



Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido

Gricelda K. Guillén-Navarro¹, Facundo J. Márquez-Rocha² y José E. Sánchez-Vázquez¹

¹El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Departamento de Biotecnología Ambiental, Tapachula, Chiapas y ²Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Departamento de Acuicultura, Ensenada, Baja California, México

Resumen

Se analizó la producción de biomasa y enzimas ligninolíticas de *Pleurotus ostreatus* en medio sintético con extracto de levadura a diferentes concentraciones de glucosa (0,5-20 g/l), diferentes pH (3,5-6,5) y temperaturas de incubación (23-32°C). Las mejores condiciones de cultivo fueron: concentración de glucosa inicial de 5 g/l, pH inicial entre 5,5-6,5 y una temperatura de incubación entre 26-29°C. La constante de saturación para glucosa (Ks) fue de 1,75 g/l. Se alcanzó una concentración de biomasa de 8,6 g/l al suministrar 20 g/l de glucosa al medio de cultivo. El control del pH permitió obtener un incremento de 0,5 g/l en la concentración de biomasa. En el biorreactor se produjeron *pellets* con una distribución homogénea de tamaño de 3,4 ± 0,2 mm de diámetro. Se obtuvieron aproximadamente 307 U/l de enzima lacasa y 0,41 U/l de manganeso peroxidasa en medio líquido extracelular y 0,015 U/g de lacasa y 0,809 U/g de manganeso peroxidasa en sustrato sólido. No se detectó actividad de la enzima lignina peroxidasa en ninguna de las dos condiciones.

Palabras clave

Pleurotus ostreatus, Cultivo sumergido, Producción de biomasa, Producción de enzimas

Production of biomass and ligninolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture

Summary

The production of biomass and ligninolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* was analysed in synthetic medium with yeast extract and different glucose concentrations (0.5 - 20 g/l), at different pH (3.5-6.5) and incubation temperatures (23-32°C). The best culture condition were: initial glucose concentration of 5 g/l, initial pH between 5.5-6.5 and incubation temperature between 26-29°C. The saturation constant for glucose (Ks) was 1.75 g/l. The biomass concentration reached 8.6 g/l with a glucose addition of 20.0 g/l to the culture medium. The control of pH allowed an increment of 0.5 g/l of biomass concentration. The bioreactor produced pellets with a homogeneous distribution of diameter size of 3.4 ± 0.2 mm. Approximately, 307 U/l of laccase and 0.41 U/l of manganese peroxidase were obtained in extracellular liquid medium and 0.015 U/g of laccase and 0.809 U/g of manganese peroxidase were obtained in solid substrate. Lignin peroxidase activity was not detected at any condition.

Key words

Pleurotus ostreatus, Submerged culture, Biomass production, Enzyme production

En México y particularmente en Chiapas el cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. Se visualiza como una alternativa para la solución, al menos parcial, de problemas como la insuficiencia alimenticia y la contaminación por desechos orgánicos de origen agroindustrial [1,2]. El cultivo en medio sólido es el método usual de preparación de inóculo para este hongo y consiste en propagar el micelio en granos de cereales como *Triticum aestivum* o *Sorghum vulgare* [3]. Dicho inóculo llamado primario o semilla es el que se mantiene en las mejores condiciones para su conservación, se resiembrará de nuevo con el fin de producir un inóculo secundario sobre granos de cereal en mayor cantidad, para después inocularlo en el

Dirección para correspondencia:

Dr. Facundo J. Márquez Rocha
CICESE, PO BOX 434844, San Diego,
CA 92143, USA
Tel: (Mexico) +52 61 745050 ext 24458;
Fax: +52 61 750572; E-mail: fmarquez@cicese.mx

Aceptado para publicación el 17 de octubre de 1998

sustrato de producción. Este proceso presenta algunos problemas como: un tiempo relativamente largo hasta la producción del inóculo secundario (32-34 días), contaminación frecuente por la manipulación del sustrato [4], inseguridad en la disponibilidad del grano a lo largo del año y dificultades en el control del proceso [5].

Una alternativa para evitar los problemas antes mencionados es la obtención del inóculo en cultivo líquido, ya que permite producir mayor cantidad de biomasa de mejor calidad en menor tiempo, favorece la dispersión y adaptación del hongo y facilita su manipulación durante la siembra en el sustrato final. Esto a su vez, disminuye el tiempo de fructificación y mantiene la capacidad productiva, además de ciertas propiedades genéticas fisiológicas y morfológicas de la cepa [6]. Algunas cepas de *Pleurotus*, uno de los cinco hongos comestibles más importantes en el mundo han sido cultivados en líquido de una manera más rápida y controlada que en fermentación sólida [7]. El cultivo de *P. ostreatus* en sistema sumergido ha sido utilizado en la degradación de compuestos orgánicos como los hidrocarburos policíclico aromáticos [8,9] aunque, poco se conoce de sus características de crecimiento bajo estas condiciones. Otras especies del género *Pleurotus*, como *Pleurotus pulmonarius* han sido utilizados para la producción de aromas en este tipo de cultivos [10].

El cultivo sumergido de los hongos de pudrición blanca como *P. ostreatus* permite producir al mismo tiempo enzimas ligninolíticas importantes. Este tipo de organismos degradan lignina más extensa y rápidamente que otros grupos de organismos conocidos [11]. *P. ostreatus* es capaz de metabolizar y mineralizar hidrocarburos policíclicos aromáticos [12,13] y colorantes artificiales causantes de contaminación ambiental en industrias textiles [14], entre otros. Esta actividad parece estar relacionada a la producción de enzimas como la manganosa peroxidasa [EC 1.11.1.7], enzimas que utilizan peróxido y la lacasa [EC 1.10.3.2], que es una polifenol oxidasa capaz de oxidar polifenoles, fenoles sustituidos y diaminas [9].

Al variar las condiciones de cultivo se puede mejorar el rendimiento, optimizar la calidad y reducir costes del proceso de fermentación [15]. Por otro lado, parece ser que la producción de enzimas y el crecimiento del hongo están relacionados [16], debido a esto se realizó el presente estudio para optimizar la técnica de producción de inóculo en el cultivo de *P. ostreatus* y al mismo tiempo evaluar la producción de algunas enzimas en su crecimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas. Se utilizó la cepa *P. ostreatus* ECS-0110 (IE-8, Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz), depositada en el cepario micológico de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR, Tapachula, Chiapas).

Medios y condiciones de cultivo. La cepa fue mantenida en papa-dextrosa-agar (BIOXON) y 5 g/l de extracto de levadura (PDAL) a 5°C. Para medir crecimiento en sólido se utilizó un medio que contiene 5 g/l de dextrosa, 5 g/l de extracto de levadura y 18 g/l de agar (DLA). Para medio líquido se utilizaron 5 g/l de dextrosa (excepto experimentos con diferente concentración de glucosa) y 5 g/l de extracto de levadura (Medio DL). El pH inicial fue de 5,5 excepto para los ensayos con diferente pH el cual fue ajustado inicialmente agregando NaOH o HCl 0,01 N. Todos los tratamientos excepto para el bioreactor se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio DL, inoculados con 15

pellets de $2,5 \pm 0,5$ mm de \varnothing tomados de un preinóculo propagado con anterioridad, se incubaron a 26°C (excepto tratamiento con diferente temperatura) con agitación constante de 150 rpm. Cada tratamiento con tres replicas, el tiempo se indica en cada tratamiento. Cada muestra se obtuvo de un matraz completo (50 ml).

Efecto del pH. Para estos ensayos se ajustó el medio a pH iniciales de 3,5, 4, 4,5, 5,5, 6 y 6,5, con tres replicas por tratamiento. Para evaluar las variables mencionadas, por cada pH se tomó una muestra inicial (tiempo 0) y posteriormente se tomaron dos matraces a las 72, 96, 144 y 192 h de cultivo.

Efecto de la concentración de glucosa. Las concentraciones usadas fueron de 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15 y 20 g/l. Para seleccionar la mejor concentración de glucosa se evaluó el rendimiento, la velocidad específica de crecimiento y consumo de glucosa. Se tomó una muestra inicial (tiempo 0) y posteriormente tres matraces cada 12 h para 0,5 g/l y cada 24 h para 1 y 2,5 g/l a partir de las 48 h. Para las concentraciones restantes el muestreo se realizó cada 72 h, hasta un tiempo de cultivo máximo de 384 h.

Efecto de la temperatura de incubación. Se probaron las temperaturas de incubación de 23, 26, 29 y 32°C, con dos replicas por tratamiento. Para evaluar los parámetros cinéticos a estas temperaturas, se tomó una muestra inicial y después se tomaron tres matraces cada 24 h a partir de las 72 h, hasta 240 h de cultivo.

Producción de biomasa y enzimas en el bioreactor. Se preparó el preinóculo con 6 discos de micelio-agar PDAL (5 mm de \varnothing) inoculados en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo GL. Se incubaron durante siete, a 26°C y posteriormente cada uno de ellos se sembraron en matraces Erlenmeyer de 1000 ml con 500 ml del mismo medio para obtener el inóculo para el bioreactor. Se mantuvieron en agitación constante a 150 rpm durante siete días, a 26°C en un incubador New Brunswick Scientific Model G-25 (EEUU). Se sembró el inóculo (con aproximadamente 0,35 g/l de biomasa, peso seco), en fermentadores New Brunswick Scientific Co. mod. FS-314 y MF-114 con jarras de 14 l y un volumen de trabajo de 6 l de medio GL con las siguientes condiciones: 5 g/l de glucosa, regulación automática de pH a $5,5 \pm 0,3$, a 26°C, una agitación de 200 rpm (impulsor Rushton) y aireación de 1 vvm (presión de aire de 1,0 Kg/m²). El ensayo se hizo por duplicado. Se tomaron muestras por triplicado al tiempo 0 y cada 12 h a partir de las 24 h de cultivo hasta un tiempo de 85 h. A estas muestras se les determinó contenido de glucosa, producción de biomasa, actividad enzimática y pH.

Reinoculación a medio sólido. Se inocularon en matraces Erlenmeyer de 125 ml, 6 discos de micelio-agar PDAL de 5 mm de diámetro en 50 ml de medio fresco con las mejores condiciones de cultivo y agitación constante de 150 rpm durante 288 h. Se tomaron en condiciones estériles cada 72 h, diez *pellets* de aproximadamente 3,5 mm de \varnothing , fueron inoculados en diferentes placas de Petri con agar, se incubaron a 26°C por siete días. Con el fin de determinar la velocidad de crecimiento se midió el diámetro micelial al tiempo inicial (tiempo 0) y posteriormente se realizó la medición del diámetro cada 24 h.

Determinación enzimática. Las muestras obtenidas del biorreactor a las 85 h de cultivo fueron filtradas a través de papel filtro y posteriormente a través de filtros de fibra de vidrio con un poro de 1,2 mm de diámetro. El filtrado se concentró por ultrafiltración con una membrana PM-10 (Amicon) con exclusión molecular de 10-kDa. El concentrado se utilizó para la determinación de actividad

enzimática. Las enzimas manganeso peroxidasa y lacasa se determinaron espectrofotométricamente por la oxidación de MBTH (hidrocloruro de hidrazona 3-metil-2-benzotiazolinona) y DMAB (ácido dimetilaminobenzoico) en un amortiguador de succinatos 40 mM, pH 4,5 [14]. La lignina peroxidasa se determinó espectrofotométricamente midiendo la formación de veratraldehído por la oxidación de veratril alcohol a 310 nm durante dos minutos por el método de Tien y Kirk [17]. Una unidad de actividad enzimática se define 1 mmol de producto oxidado por min.

Métodos analíticos. La biomasa se determinó del contenido micelial retenido por membranas pre-pesadas GF/C, lavadas dos veces con agua bidestilada y secadas a peso constante a 105°C. Al sobrenadante se le determinó pH con un potenciómetro digital Conductronic-pH 20 y el contenido de glucosa mediante el método de DNS [18]. En el caso de los ensayos en fermentador se midió el tamaño de las pelotitas por dos métodos diferentes: medición con vernier (15 pellets por muestra) y análisis de imágenes por medio del programa Imagenia 2000 (Biocom, Francia) (diez pellets).

Análisis matemático. La velocidad específica de crecimiento (μ) se obtuvo mediante el cálculo del valor de la pendiente de las curvas usando la ecuación $\mu = d(\ln X)/dt$, la velocidad de consumo de glucosa (qs) se obtuvo por la combinación de las ecuaciones $qs = -1/X dS/dt$ y $-dS/dt = \mu X/Y_{x/s}$, y el rendimiento por $Y_{x/s} = \Delta X/\Delta S$. Para todos los datos obtenidos se aplicó el análisis de varianza con diseño completamente al azar. La separación de medias se hizo por el método de rango múltiple de Tukey ($\alpha = 0,01\%$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del pH inicial. La mayor velocidad de crecimiento micelial (μ) de *P. ostreatus* se observó a pH de 4,5, 5,5 ($\mu = 0,023 \text{ h}^{-1}$) y la menor a 6,5 ($\mu = 0,012 \text{ h}^{-1}$). La mayor producción de biomasa se obtuvo a pH de 5,5 y la menor a 6,5 con 3,91 y 2,10 g/l respectivamente. La mayor velocidad del consumo de glucosa (qs) se alcanzó con pH de 4,5-5,5 ($qs = 0,038 \text{ h}^{-1}$) (Tabla 1). Este comportamiento se debió probablemente a que, fuera del rango óptimo de pH para el hongo, se alteraron tanto la actividad enzimática como el transporte de nutrientes a través de la membrana.

Tabla 1. Efecto del pH inicial en la velocidad de crecimiento y consumo de glucosa de *Pleurotus ostreatus*

pH inicial	μ (h^{-1})	qs (g g^{-1} peso seco h^{-1})	Biomasa (g/l peso seco)
3,5	0,017	0,028	2,48
4,0	0,020	0,033	2,55
4,5	0,023 *	0,038	3,89
5,5	0,023 *	0,038	3,91
6,0	0,020	0,033	2,81
6,5	0,012	0,020	2,10

*No hay diferencia significativa entre las medias ($\alpha = 0,01\%$)

Los resultados del efecto de pH sobre el crecimiento fueron comparables a los descritos por Bukhalo y Solomko [19] y Hadar y Cohen-Arazi [5]. Ellos observaron en *P. ostreatus* un pH óptimo de 5,5 y valores inferiores a 3 y superiores a pH 6 afectaron su crecimiento. Por otra parte, El-Kattan *et al.* [20] describieron que *P. sajor-*

caju creció bien a un pH de 5-6. Se observó un incremento gradual del pH a lo largo del crecimiento del hongo, el cual llegó a ser superior a 7. Sánchez y Martín [21] comentaron que esta variación se debe a los metabolitos producidos por este hongo durante su crecimiento. En este trabajo también observamos que el pH puede elevarse hasta un pH cercano a 8. Cuando el pH se mantiene constante $5,5 \pm 0,3$ la concentración de biomasa final puede aumentar en 0,5 g/l.

Efecto de la concentración de glucosa. La mayor velocidad de crecimiento fue de ($\mu = 0,027 \text{ h}^{-1}$) cuando se suministraron 2,5 g/l de glucosa y más rápido consumo de glucosa ($qs = 0,038 \text{ h}^{-1}$) se obtuvo cuando se suministraron 5 g/l de glucosa. Con concentraciones de 0,5, 10, 15 y 20 g/l de glucosa la velocidad específica de crecimiento estuvo por debajo de $\mu = 0,019 \text{ h}^{-1}$ (Tabla 2). La constante de saturación K_s fue de 1,75 g/l.

Tabla 2. Producción de biomasa y rendimiento de *P. ostreatus* con diferente concentración de glucosa inicial.

Glucosa (g/l)	Producción máx. de biomasa (g/l peso seco)	Rendimiento $Y_{x/s}$ (g biomasa/g glucosa)	μ (h^{-1})	qs (g g^{-1} peso seco h^{-1})
0,5	1,27	1,47	0,018	0,012
1,0	1,74	1,02	0,024	0,023
2,5	2,89	0,87	0,027	0,031
5,0	4,12	0,61	0,023	0,038
10,0	5,78	0,51	0,019	0,037
15,0 *	6,90	0,46	0,014	0,030
20,0	8,60	0,41	0,013	0,032

Todas las medias de producción son significativamente diferentes ($\alpha = 0,01\%$). * Media de dos experimentos.

Se observó que al incrementar el suministro de glucosa aumentó la producción de biomasa pero disminuyó su rendimiento (Tabla 2). Así, con el menor suministro de glucosa (0,5 g/l) se produjo menos biomasa (1,27 g/l), pero mayor rendimiento (1,47 g de biomasa/g de glucosa). Una concentración de 5 g/l de glucosa alcanzó valores de 4,12 g/l de biomasa, con rendimiento de 0,61 g de biomasa/g de glucosa. La mayor producción de biomasa se alcanzó al agregar 20 g/l de glucosa (8,6 g/l a las 384 h de cultivo) pero con un menor rendimiento (0,41 g de biomasa/g de glucosa). Este resultado fue menor que el descrito por Bukhalo y Solomko [19] y Hadar y Cohen-Arazi [5], quienes obtuvieron 11,5 g/l, a las 168 h con la misma cantidad de glucosa. Esto se debe probablemente a que utilizaron una cepa diferente (*P. ostreatus* var. *florida* Eger) y a que, además del extracto de levadura, adicionaron decocciones de plantas de forraje y sales minerales para enriquecer el medio.

Efecto de la temperatura de incubación. Los valores significativamente más altos de velocidad de crecimiento ($\mu = 0,026 \text{ h}^{-1}$), consumo de glucosa ($qs = 0,043 \text{ h}^{-1}$) y producción de biomasa de *P. ostreatus* (4,01 g/l) se presentaron cuando se incubó a 29 °C. Mientras que a 32°C estos valores fueron de $\mu = 0,017 \text{ h}^{-1}$, $qs = 0,028 \text{ h}^{-1}$ y con una producción de biomasa de 1,80 g/l a las 168 h (Tabla 3).

Los resultados fueron similares a los descritos por Bukhalo y Solomko [19] quienes citaron una temperatura óptima para *P. ostreatus* de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Mientras que Hadar y Cohen-Arazi [5], estimaron para *P. ostreatus* var. *florida*, una temperatura óptima de 28°C. Esto se debe a que cada especie y/o cepa tiene intervalos óptimos de temperatura [22]

Producción de biomasa en el biorreactor. Al sembrar *P. ostreatus* con las condiciones de cultivo descritas en la sección de materiales y métodos, con control de pH a $5,5 \pm 0,3$, se obtuvo una velocidad de crecimiento de $\mu = 0,033 \text{ h}^{-1}$ y un consumo de glucosa de $q_s = 0,054 \text{ h}^{-1}$ las cuales fueron mayores que las que se habían obtenido en el cultivo en matraces con $\mu = 0,023 \text{ h}^{-1}$ y $q_s = 0,038$ (Tabla 3) a 26°C . La producción de biomasa alcanzó $4,63 \text{ g/l}$, mientras que en los matraces fue de $4,12 \text{ g/l}$. Se observó también que la producción de los *pellets* en el biorreactor fue más homogénea en cuanto al tamaño, de $3,4 \pm 0,2 \text{ mm}$ de diámetro en comparación con el cultivo en matraz que fue de $2-7 \text{ mm}$. Es posible que estas diferencias se deban a que las condiciones de cultivo son más controladas en el fermentador ya que la hidrodinámica dentro del sistema está influenciada por la agitación, la aireación y la reología del caldo de cultivo [23,24].

Tabla 3. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y el consumo de glucosa de *P. ostreatus*

Temperatura (°C)	μ (h^{-1})	q_s ($\text{g g}^{-1} \text{ peso seco h}^{-1}$)	Biomasa (g/l)
23	0,019	0,031	3,00
26	0,023	0,038	4,12
29	0,026	0,043	4,01
32	0,017	0,028	1,80

Todas las medias son significativamente diferentes ($\alpha = 0,01\%$).

Reinoculación a medio sólido. La velocidad de crecimiento micelial de *P. ostreatus* se incrementó conforme aumentó la edad del micelio en cultivo líquido al ser resembrado. Así, la mayor velocidad se obtuvo en las resiembras de los inoculos de 12 días con $\mu = 0,036 \text{ h}^{-1}$, mientras que los de 3 y 6 días tuvieron $\mu = 0,024$ y $0,025 \text{ h}^{-1}$, respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Velocidad de crecimiento del micelio de *P. ostreatus* resembrado en agar DLA a partir del inóculo líquido de diferente edad.

Edad del inóculo (días)	μ (h^{-1})
3	0,024 *
6	0,025 *
9	0,029
12	0,036

* no hay diferencia significativa ($\alpha = 0,01\%$)

Esto probablemente se debió a que al resembrar el micelio, este se encontraba en fase exponencial del crecimiento y su producción enzimática era mayor. Además, en la resiembra se suministraron nutrientes y por tanto, se prolongó la tendencia del crecimiento lo que disminuyó el período de adaptación y el tiempo de cultivo en el sustrato sólido.

Producción de enzimas. En el caldo de cultivo libre de células no se detectó la enzima lignina peroxidasa pero sí lacasa, de la que se produjo aproximadamente 307 U/l y de manganeso peroxidasa $0,41 \text{ U/l}$. Vyas y Molitoris [11] evaluaron la producción de estas enzimas por *P. ostreatus* en fermentación sólida en paja y obtuvieron una actividad enzimática máxima de lacasa de $0,015 \text{ U/g}$ y de $0,809 \text{ U/g}$ de manganeso peroxidasa. Estos autores tampoco detectaron la presencia de la enzima lignina peroxidasa.

El pH óptimo está entre $4,5-5,5$ y coincide con el intervalo citado en trabajos previos [5,19]. A pHs inferiores a 4 y superiores a $6,5$ el crecimiento se encuentra marcadamente afectado. Utilizando un biorreactor podemos controlar el pH en el rango óptimo y mejorar la producción de biomasa.

Es difícil definir el rendimiento en un medio complejo como el utilizado en éste trabajo, pero los resultados indican que *P. ostreatus* utiliza la glucosa eficientemente y la biomasa final depende directamente de la concentración de glucosa. En condiciones de limitación de glucosa *P. ostreatus* puede utilizar otra fuente de carbono.

Al igual que en otros cultivos sumergidos de hongos filamentosos, la morfología y tamaño de los *pellets* obtenidos para esta especie están determinados por el estrés mecánico durante el cultivo, esto quiere decir, con una distribución más homogénea del tamaño al utilizar un biorreactor [23,24].

Parece ser que la producción de lignina peroxidasa y lacasa está asociada al crecimiento de algunas especies de *Pleurotus* [16,25], sin embargo se requieren experimentos más precisos para definir su producción en *P. ostreatus*. Los cultivos sumergidos pueden usarse para preparar mayor cantidad de inóculo, de un tamaño homogéneo y que al resembrarse en medio sólido crezca rápidamente. Además el medio extracelular puede utilizarse para obtener enzimas como un subproducto de alto valor agregado.

Bibliografía

- Mata G, Martínez-Carrera D. Estimación de la producción anual de residuos agroindustriales potencialmente utilizables para el cultivo de hongos comestibles en México. *Rev Mex Micol* 1988; 4:287-296.
- Sánchez-Vázquez JE, Huerta-Palacios G, Calvo-Bado LA. El cultivo de hongos comestibles como alternativa sustentable en el trópico. En: Palm ME, Chapela IH (Eds.) *Mycology in Sustainable Development: Expanding Concepts, Vanishing Borders*. Boone, North Carolina, Parkway Publishers, Inc., 1996:227-237.
- Zadrazil F. Cultivation of *Pleurotus*. En: Chang ST, Hayes WA (Eds.) *The biology of edible mushrooms*. London, Academic Press, 1978:521-557.
- Lopez-Arevalo A, Huerta-Palacios G, Sanchez-Vazquez JE. Contamination during cultivation of *Pleurotus ostreatus* in Tropical Mexico. En: Royle DJ (Eds.) *Second International Conference on Mushrooms Products*, Pennsylvania, 1996:495-502.
- Hadar Y, Cohen-Arazi E. Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51:1352-1354.
- Raaska L. Production of *Lentinula edodes* mycelia in liquid media: improvement of mycelial growth by medium modification. *Mush J Tropics* 1990; 10:79-92.
- Hadar Y, Dosoretz CG. Mushroom micellium as a potential source of food flavour. *Trends in Food Science & Technology*. Amsterdam, 1991; 2:14-218.
- Bezalel L, Hadar Y, Fu PP, Freeman JP, Cerniglia CE. Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62:2547-2553.
- Bezalel L, Hadar Y, Cerniglia CE. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62:292-295.
- Belinky PA, Masaphy S, Levanon D, Hadar Y, Dosoretz CG. Effect of medium composition on 1-octen-3-ol formation in submer-

- ged cultures of *Pleurotus pulmonarius*. Appl Microbiol Biotechnol 1994; 40:629-633.
11. Cullen D, Kersten PJ. Enzymology and molecular Biology of lignin degradation. En: Essert K, Lemke PA (Eds.) The Mycota (Vol III). New York, Springer Verlag, 1996; 13:295-301.
 12. Bezalel L, Hadar Y, Fu PP, Freeman JP, Cerniglia CE. Initial oxidation products in metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl Environ Microbiol 1996; 62: 2554-2559.
 13. Bezalel L, Hadar Y, Cerniglia CE. Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl Environ Microbiol 1997; 63:2495-2501.
 14. Vyas BRM, Molitoris HP. Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of remazol brilliant blue R. Appl Environ Microbiol 1995; 61:3919-3927.
 15. Fukushima Y, Okada K, Kawai G, Motai H. Efficient production of mycelium of *Lentinus edodes* by a continuous culture. Mushroom Science 1991; 13:721-725.
 16. Das N, Sengupta S, Mukherjee M. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. Appl Environ Microbiol 1997; 63:4120-4122.
 17. Tien M, Kirk TK. Lignin peroxidase of *Phanaerochaete chrysosporium*. Methods Enzymol 1988; 161:238-249.
 18. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 1959; 31:426-428.
 19. Bukhalo AS, Solomko EF. Submerged culture growth of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm on complex medium. Mushroom Science 1978; 10: 833-840.
 20. El-Kattan MH, Gali Y, Abdel-Rahim EA, Aly AZM. Submerged production of *Pleurotus sajor-caju* on bagasse hydrolyzate medium. Mush J Tropics 1990; 10:105-114.
 21. Sánchez JE, Martín AM. *Pleurotus* production in coffee bean wash water. En: Yano T Matsuno R, Nakamura K (Eds.) Developments in food engineering. London, Chapman and Hall, 1994: 1017-1019.
 22. Atkinson B, Mavituna F. Biochemical engineering and biotechnology handbook. New York, Stockton Press, 1991:224-226.
 23. Justen PG, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. Biotechnol Bioeng 1996; 52: 672-684.
 24. Cui YQ, van der Lans RGJM, Luyben KCAM. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. Biotechnol Bioeng 1997; 55: 715-726.
 25. Kumaran S, Sastry CA, Vikineswary S. Laccase, cellulase and xylanase activities during growth *Pleurotus sajor-caju* on Sago hampas. World J Microbiol Biotechnol 1997; 13:43-49.