

Caracterización y cultivo de tres cepas de *Pleurotus eryngii* (Fries) Quélet sobre sustratos basados en residuos agroalimentarios

Alberto Andrino, Asunción Morte y Mario Honrubia

Departamento de Biología Vegetal (Botánica). Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100, Murcia.

Thader Biotechnology S.L. Parque Científico de Murcia. Edif. S. Crt. de Madrid Km 388. Espinardo

Resumen

Correspondencia

A. Andrino

E-mail: andrino@um.es

Recibido: 1 marzo 2011

Aceptado: 27 mayo 2011

Publicado on-line: 7 junio 2011

Pleurotus eryngii (Fr.) Quélet, conocida como seta de cardo, es un excelente comestible que pertenece al grupo de hongos de la pudrición blanca. Gracias a su versátil complejo enzimático lignocelulósico, se conocen diversas aplicaciones biotecnológicas y medicinales de esta especie de basidiomiceto. El objetivo de este trabajo se ha centrado en mejorar la producción de la misma. Se han caracterizado los óptimos de crecimiento miceliares de dos cepas silvestres de seta de cardo en medio sólido y líquido. Se evaluó la productividad de tres cepas de seta de cardo sobre diversos residuos agroalimentarios (cascarilla de arroz, paja de trigo, aserrines y bagazo) con el fin de conocer la viabilidad de los mismos para producción de basidiomas. El bagazo, subproducto de la fabricación de la cerveza, se ha usado por primera vez en el cultivo de *P. eryngii*, resultando ser el sustrato más efectivo donde fructificaron las tres cepas.

Palabras clave: Bagazo, Subproducto agrícola, Lignina, Celulosa, Beta-glucano, Eficiencia biológica, *Eryngium campestre*.

Abstract

Characterization and culture of three Pleurotus eryngii (Fries) Quélet strains on food and agriculture wastes.

Pleurotus eryngii (Fr.) Quélet commonly known as king oyster mushroom, it is an excellent edible fungus that belongs to the group of white-rot fungi. Thanks to its versatile lignocellulosic enzymatic complex, diverse biotechnological and medicinal applications have been found. The aim of our work have centered on improving its production. In this work we have characterized the optimum growth parameters of two strains of king oyster mushroom in solid and liquid media. Also, we have evaluated productivity of three strains on diverse food and agriculture wastes (rice husk, straw of wheat, sawdust and bagasse) in order to know the production viability of basidiomata. The bagasse, beer production waste, it has been used for the first time in the cultivation of *P. eryngii*, turning out to be the most effective substratum where the three strains fructified.

Key words: Bagasse, Agricultural waste, Lignin, Cellulose, Beta-glucan, Biological efficiency, *Eryngium campestre*

Introducción

Pleurotus eryngii (Fr.) Quél., o seta de cardo, tiene una larga tradición en su recolección y consumo por sus excelentes características organolépticas. *P. eryngii* es un hongo basidiomiceto del orden Agaricales, familia Pleurotáceas (Tabla 1). Las especies del género *Pleurotus* son lignícolas saprotóficas o parásitas, pertenecientes al grupo de hongos de la pudrición blanca. Éstos son eficientes descomponedores de maderas duras y blandas, que hacen accesible la celulosa al resto de los microorganismos tras su deslignificación (Martínez et al. 2005). Las especies pertenecientes al complejo *P. eryngii* son parásitos débiles, pudiendo encontrarlas viviendo en las raíces o en la base de los tallos de las plantas vivas o muertas, de la familia de las umbelíferas (Zhang et al. 2006).

Singer (1986), describe 38 especies y asigna algunas nuevas como hongos del género *Pleurotus* basándose en caracteres morfológicos. Posteriores estudios moleculares basados en técnicas de PCR-RFLP de la región IGS2 en combinación con el estudio de las secuencias de ADN ribosomal de la subunidad pequeña (SSU rDNA) revelan la existencia de 12 complejos de especies biológicas del género *Pleurotus* (Urbanelli et al. 2002). En el estudio realizado se trabajó con cepas del complejo de especies de *P. eryngii*, variedad *eryngii*, recogidas al pie de *Eryngium campestre* L., salvo en la de origen comercial.

La valoración de los rasgos genéticos y la diversidad fenotípica son de gran importancia para

distinguir aquellas cepas con genotipos de *P. eryngii* interesantes, para la obtención de cosechas potencialmente altas (De Gioia et al., 2005). Se ha descrito que el complejo de especies de *P. eryngii* muestra gran diversidad genética (Zhang et al. 2006). Se apunta que el estudio de la región IGS2, por análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP), pueda llegar a ser un marcador en ADN eficiente para caracterizar y proteger los derechos del productor, comportándose con mayor fiabilidad que las descripciones morfológicas del cuerpo fructífero, dado que la morfología del mismo es susceptible de variación por las condiciones ambientales (Zhang et al. 2006).

Actualmente, el género *Pleurotus* es fuente de un potencial biotecnológico muy prometedor (Tabla 2), que abarca multitud de campos de aplicación (Cohen et al. 2002), donde destacan aquellas aplicaciones que se sirven principalmente de su batería enzimática lignolítica, además de sus beta-glucanos y proteínas de bajo peso molecular. Estas se basan en el sistema lignolítico de los hongos de la pudrición blanca, proceso clave para el reciclado de carbono en los ecosistemas terrestres. Éste está compuesto por un conjunto de enzimas oxidativas: peroxidasas de lignina (LiP), peroxidasas dependientes de manganeso (MnP) y lacasas (Cohen et al. 2002).

El sistema lignolítico de *P. eryngii* se investiga para vislumbrar su funcionamiento y regulación (Gomez-Toribio et al. 2001, Guillén et al. 2000, Stajić et al. 2006b) así como la purificación de las enzimas implicadas (Guillén et al. 1992, Muñoz et

Variación	Características principales	Fenología y hábitat	Distribución
Clasificación (Kirk et al. 2001) División: Basidiomicetes. Orden: Agaricales. Familia: Pleurotáceas. <i>Pleurotus eryngii</i> Variedad: <i>eryngii</i> .	Sombrero: 5-15 cm.; convexo al principio, ligeramente deprimido al madurar, pardo con tonalidades crema al principio. Las láminas son decurrentes, bastante gruesas, de color blanquecino, aunque, al envejecer tornan crema, anastomosadas al pie (Zervakis et al. 2001b) Pie: entre los 3 - 6 x 0,5 -3 cm, cilíndrico, de central a ligeramente excéntrico, atenuado en la base, de color blanco. La carne es de color blanco (Zervakis et al., 2001b). Esporada: blanca. Esporas elipsoidales, lisas, de 10,5-12,5 x 5-6 micras (Zervakis et al., 2001b).	Fenología: desde comienzos del otoño hasta finales de invierno, pudiendo reaparecer al comienzo de la primavera en presencia de precipitaciones. Se encuentran solas o en grupos fasciculados (Zervakis et al., 2001b). Hábitat: climas cálidos. Crece sobre las raíces del cardo corredor (<i>Eryngium campestre</i>); altitud de 0 -1500 m, en lugares secos, prados soleados, bosque claro (Delmas, 1989)	-Europa occidental y central. - Suroeste de Rusia. - Asia Central (Delmas, 1989)

Tabla 1. Descripción detallada de *P. eryngii* var. *eryngii*.

Table 1. Detailed description of *P. eryngii* var. *eryngii*.

Aplicaciones ganaderas		
• Alimento	Se procesa el residuo agroalimentario con hongos de la pudrición blanca que hace disponible la materia orgánica. Este proceso facilita a los rumiantes su consumo.	(Okano et al. 2006a)
Aplicaciones agrícolas		
• Nematicida	Efectos tóxicos frente a algunas especies de nematodos y sus cistes, <i>Meloidogyne javanica</i> (Treub, 1885), <i>Heterodera schachtii</i> (Schmidt, 1871), <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> (Steiner y Buhner, 1934).	(Heydari et al. 2006, Mamiya 2006, Mamiya et al. 2005a, Mamiya et al. 2005b, Palizi et al. 2009)
Aplicaciones industriales		
• Industria alimentaria	Fuente de sabores y aromas a vainilla y anís, utilizando como precursor la lignina.	(Lomascolo et al. 1999)
• Industria papelera	Abordaje de otra cohorte de nuevas materias primas ricas en lignina y celulosa para la obtención de pulpa para papel.	(Durán et al. 2002, Martínez et al. 2009, Martínez et al. 1994, Ruiz-Dueñas & Martínez 2009, Sigoillot et al. 2005)
• Industria textil	Decoloración de tintes industriales: cristal violeta, verde brillante, negro nº 5, azul nº 38, naranja g, azul brillante r.	(Eichlerova et al. 2006; Wesenberg et al. 2003)
• Materias primas: quitina y quitosano.	Aplicación en cosmética, medicamentos, agricultura, tratamiento de aguas y absorción de metales pesados.	(Di Mario et al. 2008)
Biorremediación		
• Compuestos xenobióticos	Detoxificación y recuperación de ambientes degradados por compuestos orgánicos	(Baldrian 2006, Morozova et al. 2007, Reddy 1995, Rodríguez Estrada et al. 2004, Suganya y Subramanian 2007)
• Metales pesados/compuestos radioactivos	Translocación de metales pesados/compuestos radioactivos al interior de los basidiomas.	(Baeza et al. 2006, Baldrian, 2003, Dogan et al. 2006, Urban 2005)
• Alpechín	El alpechín es el residuo generado de la extracción del aceite de oliva. Éste resulta un residuo muy tóxico en las almazaras.	(Lacóni et al. 2007, Ramos-Cormenzana et al. 1995, Zervakis et al. 1996)
Aplicaciones médicas		
• Antialérgeno	Extractos etanólicos inhiben la respuesta inmune en ratones.	(Lindequist et al. 2005)
• Antifúngico	Eringina, péptido extraído del basidiomas que inhibe el crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Mycosphaerella arachidicola</i> .	(Wang & Ng 2004)
• Antiviral	Pleurerina, proteasa que muestra cierta actividad frente a la transcriptasa inversa del HIV-1.	(Wang & Ng 2001)
• Antitumoral	Esteroles como el peróxido de ergosterol y una enzima de bajo peso molecular, la Eringeolisina, presentes en los cuerpos fructíferos impiden la proliferación de algunas líneas celulares tumorales.	(Lee et al. 2006, Ngai & Ng 2006; Yaoita et al. 2002)
• Antioxidante	Se pone de manifiesto la buena actividad secuestradora de radicales libres de extractos etanólicos.	(Fu et al. 2002)
• Agente anticolesterolémico	Reducción de los niveles de colesterol.	(Croan 2004)
• Regulador hormonal	Aumento en la expresión y producción de osteocalcina y de osteoprotegerina	(Kim et al. 2006, Shimizu et al. 2006)
• Efectos prebióticos	Los beta-glucanos de basidiomicetes son una clase de polisacáridos con potenciales usos biológicos. La presencia de glucanos y proteoglucanos, con propiedades prebióticas en extractos acuosos obtenidos de los basidiomas. Estos compuestos mejoran el crecimiento <i>in vitro</i> de ciertas bacterias presentes de forma natural en el colon, <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> y <i>Enterococcus</i> .	(Carbonero et al. 2006, Carbonero et al. 2008, Synytsya et al. 2009)

Tabla 2. Conjunto de potenciales aplicaciones de *P. eryngii* var. *Eryngii*.Table 2. Set of potential applications of *P. eryngii* var. *eryngii*.

al. 1997, Wang & Ng, 2006) y la afinidad de sustratos (Martínez et al. 2005) expresión en sistemas heterólogos (Ferreira et al. 2006, Ruiz-Dueñas et al. 2006) así como su funcionamiento bajo distintas condiciones de cultivo (Stajić et al. 2005, Stajić et al. 2009, Stajić et al. 2006a).

Los hongos presentan una composición nutricional donde se encuentran azúcares, proteínas y vitaminas hidrosolubles la mayoría, así como una equilibrada composición de minerales (Kurtzman, 1997). Las setas del género *Pleurotus* se presentan como una fuente complementaria de proteínas en aquellos lugares donde las condiciones de cultivo lo permiten (La Guardia et al., 2005). El valor nutritivo de *P. eryngii* es el adecuado para que forme parte de dietas pobres en proteínas. Cubre las necesidades proteicas diarias expuestas por la FAO, posee un 5,3 % de proteínas en 100 gr de peso seco, con niveles normales de aminoácidos esenciales; la fracción mineral revela altos niveles de potasio, bajos de sodio, relación muy adecuada para dietas asociadas a hipertensión; rica en vitamina B12 y niacina; en cuanto a los carbohidratos se refiere la glucosa es el azúcar presente mayoritariamente, seguido por manosa y trehalosa (Gençcelep et al. 2009, Kim et al. 2009, La Guardia et al. 2005, Manzi et al. 1999). Las mejores condiciones para su conservación después de su cosechado se dan en atmósfera protectora (0 °C; 3% O₂ + 20% CO₂), con empaquetados en plásticos microperforados o sin agujeros, manteniendo su buena apariencia hasta 3 semanas (Sapata et al., 2009). Una vez cocinado con aceites vegetales, *P. eryngii* mantiene su valor nutritivo y acepta el envasado en latas de metal y botes de cristal, conservando su textura y apariencia saludables (Manzi et al. 2004; Takahasi & Inada 2003).

Los sustratos de cultivo a utilizar provienen normalmente de actividades agrícolas, agroindustriales y forestales. Dentro de la amplia gama de estos subproductos agrícolas o agroindustriales predominan los de naturaleza lignocelulósica. Para su utilización a nivel de producción, estos sustratos deben cumplir algunas condiciones: disponibilidad, características físico-químicas, precio, facilidad de manejo y transporte (Stamets 2000).

El cultivo de *P. eryngii* está todavía lejos de alcanzar un nivel óptimo de productividad. Asociadas al cultivo de *P. eryngii* se han registrado una serie de patologías víricas (Ro et al. 2007)

y bacterianas (Gonzalez et al. 2009; Kim et al. 2007) que pueden mermar la productividad de los cultivos. Así mismo, la formulación de un sustrato de cultivo específico junto con el establecimiento de las condiciones adecuadas de cultivo dependientes de cada cepa son dos factores determinantes para la optimización del cultivo. Sobre la base de estas directrices se plantean los objetivos de este trabajo:

- Realizar la caracterización biotecnológica de dos cepas silvestres de *P. eryngii*, con el fin de conocer las condiciones óptimas de crecimiento micelial.
- Estudiar la eficiencia biológica de tres cepas de *P. eryngii*, sobre sustratos basados en residuos agroalimentarios.

Material y métodos

Caracterización biotecnológica de dos cepas silvestres de *P. eryngii*

Material fúngico. Aislamiento y mantenimiento del cepario

Las tres cepas de *P. eryngii* evaluadas en el presente estudio, se aislaron según Honrubia et al. (1995) y se encuentran depositadas en el Banco Micológico del Grupo de Investigación Micología/Micorrizas del Departamento de Biología Vegetal, Área de Botánica de la Universidad de Murcia. Los orígenes y características de cada cepa se detallan en la Tabla 3. Las cepas han sido mantenidas en medio PDA (Biokar) pH 7, a 20 °C (Fig. 1A).

Cepa	Localización	Hábitat
PLERPER	Peralejos de las Truchas. Guadalajara	Altitud 1261 msnm. Comarca del Alto Tajo. Piso bioclimático supramediterráneo
PLERSE	Sierra Espuña. Murcia.	Altitud 1104 msnm. Estribación de las cordilleras Béticas. Piso bioclimático supramediterráneo
PLERCOM	Comercial. Cultiset. S.A. Santa Pola. Alicante	Cultivo

Tabla 3. Detalle de las tres cepas de *P. eryngii* evaluadas en el presente estudio.

Table 3. Detail of three strains of *P. eryngii* evaluated in the present study.



Figura 1. **A.** Detalle del micelio de *Pleurotus eryngii* (Fr.) Qué!; **B.** Cultivo en biorreactor BIostat Q (Braun); **C.** Detalle de la inoculación del sustrato; **D.** Sustrato de bagazo colonizado. Detalle del raspado o *kinkaki*; **E.** Desarrollo de los primordios; **F.** Primera florada de la seta de cardo.

Figure 1. **A.** Detail of the *Pleurotus eryngii* (Fr.) Qué! mycelia **B.** Culture in bioreactor BIostat Q (Braun); **C.** Detail of the inoculation of the substrate; **D.** Bagasse substrate colonized by mycelia. Detail of the scratch or *kinkaki*; **E.** Development of primordia; **F.** First crop of the king oyster mushroom.

Optimización del crecimiento miceliar en medio sólido

Se ha trabajado con los medios de cultivo PDA (Biokar), extracto de Malta (Sharlau) (Sánchez y Royse 2001) y el medio CYM (Raper et al., 1972) a pH 7. Inoculamos 5 placas con micelio de cada cepa silvestre (PLERPER y PLERSE). Cada 48 horas medimos el crecimiento del micelio. Estos datos se utilizan para obtener la velocidad de crecimiento. Recogemos el micelio crecido en la superficie del celofán (Brundrett 1996), para determinar su peso fresco y peso seco. La caracterización del crecimiento miceliar se realiza sometiendo las cepas a una batería de temperaturas de 18°, 21°, 25° y 28 °C.

Cultivo en biorreactor

En un fermentador de aspas BIOSTAT Q (Braun Biotech), con 2 cubas de 1 litro (Fig. 1B), cultivamos la cepa silvestre PLERSE, que es la más productiva en función del peso seco obtenido (véase apartado de resultados). Las cubas se llenan del medio CYM (sin agar) y PDB (Biokar), que son los medios más productivos (véase apartado de Resultados). El fermentador se configura con una Tª de 25 °C, pH 7, 100 r.p.m, las condiciones de cultivo óptimas para esta cepa. La duración del cultivo en medio líquido es de 7 días. A continuación, se determina el peso fresco y seco del micelio.

Ergosterol

Su cuantificación permite estimar la biomasa fúngica metabólicamente activa. Por ello, se trata de un buen indicador de la actividad metabólica fúngica (Carrillo et al., 2004). Se toma una muestra a los 7 días de cultivo. Se lleva a cabo la extracción utilizando metanol. La determinación de la concentración de ergosterol se lleva a cabo en un cromatógrafo Kontron con una columna Kromasil 100 C18, D 5 µm tamaño de partícula (Carrillo et al. 2004).

Eficiencia biológica sobre sustratos basados en residuos agroalimentarios

Selección y preparación de los sustratos

Para el procesamiento de cada uno de los sustratos propuestos en la Tabla 4, se trocea, humecta y autoclava a 115 °C durante 60 minutos (Rodríguez Estrada & Royse 2007). Se lleva a cabo un análisis de fibras, lignina y celulosas utilizando el método Van Soest (Rolz et al. 1986).

Sustrato	Origen
Cascarilla de arroz (CA) (Akyüz & Yildiz 2008, Hanai et al. 2005, Miki et al. 2005, Okano et al. 2007)	Cooperativa del Campo "Virgen de la Esperanza", Av. Juan Ramón Jiménez, 57. Calasparra. Murcia. España
Paja de trigo (PT) (Akyüz & Yildiz 2008, Arvanitoyannis & Tserkezou 2008, Gaitán-Hernandez 2005, Maddau et al. 2002, Zervakis et al. 2001b)	Mayorista de alimentación de animales. Molina de Segura. Murcia. España
CA (70-80 %) + Aserrines (20-30 %) (Croan 2004, Rodríguez Estrada & Royse 2007, Song et al. 2005, Zervakis et al. 2001a)	Empresa maderera del Pol. Ind. Camporroso. C/ Ciudad Real, 4 Chinchilla. Albacete. España. Composición cualitativa del aserrín: maderas del gen. <i>Pinus</i> , <i>Populus</i> spp.
PT (70-80 %) + Aserrines (20-30 %) (Croan 2004, Rodríguez Estrada & Royse 2007, Song et al. 2005, Zervakis et al. 2001a)	
Bagazo de cervecera (Pongrácz, 2004)	Fábrica de cervezas Estrella de Levante. C/ Mayor, 171. Espinardo. Murcia. España. Composición cualitativa: subproductos de la cocción de malta de cebada, maíz y arroz.

Tabla 4. Sustratos propuestos para el cultivo de *P. eryngii*.

Table 4. Substrates proposed for the cultivation of *P. eryngii*.

Inoculación de los sustratos

En cámara de flujo laminar se inocula cada bote de sustrato con discos de agar de 5 mm de diámetro donde previamente se han hecho crecer las tres cepas de *P. eryngii*. El inóculo se reparte homogéneamente. Se tapan los botes para favorecer altas concentraciones de CO₂. A continuación, se establecen las condiciones de incubación a 21 °C, temperatura a la cual las cepas silvestres han registrado un crecimiento más rápido del micelio; oscuridad; 70% humedad relativa ambiental (Ohga 2000). La cepa PLERCOM también se ajusta a 21 °C, temperatura aconsejada por el fabricante del kit de cultivo (Cultiset). Se mantienen estas condiciones hasta que no se aprecian el color y textura originales de los sustratos y solo es visible el micelio blanco característico de *P. eryngii* (Fig. 1C).

Inducción de primordios y fructificación

Se retiran las tapas (Fig. 1D). En ambiente estéril, se realiza un raspado superficial (*kinkaki*) de una

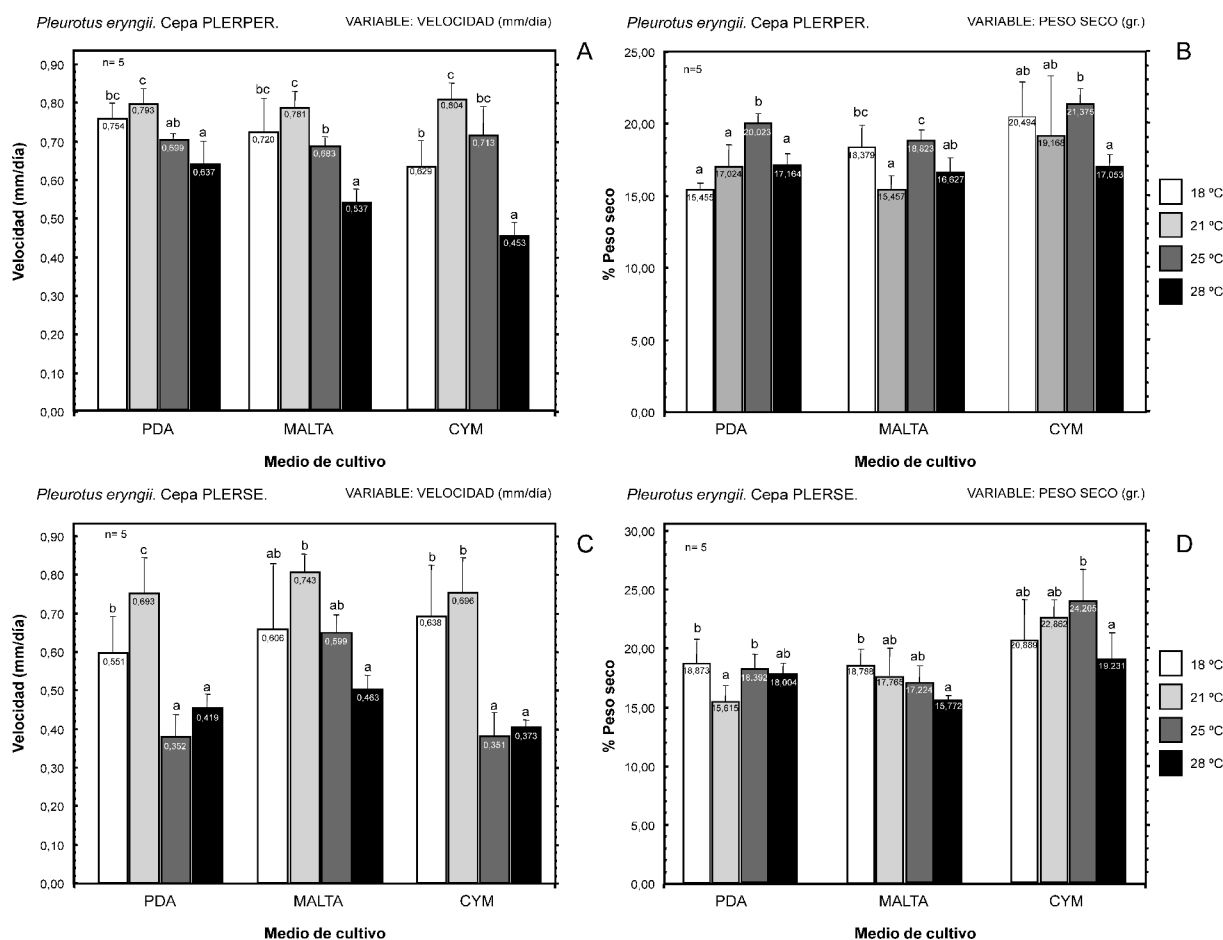


Figura 2. **A:** Velocidad de crecimiento (mm/día) de la cepa PLERPER. **B:** Peso seco (%) de la cepa PLERPER. **C:** Velocidad de crecimiento (mm/día) de la cepa PLERSE. **D:** Peso seco (%) de la cepa PLERSE. Medios de cultivo: PDA, MALTA y CYM. Cada barra dentro de cada medio se corresponde con una temperatura. Las columnas pertenecientes a cada medio y que no comparten la misma letra son significativamente diferentes en el test ANOVA ($p=0,05$).

Figure 2. **A:** Growth speed (mm / day) of PLERPER strain. **B:** Dry weigh (%) of PLERPER strain. **C:** Growth speed (mm / day) of PLERSE strain. **D:** Dry weigh (%) of PLERSE strain. Growth media: PDA, MALTA and CYM. Every bar inside every media corresponds to a temperature. The columns belonging to each medium and that do not share the same letter are significantly different in ANOVA test ($p=0,05$).

profundidad no superior a 5mm en la superficie visible del micelio al retirar la tapa, con la ayuda de un bisturí estéril (Ohga 2000, Rodríguez Estrada & Royse 2007). Se añade una capa de cobertura de turba triturada estéril para mantener la humedad. A continuación, se aplica un riego con agua del grifo de aproximadamente 10ml por bote de sustrato. Las condiciones del cultivo para la inducción de los primordios y fructificación son: T^a 16 °C, una iluminación con luz fluorescente con una intensidad de 350 lux, fotoperiodo 16h luz/8h oscuridad (Ohga 2000).

Al retirar las tapas se asegura la aireación del micelio, factor importante en el cultivo de *P. eryngii* (Maddau et al. 2002, Zadrazil, 1974). Tras el desarrollo de los primordios, en unos días aparecen los cuerpos fructíferos, listos para ser cosechados (Fig. 1E). La seta se corta justo en la base

del pie, en el momento en que el sombrero se recurva, este es un indicio de madurez (Sánchez & Royse 2001) (Fig. 1F). Se pesan y secan (48h, 80 °C) los cuerpos fructíferos para estimar la fracción en peso seco. Esta operación se repite para una segunda florada. Con los datos del peso seco del sustrato y del peso fresco de los basidiomas, se obtiene el valor del porcentaje de Eficiencia Biológica (EB) y con el número de días de cultivo se obtiene el valor de la Tasa de Producción (TP) (Sánchez & Royse 2001).

Para el análisis de las diversas interacciones de las variables independientes ‘porcentaje del peso seco’ y ‘velocidad de crecimiento micelial (mm/día)’ con los diversos niveles de los factores ‘temperatura’, ‘medio’ y ‘pH’ para cada cepa silvestre (PLERPER y PLERSE), se ha llevado a cabo sendos análisis de la varianza, univariante de

dos vías, sirviéndonos del software estadístico SPSS v.15.

Resultados y discusión

Caracterización biotecnológica de dos cepas silvestres de *P. eryngii*

Optimización del crecimiento micelial en medio sólido

En general, las variables dependientes velocidad de crecimiento y peso seco presentan diferencias significativas en cuanto a la T^a y el medio de cultivo, para ambas cepas (Fig. 2).

Cultivo en biorreactor

La biomasa para el medio CYM es de 61,751 g frente a los 6,105 g del PDB tras 7 días de cultivo en el biorreactor. Se acompañan los datos de porcentaje en peso seco (Tabla 5).

Ergosterol

Tras el análisis por HPLC, se obtiene una lectura de concentración de 4,68 µg/mg en peso fresco de ergosterol para el medio CYM, frente a 8,105 µg/mg en peso fresco del medio PDB (Tabla 5).

Eficiencia biológica sobre sustratos basados en residuos agroalimentarios

Tras preparar los sustratos, se obtienen una serie de valores de % peso seco y húmedo junto con la composición en fibras totales, presencia de celulosa, hemicelulosa y lignina, con valores expresados en porcentaje (Tabla 6).

Tras la inoculación de todos los sustratos, solo

el sustrato del bagazo es colonizado por *P. eryngii* (Fig. 1D), por lo tanto, sólo los cultivos en bagazo están preparados para la fructificación.

Las tres cepas de trabajo fructifican en el sustrato de bagazo. La cepa PLERPER consigue una eficiencia biológica (EB) del 87,35%. La producción da lugar a 2 floradas, de 78,18% y 21,82% para las 1^a y 2^a floradas, respectivamente. El proceso de producción necesita de 83 días. La tasa de producción (TP) es de 1,05% diaria (Fig. 3).

La cepa PLERCOM consigue una EB del 77,48%. La producción da lugar a una única florada. El proceso de producción necesita de 61 días. La TP es de 1,27% diaria (Fig. 3).

La cepa PLERSE consigue una EB del 41,02%. La producción da lugar a 2 floradas con un 76,17% y un 23,83% para las 1^a y 2^a floradas, respectivamente. El proceso de producción necesita de 90 días. La TP es de 0,45 % diaria (Fig. 3).

La cepa PLERPER presenta la máxima velocidad de crecimiento micelial (mm/día) a 21 °C (p=0,05). Al comparar los diferentes medios de cultivo entre sí, a 21 °C, no se han hallado diferencias significativas (p=0,05). Respecto a la variable peso seco la cepa PLERPER produce mayor biomasa a 25 °C (p=0,05). Una vez comparados los medios de cultivo entre sí, a 25 °C, sólo se han registrado diferencias significativas del medio de cultivo CYM respecto de los demás (p=0,05).

La cepa PLERSE, muestra los valores más altos de velocidad (mm/día) a la T^a de 21 °C. Para las temperaturas 25° y 28 °C, ésta disminuye en más de un 40% respecto de la máxima a 21 °C en los

Medio de cultivo	Peso fresco de la biomasa total (gr.)	Peso seco de la biomasa total (gr.) / (%)	Ergosterol (µg/mg)	Valor medio ergosterol (µg/mg)	Desviación estándar
CYM - M1	61,751	14,943/24,19	4,920	4,680	0,340
CYM - M2			4,440		
PDB - M1	6,105	1,098/17,98	8,356	8,105	0,350
PDB - M2			7,854		

Tabla 5. Resultados de concentración de ergosterol de la cepa PLERSE en medio CYM y PDB.

Table 5. Results of ergosterol concentration of the strain PLERSE in CYM and PDB media.

Sustrato	Peso seco (%)	Humedad (%)	Fibra bruta (% sms)	Celulosa (% sms)	Hemicelulosa (% sms)	Lignina (% sms)
Bagazo	28,071	71,929	15,530	15,230	19,670	12,010
Paja de trigo (PT)	32,038	67,962	41,520	38,540	28,770	6,130
Cascarilla de arroz (CA)	71,111	28,889	50,200	38,850	19,740	16,500
PT + aserrín	61,392	38,608	44,770	36,060	12,160	15,450
CA + aserrín	51,595	48,405	48,960	37,850	15,590	19,710

Tabla 6. Características físico-químicas de los sustratos. % sms: porcentaje sobre materia seca.

Table 6. Physical-chemical characteristics of the substrate. % sms: percent in dry matter.

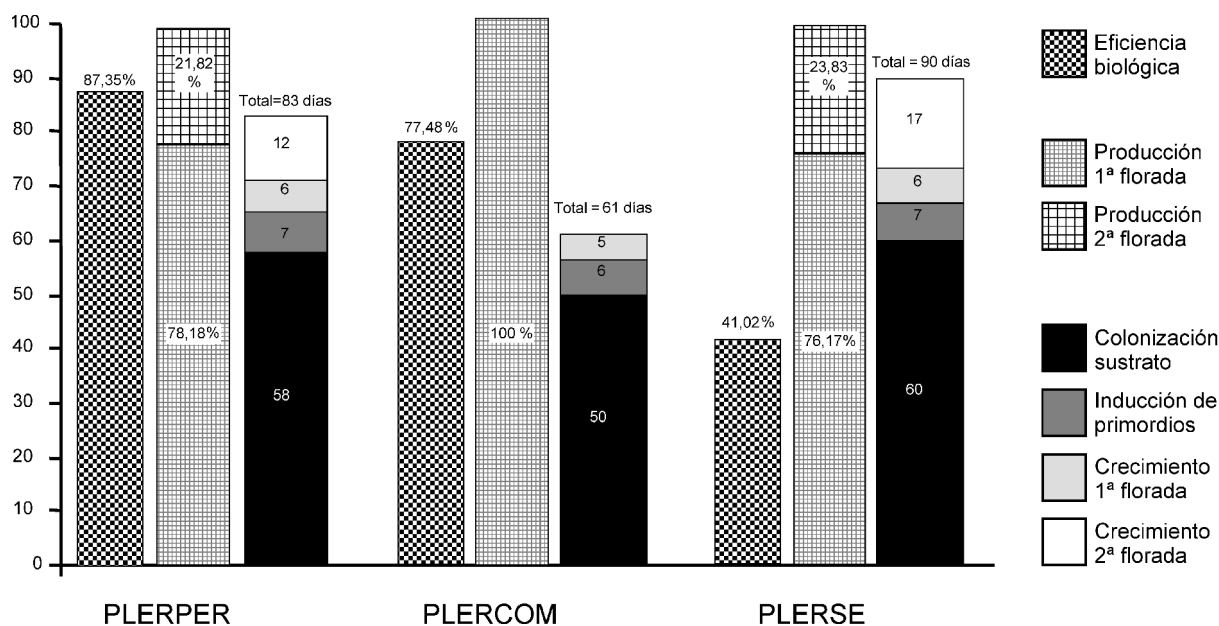


Figura 3: Comportamiento de las cepas para el sustrato de bagazo. Cada cepa queda caracterizada por la información contenida en tres barras: eficiencia biológica, porcentaje de producción obtenido en cada una de las floradas y número de días necesarios para completar la cosecha.

Figure 3: Behaviour of the strains for the bagasse substratum. Every strain is characterized by the information contained in three bars: biological efficiency, percentage of production obtained in each of the crops and number of necessary days to complete the harvest.

medios PDA y CYM, y en un 25% para el medio Malta. Cualquiera de los medios de cultivo propuestos registra las mayores velocidades para la T^a de 21 °C ($p=0,05$). Los datos de peso seco muestran que la T^a de 25 °C es la más productiva para el medio CYM. La comparación de los medios de cultivo entre sí, para la T^a de 25 °C ofrece datos homogéneos para los medios PDA y Malta, siendo el medio CYM el que presenta mayores producciones de peso seco ($p=0,05$). En general esta cepa muestra una producción de peso seco muy similar para todas las temperaturas.

Ambas cepas muestran el mejor porcentaje de peso seco a 25 °C, este dato coincide con lo ya expuesto por otros autores (Zadrazil 1974, Zervakis et al. 2001b). El medio CYM registra los valores más altos de peso seco en ambas cepas, este hecho puede estar relacionado con su composición en nutrientes más completa y rica en sales (Sánchez & Royse 2001). Las pruebas de cultivo en biorreactor revelan que la biomasa generada en medio de cultivo CYM es mayor en un 91% respecto del PDB tras los 7 días de cultivo. El porcentaje en peso seco obtenido refleja una alta similitud con el ya conocido cuando el micelio crece en medio sólido para la cepa PLERSE en los medio PDB y CYM. Esta similitud corrobora los datos obtenidos en la experiencia en medio sólido que apuntan a la temperatura de 25 °C y al medio

CYM como buenas condiciones de cultivo. El medio CYM modificado para su uso en biorreactor, ha proporcionado buenos resultados para la obtención de biomasa micelial de *P.eryngii*.

La determinación del ergosterol, esterol presente en el plasmalema del hongo, pone de manifiesto el micelio metabólicamente activo (Morte & Honrubia 2009). En el medio PDB presenta menor producción de biomasa, pero mayor concentración de ergosterol. Al contrario sucede con el medio CYM. Este hecho puede explicarse atendiendo a las fases de adaptación que sufre el hongo sometido al cultivo en medio líquido (Sánchez y Royse 2001). El micelio en medio CYM, con mayor biomasa se supone que puede encontrarse en fase estacionaria. Tras los 7 días del experimento, el porcentaje de biomasa fúngica activa es menor y esto queda reflejado con el dato inferior de ergosterol. Este hecho se pone de manifiesto en el que el micelio con el medio PDB puede haber presentado una fase de latencia mayor, y encontrarse en el momento de la toma de muestras en una fase exponencial. La toma de un solo dato de ergosterol limita la posibilidad de monitorear la actividad real de la biomasa fúngica. Por ello, para posteriores determinaciones deberemos registrar varias medidas de ergosterol a lo largo del cultivo.

Tras someter a las cepas al proceso de inocula-

ción e incubación, el bagazo es el único de los sustratos que muestra una colonización adecuada por parte de las tres cepas para iniciar la fase de fructificación. Observando los datos referentes a la humedad relativa de cada sustrato debemos apuntar que éste es un factor limitante y decisivo para que el micelio se desarrolle adecuadamente. Valores por debajo del 50% de humedad acumulada, no favorecen el crecimiento del micelio, debido a la falta de agua necesaria para la movilización de los nutrientes. Se aconseja que la humedad del sustrato se encuentre entre un 70 – 75 % (Sánchez & Royse 2001, Stamets 2000). Salvo la paja de trigo (67,962%), el resto de los sustratos planteados están en valores críticos de humedad. Así mismo, la paja de trigo puede haber visto mermada su colonización como consecuencia del tamaño de corte de las pajas, el tamaño recomendado está entre 2–5 cm (Ficior et al. 2004, Membrillo et al. 2008). Tamaños excesivamente grandes de partícula no facilitan su humectación; en el otro extremo encontramos que tamaños demasiado pequeños de partícula compactarán en exceso el sustrato impidiendo una adecuada colonización (Sánchez & Royse 2001).

El perfil de lignina, celulosa y hemicelulosa de los sustratos propuestos, pone de manifiesto el bajo contenido en fibra bruta del bagazo, dos tercios menos que el resto de sustratos ya testados para el cultivo de *P. eryngii* (Tabla 4). Los niveles de celulosa se encuentran por debajo de la mitad que el resto, mientras que la hemicelulosa y la fracción de lignina son similares. La bibliografía consultada sobre el bagazo originado en la producción de cerveza presenta de media un 31% s.m.s. de proteína, especialmente rico en glutamina; 19% s.m.s. de pentosas; 12% s.m.s. de azúcares y glucanos; 9% s.m.s. de lípidos (Santos et al. 2003). Así mismo, se sabe que permite su almacenamiento a largo plazo tras su secado en hornos. Después de este proceso el subproducto pierde mínimamente su valor nutritivo de proteínas, azúcares y lípidos (Santos et al., 2003).

La inducción de primordios y posterior fructificación muestra datos positivos para la cepa PLERPER crecida en bagazo. Supera un 10% la eficiencia biológica (EB) de la cepa comercial PLERCOM. La cepa PLERSE, por otra parte, obtiene una EB de un 50% menos respecto de la de Peralejos de las Truchas. Mientras que las dos cepas silvestres aportan dos floradas, la comercial

sólo aporta una. Por otra parte la colonización del sustrato, inducción y fructificación ocurre más rápido en la cepa comercial, siendo la cepa de Sierra Espuña la que invierte más tiempo. Los tiempos obtenidos en la cosecha completa son algo superiores al registrado en otro estudio con *P. eryngii* (Ohga 2000), donde el conjunto del proceso les lleva un total de 70 días, obteniendo 2 floradas.

La obtención de floradas más productivas depende en gran medida del momento en que tenga lugar la inducción de primordios (Ohga 2000, Ohga & Royse 2004). Para conocer el momento adecuado, se puede utilizar la medida del ergosterol. Se ha registrado una mayor formación de cuerpos fructíferos en aquellos sustratos donde el crecimiento de biomasa fúngica antes de la inducción es mayor. El valor de ergosterol aumenta en el momento de la inducción y la fructificación de los basidiomas. Por ello, mediciones sistemáticas de ergosterol a los micelios pre-fructificación permite conocer su estado de madurez e inducir la fructificación en el momento óptimo (Ohga 2000).

El porcentaje de distribución de las floradas para las cepas PLERPER y PLERSE es comparable con otros estudios de la misma índole donde se utilizan subproductos alimentarios (Ohga & Royse 2004, Philippoussis et al. 2001). Presentan una primera florada donde se obtienen tres cuartas partes de la producción. Lo mismo sucede con la eficiencia biológica. En el caso de la cepa PLERPER se obtienen, en torno al 90-100% (Philippoussis et al. 2001); o menos alto, como es el caso de PLERSE que rondan el 40-50% de EB (Gaitán-Hernandez 2005).

Una vez terminada la producción, los residuos de la misma pueden aplicarse para el alimento de la ganadería. Los hongos del género *Pleurotus* se han testado para hacer más digerible este tipo de subproductos, aumentando su fracción proteica y su digestibilidad para los rumiantes (Bisaria et al. 1997, Okano et al. 2006b). El uso de subproductos agroalimentarios para el cultivo de hongos comestibles se inspira en el concepto de ecosistemas industriales (Pongrácz 2004). Plantea una simbiosis entre industrias, que toman el modelo de ciclos cerrados de materia, donde el residuo del primero es la materia prima del siguiente. Siendo el cultivo de hongos saprófitos una actividad respetuosa con el medio ambiente.

El aspecto más importante que se debe tener en cuenta para seguir optimizando el cultivo de *P.*

eryngii está relacionado con la mejora en el conocimiento de las cepas. Debido a la alta variabilidad que presentan las variedades englobadas dentro del género. La biodiversidad de las especies es extremadamente importante en la naturaleza y en el cultivo, ya que el acervo genético es el que les permite responder a los cambios ambientales satisfactoriamente (Zervakis y Venturella, 2000).

Conclusiones

Las cepas silvestres PLERPER y PLERSE muestran versatilidad en su cultivo en medio sólido al presentar óptimos de velocidad de crecimiento micelial a 21 °C, y mayor producción en biomasa a 25 °C.

El empleo de una única medida de ergosterol durante los siete días de cultivo en medio líquido no resulta informativo para conocer el estado fisiológico de la cepa PLERSE. Este hecho revela la alta velocidad de crecimiento de la cepa, haciéndola buena candidata para la producción de biomasa.

El bagazo, usado por primera vez en el cultivo de *P. eryngii*, según la bibliografía consultada, es un sustrato viable para la fructificación de cepas silvestres como de origen comercial, obteniéndose buenas eficiencias biológicas. La cepa silvestre PLERPER cultivada en bagazo, supera la eficiencia biológica de la cepa comercial PLERCOM, esto pone de manifiesto la importancia de trabajar sobre la biodiversidad para mejorar la productividad.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo recibido por el personal del SACE de la Universidad de Murcia, al Dr. Francisco José Gea, director del CIES (Quintanar del Rey, Cuenca) por los análisis de fibras realizados en sus instalaciones y sus útiles consejos. Asimismo queremos agradecer a quienes nos han suministrado desinteresadamente los residuos; Estrella de Levante, a la Cooperativa de Calasparra y a Pau Vila por los aserrines.

Referencias

- Akyüz M, Yildiz A. (2008) Evaluation of cellulosic wastes for the cultivation of *Pleurotus eryngii* (DC. ex Fr.) Quel. African Journal of Biotechnology 7:1494-1499.
- Arvanitoyannis I, Tserkezou P. (2008) Wheat, barley and oat waste: a comparative and critical presentation of methods and potential uses of treated waste. International Journal of Food Science & Technology 43: 694-725.
- Baeza A, Guillén F, Salas A, Manjón J. (2006) Distribution of radionuclides in different parts of a mushroom: Influence of the degree of maturity. Science of The Total Environment 359:255-266.
- Baldrian P. (2003) Interactions of heavy metals with white-rot fungi. Enzyme and Microbial Technology 32: 78-91.
- Baldrian P. (2006) Fungal laccases - occurrence and properties. FEMS microbiology reviews 30:215-242.
- Bisaria R, Madan M, Vasudevan P. (1997) Utilisation of agro-residues as animal feed through bioconversion. Bioresource Technology 59: 5-8.
- Brundrett M. (1996) Working with mycorrhizas in forestry and agriculture Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
- Carbonero E, Gracher A, Smiderle F, Rosado F, Sasaki G, Gorin P, Iacomini M. (2006) A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus*. Carbohydrate Polymers 66: 252-257.
- Carbonero E, Gracher A, Rosa M, Torri G, Sasaki G, Gorin P, Iacomini M. (2008) Unusual partially 3-O-methylated α -galactan from mushrooms of the genus *Pleurotus*. Phytochemistry 69: 252-257.
- Carrillo C, Diaz G, Honrubia M. (2004) Improving the production of ectomycorrhizal fungus mycelium in a bioreactor by measuring the ergosterol content. Engineering in Life Sciences 4: 43-45.
- Cohen R, Persky L, Hadar Y. (2002) Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. Applied Microbiology and Biotechnology 58: 582-594.
- Croan S. (2004) Conversion of conifer wastes into edible and medicinal mushrooms. Forest Products Journal 54: 68-76.
- De Gioia T, Sisto D, Rana G L, Figliuolo G. (2005) Genetic structure of the *Pleurotus eryngii* species-complex. Mycological Research 109:71-80.
- Delmas J. (1989) Les champignons et leur culture Omega, Flammarion.
- Di Mario F, Rapanà P, Tomati U, Galli E. (2008) Chitin and chitosan from Basidiomycetes. International Journal of Biological Macromolecules In Press, Corrected Proof.
- Dogan H, Sanda M, Uyanoz R, Ozturk C, Cetin U. (2006) Contents of metals in some wild mushrooms: its impact in human health. Biological trace element research 110: 79-94.
- Durán N, Rosa M, D'Annibale A, Gianfreda L. (2002) Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. Enzyme and Microbial Technology 31:907-931.
- Eichlerova I, Homolka L, Nerud F. (2006) Ability of industrial dyes decolorization and ligninolytic enzymes production by different *Pleurotus* species with special attention on *Pleurotus calypratus*, strain

- CCBAS 461. *Process Biochemistry* 41: 941-946.
- Ferreira P, Ruiz-Dueñas F, Martínez M, Van Berkel W, Martínez A. (2006) Site-directed mutagenesis of selected residues at the active site of aryl-alcohol oxidase, an H₂O₂-producing ligninolytic enzyme. *FEBS Journal* 273: 4878-4888.
- Ficior D, Indrea D, Apahidean A, Apahidean M, Maniutiu D, Ganea R, Bobaila M, Paven I. (2004) New results concerning the importance of substrate composition in *Pleurotus* sp. cultivation. *Buletinul Universitatii de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara Cluj-Napoca.Seria Horticultura* 61: 45-48.
- Fu H, Shieh D, Ho C. (2002) Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *Journal of Food Lipids* 9: 35-43.
- Gaitán-Hernandez R. (2005) Evaluación in vitro del hongo comestible *Pleurotus eryngii*: efecto de diferentes suplementos orgánicos en el crecimiento micelial y producción de cuerpos fructíferos. *Revista Mexicana de Micología* 21: 77-84.
- Gençcelep H, Uzun Y, Tunçtürk Y, Demirel K. (2009) Determination of mineral contents of wild-grown edible mushrooms. *Food Chemistry* 113: 1033-1036.
- Gomez-Toribio V, Martínez A, Martínez M, Guillén F. (2001) Oxidation of hydroquinones by the versatile ligninolytic peroxidase from *Pleurotus eryngii*. H₂O₂ generation and the influence of Mn²⁺. *European journal of biochemistry / FEBS* 268: 4787-4793.
- Gonzalez A, Gonzalez G, Gea F. (2009) Brown blotch caused by *Pseudomonas tolaasii* on Cultivated *Pleurotus eryngii* in Spain. *Plant Disease* 93:667.
- Guillén F, Martínez A, Martínez M. (1992) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *European journal of biochemistry / FEBS* 209: 603-611.
- Guillén F, Gomez-Toribio V, Martínez M, Martínez A. (2000) Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 383: 142-147.
- Hanai H, Ishida S, Saito C, Maita T, Kusano M, Tamogami S, Noma M. (2005) Stimulation of mycelia growth in several mushroom species by rice husks. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 69: 123-127.
- Heydari R, Pourjam E, Goltapeh E. (2006) Antagonistic effect of some species of *Pleurotus* on the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in vitro. *Plant Pathology Journal* 5: 173-177.
- Honrubia M, Torres P, Díaz G, Morte A. (1995) *Biotecnología Forestal: técnicas de micorrización y micropropagación de plantas* Universidad de Murcia, Secretariado de Publicaciones.
- Kim M, Ryu J, Lee Y, Yun H. (2007) First Report of *Pantoea* sp. induced soft Rot disease of *Pleurotus eryngii* in Korea. *Plant Disease* 91: 109-109.
- Kim M, Chung M, Lee S, Ahn J, Kim E, Kim M J, Kim S, Moon H, Ro H, Kang E, Seo S, Song H. (2009) Comparison of free amino acid, carbohydrates concentrations in Korean edible and medicinal mushrooms. *Food Chemistry* 113: 386-393.
- Kim S, Kim H, Lee B, Hwang H, Baek D, Ko S. (2006) Effects of mushroom, *Pleurotus eryngii*, extracts on bone metabolism. *Clinical Nutrition* 25: 166-170.
- Kirk P, Canon P, David J, Staplers J. (2001) *Dictionary of fungi* Cab International, Wallingford. Great Britain.
- Kurtzman R. (1997) *Nutrition from mushrooms, understanding and reconciling available data.* *Mycoscience* 38: 247-253.
- La Guardia M, Venturella G, Venturella F. (2005) On the chemical composition and nutritional value of *Pleurotus* taxa growing on umbelliferous plants (apiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 5997-6002.
- Laconi S, Molle G, Cabiddu A, Pompei R. (2007) Bioremediation of olive oil mill wastewater and production of microbial biomass. *Biodegradation* 18: 559-566.
- Lee Y, Park K, Lee B, Cho Y, Choi Y, Gal S. (2006) Antitumor sterol isolated from the fruiting body of *Pleurotus eryngii*. *Journal of Life Science* 16:283.
- Lindequist U, Niedermeyer T, Julich W D. (2005) The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-based complementary and alternative medicine* 2: 285-299.
- Lomascolo A, Stentelaire C, Asther M, Lesage-Meessen L. (1999) Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Trends in Biotechnology* 17: 282-289.
- Maddau L, Franceschini A, Serra S, Marras F. (2002) Influence of aeration on development and productivity of edible and medicinal mushroom *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quel.(First Contribution). *Medicinal Mushrooms* 4.
- Mamiya Y. (2006) Attraction of the pinewood nematode to mycelium of some wood-decay fungi. *Japanese Journal of Nematology* 36.
- Mamiya Y, Hiratsuka M, Murata M. (2005a) Ability of wood-decay fungi to prey on the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner) Nickle. *Japanese Journal of Nematology* 35.
- Mamiya Y, Hiratsuka M, Murata M. (2005b) Effects of wood-decay fungi on the population of the pinewood nematode in wood of pine trees. *Japanese Journal of Nematology* 35.
- Manzi P, Marconi S, Aguzzi A, Pizzoferrato L. (2004) Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry* 84: 201-206.
- Manzi P, Gambelli L, Marconi S, Vivanti V, Pizzoferrato L. (1999) Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chemistry* 65: 477-482.
- Martínez A, Ruiz-Dueñas F, Martínez M, del Río J, Gutiérrez A. (2009) Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Energy biotechnology / Environmental biotechnology* 20: 348-357.
- Martínez A, Speranza M, Ruiz-Dueñas F, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez M, Gutiérrez A, del Río J. (2005) Biodegradation of lignocellulose: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 8: 195-204.

- Martínez A, Camarero S, Guillén F, Gutiérrez A, Muñoz C, Varela E, Martínez M, Barrasa J, Ruel K, Pelayo J. (1994) Progress in biopulping of non-woody materials: chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. Federation of European Microbiological Societies-microbiology reviews 13: 265-273.
- Membrillo I, Sánchez C, Meneses M, Favela E, Loera O. (2008) Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. Bioresource Technology: 7842.
- Miki S, Nimura Y, Kitao R, Okano K. (2005) Effect of continued culture of spent corncob meal medium with *Pleurotus eryngii* on the nutrition value of the medium. Nihon Chikusan Gakkaiho 76: 309-314.
- Morozova O, Shumakovich G, Gorbacheva M, Shleev S, Yaropolov A. (2007) "Blue" laccases. Biochemistry (Moscow) 72: 1136-1150.
- Morte A, Honrubia M. (2009) Biotechnology for the industrial production of ectomycorrhizal inoculum and mycorrhizal plants, in: I. I. P. H. P. Ltd. (Ed.), A textbook of molecular biotechnology. Pp: 691-704.
- Muñoz C, Guillén F, Martínez A, Martínez M. (1997) Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Current microbiology 34 :1-5.
- Ngai P, Ng T. (2006) A hemolysin from the mushroom *Pleurotus eryngii*. Applied Microbiology and Biotechnology 72: 1185-1191.
- Ohga S. (2000) Influence of wood species on the sawdust-based cultivation of *Pleurotus abalonus* and *Pleurotus eryngii*. Journal of Wood Science 46: 175-179.
- Ohga S, Royse D. (2004) Cultivation of *Pleurotus eryngii* on umbrella plant (*Cyperus alternifolius*) substrate. Journal of Wood Science 50: 466-469.
- Okano K, Tanemura E, Miki S, Inatomi S. (2006a) Effects of incubation temperature and period on the digestibility of spent corncob meal substrate after cultivation of *Pleurotus eryngii*. Nihon Chikusan Gakkaiho 77: 225-230.
- Okano K, Fukui S, Kitao R, Usagawa T. (2007) Effects of culture length of *Pleurotus eryngii* grown on sugarcane bagasse on in vitro digestibility and chemical composition. Animal Feed Science and Technology 136: 240-247.
- Okano K, Iida Y, Samsuri M, Prasetya B, Usagawa T, Watanabe T. (2006b) Comparison of in vitro digestibility and chemical composition among sugarcane bagasses treated by four white-rot fungi. Animal Science Journal 77: 308-313.
- Palizi P, Goltapeh E, Pourjam E, Safaie N. (2009) Potential of oyster mushrooms for the biocontrol of sugar beet nematode (*Heterodera schachtii*). Journal of Plant Protection Research 49: 27-34.
- Philippoussis A, Zervakis G, Diamantopoulou P. (2001) Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. World Journal of Microbiology and Biotechnology 17:191-200.
- Pongrácz E. (2004) Industrial ecosystems, by-product synergies, Oulu University. pp. 1-22.
- Ramos-Cormenzana A, Monteoliva-Sanchez M, Lopez M. (1995) Bioremediation of alpechin. Biosorption and Bioremediation 35: 249-268.
- Raper C, Raper J, Miller R. (1972) Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. Mycologia 64: 1088-1117.
- Reddy C. (1995) The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. Current Opinion in Biotechnology 6: 320-328.
- Ro H, Kang E, Yu J, Lee T, Lee C, Lee H. (2007) Isolation and characterization of a novel mycovirus, PeSV, in *Pleurotus eryngii* and the development of a diagnostic system for it. Biotechnology Letters 29: 129-135.
- Rodríguez Estrada A, Royse D J. (2007) Yield, size and bacterial blotch resistance of *Pleurotus eryngii* grown on cottonseed hulls/oak sawdust supplemented with manganese, copper and whole ground soybean. Bioresource Technology 98: 1898-1906.
- Rodríguez Estrada A, Nuero O, Guillén F, Martínez A, Martínez M. (2004) Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. Soil Biology and Biochemistry 36: 909-916.
- Rolz C, de Leon R, de Arriola M, de Cabrera S. (1986) Bidelignification of lemon grass and citronella bagasse by white-rot fungi. Applied and environmental microbiology 52: 607.
- Ruiz-Dueñas F, Martínez A. (2009) Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. Microbial Biotechnology 2: 164-177.
- Ruiz-Dueñas F, Ferreira P, Martínez M, Martínez A. (2006) In vitro activation, purification, and characterization of *Escherichia coli* expressed aryl-alcohol oxidase, a unique H₂O₂-producing enzyme. Protein Expression and Purification 45: 191-199.
- Sánchez J, Royse D. (2001) La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. 1ª ed. Uteha-Ecosur, México.
- Santos M, Jiménez J, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C, Del Nozal M. (2003) Variability of brewer's spent grain within a brewery. Food Chemistry 80: 17-21.
- Sapata M, Ramos A, Ferreira A, Andrada L, Candeias M. (2009) Changes of quality of *Pleurotus* ssp. carpophores in modified atmosphere packaging. ACTA Scientiarum Polonorum 8: 17-22.
- Shimizu K, Yamanaka M, Gyokusen M, Kaneko S, Tsutsui M, Sato J, Sato I, Sato M, Kondo R. (2006) Estrogen-like activity and prevention effect of bone loss in calcium deficient ovariectomized rats by the extract of *Pleurotus eryngii*. Phytotherapy Research 20: 659-664.
- Sigoillot C, Camarero S, Vidal T, Record E, Asther M, Perez-Boada M, Martínez M, Sigoillot J, Colom J, Martínez A. (2005) Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps.

- Journal of Biotechnology 115: 333-343.
- Singer R. (1986) The Agaricales in modern taxonomy Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Song Z, QianHui B, JiaMin X, JieHua Z. (2005) Studies on growth conditions and cultivation characteristics of *Pleurotus eryngii*. Journal of Plant Resources and Environment 14: 35-39.
- Stajić M, Duletic-Lausevic S, Vukojevic V. (2005) Lignolytic enzyme production in *Pleurotus eryngii* depending on the medium composition and cultivation conditions, Serbia and Montenegro.
- Stajić M, Vukojević J, Duletic-Lausevic S. (2009) Biology of *Pleurotus eryngii* and role in biotechnological processes: a review. Critical reviews in biotechnology 19: 55-66.
- Stajić M, Persky L, Hadar Y, Friesem D, Duletic-Lausevic S, Wasser S P, Nevo E. (2006a) Effect of copper and manganese ions on activities of laccase and peroxidases in three *Pleurotus* species grown on agricultural wastes. Applied Biochemistry and Biotechnology 128: 87-96.
- Stajić M, Persky L, Friesem D, Hadar Y, Wasser S P, Nevo E, Vukojević J. (2006b) Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. Enzyme and Microbial Technology 38: 65-73.
- Stamets P. (2000) Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms Ten Speed Press.
- Suganya D, Subramanian S. (2007) Bio-softening of mature coconut husk for facile coir recovery. Indian Journal of Microbiology 47: 164.
- Synytsya A, Míčková K, Synytsya A, Jablonský I, Spěváček J, Erban V, Kovářiková E, Čopíková J. (2009) Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: structure and potential prebiotic activity. Carbohydrate Polymers 76: 548-556.
- Takahasi H, Inada Y. (2003) The development of canned, bottled and retort-pouched *eryngii* mushrooms (*Pleurotus eryngii*). Canners Journal 82: 987-995.
- Urban P. (2005) Cationic interactions in caesium uptake by king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*). Nukleonika 50: S9-S13.
- Urbanelli S, Fanelli C, Fabbri A, Della Rosa V, Maddau L, Marras F, Reverberi M. (2002) Molecular genetic analysis of two taxa of the *Pleurotus eryngii* complex: *P. eryngii* (DC. Fr.) Quel. var. *eryngii* and *P. eryngii* (DC. Fr.) Quel. var. *ferulae*. Biological Journal of the Linnean Society 75: 125-136.
- Wang H, Ng T. (2001) Pleureryn, a novel protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. Biochemical and Biophysical Research Communications 289: 750-755.
- Wang H, Ng T. (2004) Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. Peptides 25: 1-5.
- Wang H, Ng T B. (2006) Purification of a laccase from fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus eryngii*. Applied Microbiology and Biotechnology 69: 521-525.
- Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos S. (2003) White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. VI International Symposium on Environmental Biotechnology 22: 161-187.
- Yaoita Y, Yoshihara Y, Kakuda R, Machida K, Kikuchi M. (2002) New sterols from two edible mushrooms, *Pleurotus eryngii* and *Panellus serotinus*. Chemical & pharmaceutical bulletin 50: 551-553.
- Zadrzil F. (1974) The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus eryngii* Mykofarm Gesellschaft für Pilzkultur, Hamburg.
- Zervakis G, Venturella G. (2000) Mushroom breeding and cultivation favors ex situ conservation of mediterranean *Pleurotus* taxa, in: J. Engels, et al. (Eds.), Proceedings of the International Conference on Science and Technology for Managing Plant Genetic Diversity in the 21st Century. pp. 351.
- Zervakis G, Yiatras P, Balis C. (1996) Edible mushrooms from olive oil mill wastes. Olive Oil Processes and By-Products Recycling 38: 237-243.
- Zervakis G, Venturella G, Papadopoulou K. (2001a) Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters. Microbiology (Reading, England) 147: 3183-3194.
- Zervakis G, Philippoussis A, Ioannidou S, Diamantopoulou P. (2001b) Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. Folia microbiologica 46: 231-234.
- Zhang J, Huang C, Ng T, Wang H. (2006) Genetic polymorphism of *ferula* mushroom growing on *Ferula sinkiangensis*. Applied Microbiology and Biotechnology 71: 304-309.