ácido oxaloacético por A. campestris".
B.A., (44), 24848 (1963).

- (4.11) Kuromowa Zofia. Ann. Univ. Mariae Curie- Skoldowska - Sect. C. Biol. 17 : 433-451. Illus. 1962 (1963). (Russian and English summ.). "Germinación de esporas de algunas especies de Agaricales".
B.A., (46), 58394 (1965).
- (4.12) Moscow 115-117. 1963. From: Ref. Zh. Biol., 1964, No. - 12E211. Sumenkova, (N.I.). (Information on the Scientific conference of the All-Union Society of Helminthologists, 1963, Part. 2). "Mycohelmentos como ectoparásitos en hongos (A. campestris)."
B.A., (46), 86640 (1965).
- (4.13) Tschierpe, H.J. and J.W. Siden (House to cultivate fungi. Gossau, Zurich, Suiza). Arch. Mikrobiol. 49 (4): - 405 - 425. Illus. 1964. "Estudios de la importancia del CO₂ para el crecimiento de A. campestris var. bisporus."
B.A., (48), 24644 (1967).
- (4.14) Shaw, Robert. (Unilever Res. Lab., Sharnbrook; Bedford, Engl., UK.). Nature 213 (5071): 86-87. "Acidos grasos en cuerpos fructíferos de Basidiomicetos (A. campestris, - Collibya sp., Fomes sp.)".
B.A., (48), 87412 (1967).
- (4.15) Le Roux, P. Versailles, France. Ann. Physiol. Veg. (Paris) 8 (3): 197-207. Illus. 1966 (recd. 1967)(Engl. summ) "El acetato 2 C¹⁴ en el metabolismo del carpóforo del hongo cultivado A. campestris var. bisporus".
B.A., (49), 47651 (1968).
- (4.16) Spiller, G.H., D.F. Threlfael, & G.R. Whistance. (Univ. Coll. Wales, U.K.). Arch. Biochem. Biophys. - 125 (3): 786-796. Illus. 1968. "Biosíntesis de Ubiquinona por A. campestris".
B.A., (49), 112746 (1968).

- (4.17) Wolf, Frederick T. (Vanderbilt Univ. USA.) Mycopathol - Mycol. Appl. 35 (2): 181-183. 1968. "Producción de - CO₂ acompañando el desarrollo de los cuerpos fructíferos de A. campestris". B.A., (50), 27062 (1969).
- 4.18) Sage. Harvey J., and Suzanne. (Duke Univ. Med. Center USA). Durham, N.C., Jour, Biol. Chem. 244 (17):- 4713-4719 Illus. 1969. "Composición, purificación y estructura de la hemaglutinina (FHA) en A. campestris". B.A., (51), 69356 (1970).
- (4.19) Guha, Arun Kumar, y A.B.Banerjee (Dept. of Biochem., Univ. of Calcuta, W. Bengala, India.). J. Food Sci. Technol. 7 (1): 23-25. 1970. "Efecto de los diferentes - compuestos nitrogenados en cultivo miceliar de A. campes tris (cultivo sumergido)". B.A., (52), 20038 (1971).
- (4.20) Young, N. Martin (St. Luke's Hosp., Cleveland, Ohio, - USA.). Mykon A. Leon, Terumi Takashi, Irmgard K. - Howard, Harvey J. Sage. J. Biol. Chem. 246 (6): 1596- 1601. Illus. 1971. "Estudios de FHA, LcH-A, LcH-B, en el hongo A. campestris". B.A., (52), 84390 (1971).
- (4.21) Melik- Khachatryan, D.G., Abramyan, and M.L. Gaspa ryan (Dept. Lower Plants, Yerevan State, Univ. Yerevan, URSS.) Biol. Zh. Arm. 23 (2): 45-50. Illus. 1970. - "Efecto de extractos acuosos de cuerpos fructíferos de hongos en intervenciones quirúrgicas de humanos". B.A., (52), 129069 (1971).
- (4.22) Law, Ah., D.R. Threfael, and G.R. Whistance. (Univ. Coll. Wales, Aberystwyth, Welles, UK.). Biochem. J. 123 (3): 331-339. 1971. "Fenoles isoprenoides y qui -

nonas como precursores de ubiquinonas y de dihidroubiquinonas (ubiquinonas H₂) en hongos".

B.A., (52), 138859 (1971).

- (4.23) Hanlon, David P. (Dartmouth Med. Sch., Hanover., N.H., 03755, USA). J. Med. Chem. 14 (11): 1084-1087. - Illus. 1971. "Interacción de la ergotionina con iones metálicos y metaloenzimas, en A. campestris".

B.A., (53), 33658 (1972).

- (4.24) Guha, Arun Kumar, and A.B. Banerjee. (Dept. Biochem, Univ., Calcuta, West Bengala, India). J. Food Sci. Technol. 8 (2): 82-83. 1971 (recd. 1972). "Efecto de los diferentes compuestos de C en cultivo sumergido miceliar de A. campestris".

B.A., (56), 37310 (1973).

- (4.25) Mel'nychuck, H.H. and M. Ya. Zerova, "Especies del género Agaricus como origen de proteínas y vitaminas". UKR. Bot. Zh. 29 (6) : 755-761. 1972 (recd. 1973).

Engl. and Russ. summ.

B.A., (56), 66287 (1973).

- (4.26) Couvy, Jacqueline. (Stn. Physiol. Biochem. Veg., La Grande Ferrade, Inst. Natl. Rech. Agron. Bord., 33140 Pont-de-la-Maye, Fr.) "The factor of fructification of the Agaricals and more especially of A. bisporus" Lange, - Sing. Botanise 56 (1-6): 103-128. 1973/1974.

(in Fr. with Er. and Engl. summ.).

B.A., (59), 34041 (1975).

- (5) Blocky, S.S., Stearns, T.W., Stephens, R.L. y Mc. Cardies, R.F., Mushroom Mycelium experiments with submerged culture, Jour. Agr. Food, Chem., 1 (14); 890-893 - (1953).

- (6) Cabrera, S.M. y Moeller, Ch. G.
Producción comparativa del micelio de P. ostreatus por el método de cultivo sumergido, con fines alimenticios - humanos.
Facultad de Química, UNAM.
Tesis Profesional (1974).
- (7) Dubovoy Celia
Conocimiento de los hongos en el México antiguo.
Instituto de Biología, UNAM.
Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología
México, D.F. (1968).
- (8) Enciclopedia Salvat
Vols. 2, 7, 9.
Salvat Editores
Barcelona, España (1972).
- (9) FAO, Nutritional studies No. 16, Food and Agricultural - Organization of the United Nations (1957).
- (10) Humfeld, H.: The production of mushroom mycelium (Agaricus campestris) in submerged culture, Science, 107 (2780): 373 (1948).
- (11) ----- The production of mushroom mycelium, Year book of Agriculture, 1950-1951, págs. 242-245.
- (12) Humfeld y Sugihara, T.F.: Mushroom mycelium production by submerged propagation, Food Technol., 3 (11): 355 - (1949).
- (13) ----- The nutrient requirements of - Agaricus campestris grown in submerged culture, Mycologia, 44 (5): 605-620 (1952).

- (14) Lynch, Raphael, Mellor, Spore
Métodos de laboratorio
2o. Ed.
Ed. Interamericana
México (1972).
- (15) Martín del Campo Rafael
Contribución al conocimiento de la nomenclatura micológica Náhuatl.
Facultad de Ciencias, UNAM
Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología.
México, D.F. (1968).
- (16) Montarnal P.
Setas comestibles y venenosas
Ediciones Diamon
Barcelona, España (1970).
- (17) Moore, R.T. and J.H. Mc Alear, Fine structure of mycota. 7. Observarion on septa of Ascomycetes and Basidiomycetes, Am. Jour., of. Bot., 49 : 86-94 (1962).
- (18) Prescott, S.C., and Dunn, C.G.
Microbiología Industrial.
3o. Ed.
Editorial Aguilar
México (1962).
- (19) Shaffer, P.A. and Somogyi. M. Copper-iodometric reagents for sugar determination, J. Biol. Chem. 100, . - 695-713 (1933).
- (20) Singer, R.
The Agaricals in modern taxonomy
2o. Ed.
Weinheim Pub. by J. Cramer
1962.

- (21) Singer, R.
Las setas y las trufas
1a. Ed.
Editorial Continental, S.A.
México, (1964).
- (22) Sugihara, T.F. Humfeld, Mushroom production in submerged culture, by synthetic medium, *Appl. Microbiol.* 2 - (3): 1970 (1954).
- (23) Solomons, G.L.
Material and Methods in Fermentation
Academic Press
New York (1969).
- (24) Szuecs, J.: Essence of mushroom and its preparation, Pat. 2 505 811 (1950).
- (25) Tietz N.
Química Clínica Moderna
1a. Ed.
Ed. Interamericana
México (1972).
- (26) Underkofler, L.A., et al., Semimicromethod for the determination of reducing sugars in fermentation media, Iowa State College, *J. Sci.* 17, 251-256 (1943).
- (27) Verna, L.C., Herrero, I.J.
Micología
Ed. Ateneo
México, (1952).
- (28) Watrud S.L. and H.A. Ellingboe, Use of Cobalt as a Mitochondrial vital stain to study Cytoplasmic exchange in matings of the Basidiomycete *Schizophyllum commune*, *Jour. of Bacteriology* 115 (3); 1151-1158 (1973).

- (29) Willard, Merrit, Dean.
Métodos instrumentales de análisis
4a. Ed.
Ed. Continental, S.A.
México (1971).

