

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad de Oriente

## EFFECTO DE LA LUZ EN LA CONCENTRACIÓN DE MICOSTEROLES DE *PLEUROTUS OSTREATUS* VAR. *FLORIDA*

Rosa Catalina Bermúdez Savón,<sup>1</sup> Carlos Donoso Fernández,<sup>2</sup> Clara Esther Martínez Manrique,<sup>3</sup> Edgar Iván Ramos Sevilla<sup>2</sup> y Humberto Joaquín Morris Quevedo<sup>4</sup>

### RESUMEN

Se evaluó el efecto del tiempo de exposición a la luz durante el período de fructificación en la concentración de micosteroles (ergosterol y su peróxido) de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*, cultivado mediante fermentación en estado sólido sobre residuales del cacao en Ecuador. La exposición del hongo a la luz a tiempos menores de 12 h disminuyó la eficiencia biológica en el 68 % y el rendimiento en el 63 %. No se apreciaron mayores variaciones en la concentración de los compuestos lipídicos totales en los cultivos, y las concentraciones de micosteroles totales, determinadas por cromatografía gaseosa, mostraron un aumento en función de la cantidad de luz recibida: 115, 141 y 349 mg % correspondientes a tiempos de exposición de 4, 8 y 12 h. Estos resultados permiten abordar con mayor profundidad el potencial de esta especie como materia prima para la obtención de ergosterol (provitamina D<sub>2</sub>).

DeCS: PLEUROTUS/aislamiento & purificación; CROMATOGRAFIA DE GASES/métodos; ILUMINACION/métodos; ERGOCALCIFEROLES; COLECALCIFEROL.

El reciente ascenso experimentado en el campo de la medicina natural y tradicional como una alternativa para el tratamiento de varios trastornos fisiológicos y el reconocimiento de numerosos modificadores biológicos en las setas comestibles, ha conducido a la definición del término "setas nutricéuticas".<sup>1</sup>

*Pleurotus spp.* es un género de hongos superiores perteneciente al grupo de las

setas comestibles, que resulta particularmente interesante desde el punto de vista nutricional en función de su contenido de proteína (27-48 %) con valores de cómputo químico comprendidos entre 96 y 110 %, lípidos (2-8 %), niveles tolerables de ácidos nucleicos y por la presencia, además, de vitaminas, minerales, fibra dietética, beta glucanos y compuestos con actividad antioxidante.<sup>2-4</sup>

<sup>1</sup> Doctora en Ciencias Químicas. Profesora Titular. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Universidad de Oriente.

<sup>2</sup> Master en Biotecnología. Profesor-Investigador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH). Ecuador.

<sup>3</sup> Master en Biotecnología Ambiental. Profesora Auxiliar. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Universidad de Oriente.

<sup>4</sup> Master en Bioquímica de la Nutrición. Investigador Agregado. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Universidad de Oriente.

Por otra parte, el metabolismo secundario de los hongos es responsable de la síntesis de sustancias químicas con poca acción en el propio organismo pero potencialmente activas en otros seres vivos, como los micosteroles. Aunque orientada por las características genéticas, la síntesis química de esas sustancias es controlada por factores del ecosistema (luz, calor, temperatura, humedad y sustrato). En este sentido, la presencia de ergosterol ha sido reportada tanto en hongos silvestres como cultivados.<sup>5,6</sup>

El ergosterol es un importante precursor sintético de la vitamina D<sub>2</sub>, a través de un proceso fotoquímico electrocíclico, seguido de una transposición sigmatrópica térmica.<sup>7</sup> Tanto la vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) como la D<sub>3</sub> (colecalfiferol) son de igual potencia y dan origen mediante transformaciones metabólicas en el organismo, a una hormona conocida como calcitriol, que desempeña una función clave en el metabolismo del calcio y el fósforo.<sup>8</sup>

En Ecuador no se ha valorado la potencialidad ecológica y económica de muchos residuales agrícolas o agroindustriales, que en la mayoría de los casos son quemados o arrojados a los basureros, quebradas, ríos, etc., sin ningún tratamiento previo, lo que contribuye de esta manera a la degradación del ecosistema.<sup>9</sup> Entre las ventajas que ofrece el cultivo de hongos del género *Pleurotus* se destacan: la posibilidad de cultivarse en climas tropicales, la simplicidad en la tecnología de producción y la posibilidad de utilizar una amplia gama de sustratos orgánicos, entre ellos una gran variedad de subproductos agrícolas e industriales como la paja de arroz, el bagazo de caña, la pulpa de café, los residuales del cacao y el pasto seco, entre otros.

Mediante la presente investigación se evalúa el efecto de la luz sobre el contenido de micosteroles en la biomasa de *Pleurotus ostreatus*, cultivado mediante fermentación en estado sólido (FES) en un sustrato a base de residuales del cacao.

## MÉTODOS

La investigación se realizó en el Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo ubicada en la ciudad de Riobamba, a 2 756 m sobre el nivel del mar con una temperatura ambiente promedio de 15 °C y una humedad relativa de 30-40 %.

**Cepa utilizada.** Se empleó la cepa de *Pleurotus ostreatus* var *florida*, registrada como CP-184, cedida gentilmente por la colección del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (Universidad de Oriente, Cuba).

**Preparación del inóculo.** Se utilizaron frascos de vidrio transparentes en los que se depositó aproximadamente 400 g de semillas de trigo lavadas, hidratadas y sumergidas en una solución de benomyl al 0,02 %, para luego someterlas a esterilización a 121 °C y 15 lb/pulg<sup>2</sup> de presión durante 1 h. La proporción de inóculo adicionado al sustrato equivale al 10 % en relación con el peso húmedo.

**Fermentación en estado sólido.** Los residuales del cacao seleccionados por sus características químicas y su relativa abundancia, fueron sometidos a un proceso de secado solar por exposición directa durante 7 d. Para la preparación del sustrato, el material vegetal fue triturado y tamizado hasta alcanzar aproximadamente un tamaño de 2 x 2 cm, luego es lavado, hidratado, pasteurizado y sumergido en una solución de benomyl al 0,02 %. El sustrato nuevamente fue secado al sol hasta alcanzar una humedad entre 65-70 %.

Se mezclaron 2 kg de sustrato húmedo con 200 g de inóculo. Con esta mezcla se llenaron las bolsas plásticas (15 x 10 pulg) que se almacenaron en un armario en completa oscuridad a una temperatura de 25-28 °C durante 10-20 d. Las bolsas se perforaron al tercer día de haber inoculado el sustrato. Luego de la colonización las bolsas fueron colocadas bajo luz indirecta en la planta donde se cultivaron los hongos.

Se diseñaron 3 grupos experimentales, conformados por 6 bolsas plásticas, que contenían 2 kg de sustrato húmedo. Cada grupo fue expuesto diariamente a la luz en su fase de fructificación durante períodos de 4, 8 y 12 h. En el cultivo del *P. ostreatus* se controlaron las variables siguientes: pH inicial del sustrato, 6,5; temperatura, 28 °C; humedad, 80 %; aireación y remoción del CO<sub>2</sub>, 3 veces al día.

Cuando los hongos alcanzaron la madurez (aproximadamente a los 5 d) fueron cosechados y pesados. Se realizó un total de 3 cosechas por cada bolsa a intervalos de 10 d. La evaluación de la producción para cada tratamiento se llevó a cabo estimando los parámetros de eficiencia biológica (EB) y rendimiento.

**Extracción de los componentes lipídicos.** Se realizaron extracciones sucesivas a 10 g de la biomasa fúngica seca y molida con volúmenes de 100 mL de la mezcla cloroformo-metanol (2:1, v/v)<sup>10</sup> durante 2 h a la temperatura ambiente. El contenido lipídico fue determinado gravimétricamente después de evaporar los extractos de cloroformo-metanol (ECM).

**Identificación y cuantificación de los micosteroides.** Los extractos ECM correspondientes a los 3 grupos experimentales fueron analizados por cromatografía en capa delgada (TLC) en placas de silicagel 60 HF<sub>254</sub> (Merck) de 20 x 20 cm, empleando como sistema de solventes la mezcla hexano: acetato de etilo (1:1, v/v). Se utilizaron como patrones de micosteroides, ergosterol y peróxido de ergosterol, donados por el Departamento de Química de la Universidad de Pavia-Italia. El revelado de las placas cromatográficas fue realizado en una desecadora que contenía yodo sublimable.

Se cuantificaron por cromatografía gaseosa (Shimadzu) los micosteroides presentes en la biomasa fúngica de *P. ostreatus*. Las condiciones empleadas fueron las siguientes: columna de vidrio silanizado OV<sub>101</sub> 10 %, temperatura del

inyector 250 °C, temperatura del detector 350 °C, temperatura de la columna 260 °C y flujo del gas 30 mL/min.

## RESULTADOS

Los valores de eficiencia biológica para los cultivos de *P. ostreatus* desarrollados sobre residuales del cacao expuestos a 4, 8 y 12 h de iluminación fueron 39,60; 39,95 y 122,90 %, respectivamente. Por otra parte, los rendimientos alcanzados en dichos grupos experimentales fueron 16,02; 16,61 y 43,34 %, respectivamente. Los cultivos expuestos a 4 y 8 h de luz no desarrollaron completamente el cuerpo fructífero; en contraposición, el grupo expuesto a 12 h evidenció un normal desarrollo de los cuerpos esporíferos.

En la tabla 1 se presentan los resultados correspondientes a los lípidos totales encontrados en la biomasa fúngica obtenida de *P. ostreatus cultivado* en sustrato de cacao y su comparación con otros Basidiomicetos. No se apreciaron mayores variaciones en la concentración de los compuestos lipídicos totales en los cultivos sometidos a los diferentes regímenes de iluminación.

En las cromatografías en capa delgada de los extractos de cloroformo-metanol per-

TABLA 1. Lípidos totales en la biomasa fúngica de *Pleurotus ostreatus cultivado* en sustrato de cacao en comparación con otros Basidiomicetos<sup>16</sup>

Basidiomicetos	Porcentaje de lípidos totales (g %, base seca)
<i>P. ostreatus</i> (4 h de exposición a la luz)	12,11
<i>P. ostreatus</i> (8 h de exposición a la luz)	11,26
<i>P. ostreatus</i> (12 h de exposición a la luz)	11,02
<i>Clytocybe</i> sp.	6,75
<i>Coriolus zonatus</i>	1,79
<i>Phellinus</i> sp. <i>Quel</i>	3,41
<i>Pholliola lenta</i>	5,39
<i>Ramaria</i> sp.	4,59
<i>Daedalea quercina</i>	6,98

TABLA 2. Contenido de esteroides en la biomasa fúngica de *Pleurotus ostreatus* cultivado en sustrato de cacao en comparación con otros Basidiomicetos<sup>16</sup>

Especie	Sustrato	Exposición a la luz (h)	Esteroides (mg %, base seca)
<i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> CP-184	Cacao	4	115
<i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> CP-184	Cacao	8	141
<i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> CP-184	Cacao	12	349
<i>P. ostreatoroseus</i> Singer CP-34	Paja de cebada	12	195
<i>P. ostreatus</i> sp. cfr. <i>florida</i> CP-11	Paja de cebada	12	139
<i>P. ostreatus</i> sp. cfr. <i>florida</i> CP-26	Paja de cebada	12	281
<i>P. sajor-caju</i> (Fr.) Singer CP-16	Paja de cebada	12	267
<i>P. sajor-caju</i> (Fr.) Singer CP-28	Paja de cebada	12	199
<i>P. sajor-caju</i> (Fr.) Singer CP-16	Pulpa de café	12	477
<i>P. sajor-caju</i> (Fr.) Singer CP-16	Pulpa de café-rastrojo de frijoles	12	400
<i>P. ostreatus</i> CP-15	Paja de cebada + 0,1 % de acetato de sodio	12	198
<i>P. ostreatus</i> CP-15	Pulpa de café + 1 % de acetato de sodio	12	469
<i>P. ostreatus</i> CP-15	Pulpa de café + 1 % de acetato de sodio	Ausencia	124

tenecientes a las 3 variantes experimentales se observaron manchas fuertemente coloreadas con los vapores de yodo, con valores de Rf similares al obtenido para el patrón de ergosterol (0,774) y además, una mancha débil en el extracto correspondiente al grupo G<sub>12</sub>, equivalente al Rf obtenido para el peróxido de ergosterol (0,65).

Las concentraciones de micosteroides totales determinadas por cromatografía gaseosa mostraron un aumento en función de la cantidad de luz recibida durante el tiempo de fructificación (tabla 2).

## DISCUSIÓN

La calidad y cantidad de luz que recibe el hongo en su fase de fructificación para la formación y maduración de los cuerpos fructíferos es un factor importante en el

rendimiento y eficiencia biológica. Una eficiencia biológica adecuada debe ser de alrededor o más del 100 %, siguiendo el método generalmente usado en las evaluaciones de cultivo de los hongos.<sup>11</sup> De acuerdo con los datos obtenidos de eficiencia biológica y rendimiento en *P. ostreatus* cultivado sobre residuos del cacao, se demostró que la exposición del hongo a la luz a tiempos menores de 12 h disminuye la eficiencia biológica en el 68 % y el rendimiento en el 63 %. Resultados similares han sido referidos para la fermentación en estado sólido con pulpa de café.<sup>12</sup>

Desde el punto de vista morfológico, en los cultivos expuestos a 4 y 8 h de luz no fue observado el completo desarrollo del cuerpo fructífero. Este comportamiento se atribuye al hecho de que en la oscuridad se manifiestan fenómenos de etiología: el

estípites de los cuerpos esporíferos se alarga y el píleo se reduce. En este caso incide fundamentalmente la limitación de radiaciones azules.<sup>13</sup>

Las concentraciones de lípidos totales en la biomasa de *P. ostreatus* en los diferentes tratamientos no presentaron diferencias apreciables y resultaron superiores a las de otros Basidiomicetos como *Pholiota lenta* y *Phellinus sp. Quel.* Ello podría estar relacionado con la naturaleza del hongo, la composición del sustrato utilizado, así como las condiciones ambientales y experimentales empleadas.

En los últimos años se han logrado avances significativos en el conocimiento de los esteroides existentes en los hongos comestibles y se han descrito nuevas estructuras.<sup>14,15</sup> En el presente trabajo se determinó la presencia de los micosteroides (ergosterol y peróxido de ergosterol) en la biomasa de *P. ostreatus*, los cuales fueron demostrados en los 3 grupos experimentales. El peróxido de ergosterol es un producto de la oxidación del ergosterol y difícilmente puede ser utilizado en la síntesis de vitamina D<sub>2</sub>. Por TLC se observó que dicho compuesto se encuentra en cantidades muy pequeñas en los extractos analizados.

La concentración de ergosterol en la biomasa fúngica aumenta con la cantidad de luz recibida durante el tiempo de fructificación, como se pone de manifiesto en nuestros resultados. Las experiencias de *Trigo* y otros<sup>16</sup> refieren niveles de ergosterol en los cuerpos fructíferos que varían de 5 a

630 mg % en dependencia de las especies, cepas y factores externos como la luz, sustrato y concentración de acetato de sodio añadida.

Las fuentes naturales de la vitamina D son limitadas y por lo tanto, la forma sintética es normalmente usada para la nutrición animal y humana. La vitamina D preformada de la dieta proviene del aceite de hígado de pescado o de fuentes naturales irradiadas. Las preparaciones disponibles comercialmente de vitamina D son productos de irradiación ultravioleta del ergosterol de levaduras.<sup>17</sup>

En algunos laboratorios, una buena producción de ergosterol ha sido asimilada a partir de *P. ostreatus*. Producir hongos comestibles del género *Pleurotus*, cultivados en subproductos agrícolas como el cacao, con el fin de utilizar la biomasa fúngica como fuente comercial de vitamina D<sub>2</sub> por irradiación directa con luz ultravioleta para preparados farmacéuticos y suplementos nutricionales, resulta una alternativa prometedora ya que el proceso biotecnológico empleado es relativamente sencillo.

Nuestros resultados indican una influencia significativa de la luz en el contenido de ergosterol en los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*, y a pesar de no ser concluyentes, abren nuevas posibilidades para abordar con mayor profundidad el potencial de esta especie, cultivada en subproductos agrícolas, como materia prima en la obtención de vitamina D<sub>2</sub>.

## SUMMARY

The effect of the time of exposure to light during the period of fructification on the concentration of mycosterols (ergosterol and its peroxide) from *Pleurotus ostreatus var florida*, cultivated by fermentation in solid state on cacao residuals in Ecuador, was evaluated. The exposure of the fungus to light at times lower than 12 hours reduced the biological efficiency by 68 % and the yield by 63 %. No significant variations were observed in the concentration of total lipid compounds in cultures, whereas the concentrations of total mycosterols, determined by gas chromatography, showed an increase according to the light received: 115, 141 and 349 mg % corresponding to times of exposure of 4, 8, and 12 hours. These results make it possible to approach in detail the potentiality of this species as a raw material to obtain ergosterol (provitamin D<sub>2</sub>).

*Subject headings:* PLEUROTUS/isolation & purification; CHROMATOGRAPHY, GAS/methods; LIGHTING/methods; ERGOCALCIFEROLS; CHOLECALCIFEROL.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chang ST, Buswell JA. Mushroom nutraceuticals. *World J Microbiol Biotechnol* 1996;12:473-6.
2. Manzi P, Gambelli L, Marconi S, Vivanti V, Pizzoferrato L. Nutrients in edible mushrooms: an interspecies comparative study. *Food Chem* 1999;65:477-82.
3. Manzi P, Aguzzi A, Pizzoferrato L. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. Food mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J Agric Food Chem* 2001;49:2348-8.
4. Mattila P, Konko K, Eurola M, Pihlava JM, Astola J, Vahteristo L, et al. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J Agric Food Chem* 2001;49:2343-8.
5. Trigos A, Franco G. Determinación de ergosterol en hongos silvestres mexicanos. *Micol Neotrop Apl* 1993;6:105-8.
6. Trigos A, Zayas T, Ortuño L, Sobal M, Morales P. Contenido de ergosterol en algunas especies cultivadas de *Pleurotus*. *Micol Neotrop Apl* 1994;7:43-6.
7. Uskokovic MR, Partridge JJ, Narwid TA, Baggolini EG. Synthesis of vitamin D metabolites and analogs. En: Norman AW, ed. *Vitamin D, molecular biology and clinical nutrition*. Nww York: Marcel Dekker, 1980:105-8.
8. Cáceres A. Las vitaminas en la nutrición humana. Santiago de Cuba: Editorial Oriente, 2000:85-6.
9. Donoso CR. Influencia de la luz en la composición lipídica y proteica del *Pleurotus ostreatus* var. Florida. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 1999.
10. Folch J, Lees M, Sloane G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497-509.
11. Guzmán G, Mata G. El cultivo de los hongos comestibles. Ciudad México, DF: Instituto Politécnico Nacional, 1993:245.
12. Bermúdez RC, García N, Gross P, Serrano M. Cultivation of *Pleurotus* on agricultural substrates in Cuba. *Micol Apl Int* 2001;13:25-9.
13. Strassburger E, Noll F, Schenck H, Schimper W. *Tratado de Botánica*. Barcelona: Marín, 1974:799.
14. Chobot V, Opletal L, Jahodar L, Patel AV, Dacke CG, Blunden G. Ergosta-4,6,8,22-tetraen-2-ona from the edible fungus *Pleurotus ostreatus* (Oyster fungus). *Phytochemistry* 1997;45:1669-71.
15. Yaoaita Y, Amemiya K, Ohnuma H, Furumura K, Masaki A, Matzuki T, et al. Sterol constituents from five edible mushrooms-Part III. *Chem Pharm Bull* 1998;46:944-50.
16. Trigos A, Martínez-Carrera D, Hernández R, Sobal M. Ergosterol content in fruit bodies of *Pleurotus* is variable. *Micol Apl Int* 1997;10:93-6.
17. Almeida-Lima U, Aquqrone E, Borzani W. *Biotecnologia: Tecnologia das fermentações*. Sao Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1987:285.

Recibido: 15 de octubre del 2001. Aprobado: 28 de noviembre del 2001.

Dra. Rosa Catalina Bermúdez Savón. PO Box 4002. Santiago de Cuba, CP 90800, Cuba.