

**“ESTABLECIMIENTO DE UN MEDIO DE CULTIVO SUMERGIDO PARA
Psilocybe sp”**

**PILAR GARCÍA GÓMEZ
NATALIA RAMÍREZ LALINDE**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS
ESCUELA DE INGENIERÍA
UNIVERSIDAD EAFIT
MEDELLÍN
2009**

**“ESTABLECIMIENTO DE UN MEDIO DE CULTIVO SUMERGIDO PARA
Psilocybe sp”**

PILAR GARCÍA GÓMEZ

NATALIA RAMÍREZ LALINDE

**Proyecto de grado para optar al título de
Ingeniero de Procesos**

ASESOR

ALEX ARMANDO SÁEZ VEGA

Químico MSc. En Biotecnología

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS

ESCUELA DE INGENIERÍA

UNIVERSIDAD EAFIT

MEDELLÍN

2009

Nota de aceptación

Jurado

Jurado

Jurado

Ciudad y fecha

*A Dios por habernos brindado
la oportunidad de lograr este
trunfo en nuestras vidas.*

*A nuestras familias por todo el
apoyo que nos brindaron durante
el desarrollo de este proyecto
y por habernos dado la gran
oportunidad de convertirnos
en profesionales.*

*A toda la docencia por
la educación y orientación
recibida por ésta.*

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a todas las personas que desde su experiencia y profesión brindaron apoyo durante el desarrollo de este proyecto:

Alex Armando Sáez V, Químico MSc. En Biotecnología, Candidato a Doctorado, Profesor Universidad EAFIT.

Personal de laboratorio de Ingeniería de Procesos, Edgar Arbeláez, John Estrada y especialmente, Sigifredo Cárdenas encargado del laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT.

Luz Deisy Marín Palacio, Ingeniera de Procesos. Profesora Universidad EAFIT.

Diego Acosta, PhD Engineering and Material Science. Profesor Universidad EAFIT.

Carlos Correa, Ingeniero Químico, Profesor Universidad EAFIT.

Valeska Villegas E, Msc. En Biotecnología, Candidata a Doctorado, Profesora Universidad EAFIT.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE GRÁFICOS	XII
LISTA DE ECUACIONES	XV
LISTAS DE ANEXOS	XVI
RESUMEN	XVII
INTRODUCCIÓN	19
OBJETIVOS	21
GENERAL	21
ESPECÍFICOS	21
1. MARCO TEÓRICO	22
1.1 CONCEPTOS GENERALES DE HONGOS	22
1.1.1 Hongos laminares (<i>Agaricales</i>)	22
1.2 MEDIOS DE CULTIVO	24
1.2.1 Medio sumergido	25
1.3 ALCALOIDES	26
1.3.1 Generalidades	26
1.3.2 Propiedades fisicoquímicas	27
1.3.3 Reconocimiento de los alcaloides	27
1.3.4 Clasificación de los alcaloides	28
1.3.4.1 Alcaloides alifáticos	28
1.3.4.2 Alcaloides de origen diverso	28
1.3.4.3 Alcaloides aromáticos	28
1.3 PSILOCIBINA Y PSILOCINA	31
1.3.1 Antecedentes acerca de la obtención de <i>Psilocibina</i> y <i>Psilocina</i>	32
2 MATERIALES Y MÉTODOS	34
2.1 LOCALIZACIÓN	34
2.2 MICROORGANISMO DE ESTUDIO	34
2.3 COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO (FANG-ZHONG)	35
2.4 PREPARACIÓN DE LOS DIFERENTES PREINÓCULOS DE <i>P. CUBENSIS</i> EMPLEADOS PARA LAS FERMENTACIONES SUMERGIDAS	35
2.5 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y LOS INÓCULOS DE <i>P. CUBENSIS</i> UTILIZADOS PARA LAS FERMENTACIONES SUMERGIDAS	36
2.6 CUANTIFICACIÓN DEL CRECIMIENTO DE BIOMASA MEDIANTE LOS MÉTODOS DE PESO HÚMEDO Y PESO SECO PARA CULTIVO SUMERGIDO DE <i>P. CUBENSIS</i>	37
2.7 AJUSTE DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>P. CUBENSIS</i> AL MODELO CINÉTICO LOGÍSTICO	37

2.8	EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE SUSTRATO Y DEL CONSUMO DE PROTEÍNA POR PARTE DEL P. CUBENSIS CULTIVADO EN MEDIO SUMERGIDO	39
2.9	MÉTODO CUALITATIVO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE ALCALOIDES (PSILOCIBINA) MEDIANTE EL USO DEL REACTIVO DE DRAGENDORFF	40
2.10	MÉTODO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE PSILOCIBINA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)	40
2.11	DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA RESOLUCIÓN DEL ALCALOIDE DE INTERÉS PARA LOS DIFERENTES ENSAYOS	41
2.12	DETERMINACIÓN PORCENTUAL DE COMPUESTOS PARA LOS DIFERENTES ENSAYOS	42
2.13	CULTIVO SUMERGIDO DE P. CUBENSIS EN PRESENCIA DE F.A.	42
2.14	DISEÑO DE EXPERIMENTOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
3.1	CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICELIAL DE P. CUBENSIS EN CULTIVO SUMERGIDO (FANG-ZHONG) UTILIZANDO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO	45
3.1.1	<i>Crecimiento micelial de P. cubensis en medio sumergido utilizando diferentes concentraciones de glucosa</i>	45
3.1.2	<i>Crecimiento micelial del P. cubensis en medio sumergido utilizando diferentes concentraciones de sacarosa.</i>	50
3.1.3	<i>Comparación entre el crecimiento micelial de P. cubensis en los cultivos sumergidos utilizando glucosa y sacarosa como fuente de carbono.</i>	55
3.1.4	<i>Crecimiento micelial del P. cubensis en cultivo sumergido utilizando glucosa y fenilalanina en el medio.</i>	56
3.2	ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE CONSUMO DE SUSTRATO POR PARTE DEL P. CUBENSIS CULTIVADO EN MEDIO SUMERGIDO (FANG-ZHONG)	61
3.2.1	<i>Consumo de sustrato por parte del P. cubensis en medio sumergido utilizando diferentes concentraciones de glucosa</i>	62
3.2.2	<i>Consumo de sustrato por parte del P. cubensis en medio sumergido utilizando diferentes concentraciones de sacarosa</i>	63
3.2.3	<i>Comparación entre el consumo de sustrato de P. cubensis en los cultivos sumergidos con diferentes fuentes de carbono</i>	65
3.2.4	<i>Consumo de sustrato por parte del P. cubensis en medio sumergido utilizando glucosa y fenilalanina en el medio.</i>	66
3.3	ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE CONSUMO DE PROTEÍNA POR PARTE DEL P. CUBENSIS CULTIVADO EN MEDIO SUMERGIDO (FANG-ZHONG)	69
3.3.1	<i>Consumo de proteína por P. cubensis en medio sumergido utilizando diferentes concentraciones de glucosa</i>	69
3.3.2	<i>Consumo de proteína por P. cubensis en medio sumergido utilizando diferentes concentraciones de sacarosa</i>	71
3.3.3	<i>Comparación entre el consumo de proteína de P. cubensis en los cultivos sumergidos con diferentes fuentes de carbono</i>	72
3.3.4	<i>Consumo de proteína por P. cubensis en medio sumergido utilizando glucosa y F.A en el medio</i>	73
3.4	ESTUDIO CUALITATIVO DE LA PRESENCIA DEL ALCALOIDE	76

3.4.1	<i>Producción de compuestos producidos por P. cubensis cuando el medio no contenía F.A</i>	76
3.4.2	<i>Producción de compuestos producidos por P. cubensis cuando el medio contenía F.A</i>	79
3.5	ESTUDIO PORCENTUAL (ÁREA) DEL ALCALOIDE REALIZADO PARA LOS DIFERENTES ENSAYOS	81
3.5.1	<i>Porcentaje de la Psilocibina (suposición) cuando el medio no contenía F.A</i>	81
3.5.2	<i>Porcentaje de área de compuestos presentes en P. cubensis cuando el medio contenía F.A</i>	83
CONCLUSIONES		86
RECOMENDACIONES		89
ANEXOS		90
BIBLIOGRAFÍA		121

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO SUMERGIDO PARA EVALUAR EL CRECIMIENTO MICELIAL DEL <i>P. CUBENSIS</i>	35
TABLA 2. PARÁMETROS CINÉTICOS OBTENIDOS MEDIANTE EL MODELO LOGÍSTICO PARA LAS DIFERENTES FERMENTACIONES DE <i>P. CUBENSIS</i> UTILIZANDO GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO	48
TABLA 3. PARÁMETROS CINÉTICOS OBTENIDOS MEDIANTE EL MODELO LOGÍSTICO PARA LAS DIFERENTES FERMENTACIONES DE <i>P. CUBENSIS</i> UTILIZANDO SACAROSA COMO FUENTE DE CARBONO	53
TABLA 4. PARÁMETROS CINÉTICOS OBTENIDOS MEDIANTE EL MODELO LOGÍSTICO PARA LAS DIFERENTES FERMENTACIONES DE <i>P. CUBENSIS</i> UTILIZANDO 50 G/L DE GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE F.A.....	60
TABLA 5. PORCENTAJE DE ÁREA HALLADO MEDIANTE HPLC PARA LOS ÚLTIMOS TRES DÍAS DE LA FERMENTACIÓN CON CONCENTRACIONES DE 30 G/L, 50 G/L Y 70 G/L DE GLUCOSA Y SACAROSA CON UN TIEMPO DE RETENCIÓN DE 6.2 Y 7.2 MINUTOS.....	81
TABLA 6. PORCENTAJE HALLADO MEDIANTE HPLC PARA LOS ÚLTIMOS TRES DÍAS DE LA FERMENTACIÓN CON CONCENTRACIONES DE 0.5 G/L, 1.0 G/L Y 1.5 G/L DE F.A Y 50 G/L DE GLUCOSA CON UN TIEMPO DE RETENCIÓN ENTRE 6.2 Y 7.2 MINUTOS.....	83
TABLA 7. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL CRECIMIENTO MICELIAL (GLUCOSA)	90
TABLA 8. ANÁLISIS MÚLTIPLE DE RANGOS PARA EL CRECIMIENTO MICELIAL (GLUCOSA)	90
TABLA 9. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL CRECIMIENTO MICELIAL (SACAROSA)	91
TABLA 10. ANÁLISIS MÚLTIPLE DE RANGOS PARA EL CRECIMIENTO MICELIAL (SACAROSA).....	91
TABLA 11. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL CRECIMIENTO MICELIAL (GLUCOSA Y SACAROSA)	92
TABLA 12. ANÁLISIS MÚLTIPLE DE RANGOS PARA EL CRECIMIENTO MICELIAL (GLUCOSA Y SACAROSA)	92
TABLA 13. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL CRECIMIENTO MICELIAL (GLUCOSA 50 G/L Y F.A)	93
TABLA 14. ANÁLISIS MÚLTIPLE DE RANGOS PARA EL CRECIMIENTO MICELIAL (GLUCOSA 50 G/L Y F.A)	93
TABLA 15. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL CONSUMO DE SUSTRATO SIN F.A	94
TABLA 16. ANÁLISIS MÚLTIPLE DE RANGOS PARA EL CONSUMO DE SUSTRATO SIN F.A	94
TABLA 17. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL CONSUMO DE SUSTRATO CON F.A.....	95
TABLA 18. ANÁLISIS MÚLTIPLE DE RANGOS PARA EL CONSUMO DE SUSTRATO CON F.A	95
TABLA 19. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL CONSUMO DE PROTEÍNA SIN F.A	96
TABLA 20. ANÁLISIS MÚLTIPLE DE RANGOS PARA EL CONSUMO DE PROTEÍNA SIN F.A.....	96
TABLA 21. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL CONSUMO DE PROTEÍNA CON F.A	97
TABLA 22. ANÁLISIS MÚLTIPLE DE RANGOS PARA EL CONSUMO DE PROTEÍNA CON F.A	97
TABLA 23. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA PRODUCCIÓN DE <i>PSILOCIBINA</i> SIN F.A	98
TABLA 24. ANÁLISIS MÚLTIPLE DE RANGOS PARA LA PRODUCCIÓN DE <i>PSILOCIBINA</i> SEGÚN EL SUSTRATO SIN F.A	98
TABLA 25. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA PRODUCCIÓN DE <i>PSILOCIBINA</i> CON F.A	99
TABLA 26. ANÁLISIS MÚLTIPLE DE RANGOS PARA LA PRODUCCIÓN DE <i>PSILOCIBINA</i> SEGÚN EL DÍA CON F.A	99
TABLA 27. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE <i>PSILOCIBINA</i> SIN F.A	100
TABLA 28. ANÁLISIS MÚLTIPLE DE RANGOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE <i>PSILOCIBINA</i> SEGÚN EL TIPO DE SUSTRATO SIN F.A.....	100
TABLA 29. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE <i>PSILOCIBINA</i> CON F.A.....	101

TABLA 30. ANÁLISIS MÚLTIPLE DE RANGOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE <i>PSILOCIBINA</i> SEGÚN LA CONCENTRACIÓN CON F.A	101
TABLA 31. ÁREAS OBTENIDAS DE LOS CROMATOGRAMAS PARA EL <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO FANG-ZHONG EN EL DÍA 12 PARA CONCENTRACIONES DE 30G/L GLUCOSA Y 30G/L SACAROSA	109
TABLA 32. ÁREAS OBTENIDAS DE LOS CROMATOGRAMAS PARA EL <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO FANG-ZHONG EN EL DÍA 12 PARA CONCENTRACIONES DE 50G/L GLUCOSA Y 50G/L SACAROSA.....	110
TABLA 33. ÁREAS OBTENIDAS DE LOS CROMATOGRAMAS PARA EL <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO FANG-ZHONG EN EL DÍA 12 PARA CONCENTRACIONES DE 50G/L GLUCOSA Y 50G/L SACAROSA.....	111
TABLA 34. ÁREAS OBTENIDAS DE LOS CROMATOGRAMAS PARA EL <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO FANG-ZHONG EN EL DÍA 12 PARA CONCENTRACIONES DE 50G/L Y GLUCOSA 50G/L SACAROSA.....	112
TABLA 35. ÁREAS OBTENIDAS DE LOS CROMATOGRAMAS PARA EL <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO FANG-ZHONG EN EL DÍA 13 PARA CONCENTRACIONES DE 30G/L GLUCOSA Y 30G/L SACAROSA.....	113
TABLA 36. ÁREAS OBTENIDAS DE LOS CROMATOGRAMAS PARA EL <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO FANG-ZHONG EN EL DÍA 13 PARA CONCENTRACIONES DE 50G/L GLUCOSA Y 50G/L SACAROSA	114
TABLA 37. ÁREAS OBTENIDAS DE LOS CROMATOGRAMAS PARA EL <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO FANG-ZHONG EN EL DÍA 13 PARA CONCENTRACIONES DE 70G/L GLUCOSA Y 70G/L SACAROSA	115
TABLA 38. ÁREAS OBTENIDAS DE LOS CROMATOGRAMAS PARA EL <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO FANG-ZHONG EN EL DÍA 13 PARA CONCENTRACIONES DE 50G/L Y GLUCOSA 50G/L SACAROSA.....	116
TABLA 39. ÁREAS OBTENIDAS DE LOS CROMATOGRAMAS PARA EL <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO FANG-ZHONG EN EL DÍA 14 PARA CONCENTRACIONES DE 30G/L GLUCOSA Y 30 G/L SACAROSA.....	117
TABLA 40. ÁREAS OBTENIDAS DE LOS CROMATOGRAMAS PARA EL <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO FANG-ZHONG EN EL DÍA 14 PARA CONCENTRACIONES DE 50G/L GLUCOSA Y 50G/L SACAROSA	118
TABLA 41. ÁREAS OBTENIDAS DE LOS CROMATOGRAMAS PARA EL <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO FANG-ZHONG EN EL DÍA 14 PARA CONCENTRACIONES DE 70G/L GLUCOSA Y 70G/L SACAROSA	119
TABLA 42. ÁREAS OBTENIDAS DE LOS CROMATOGRAMAS PARA EL <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO FANG-ZHONG EN EL DÍA 13 PARA CONCENTRACIONES DE 50G/L GLUCOSA Y 50G/L SACAROSA	120

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. HONGO AGARICALES (LAMINAR) (KUO, 2007)	23
FIGURA 2. ALCALOIDES DERIVADOS DEL TRIPTOFANO (MERCANO Y HASEGAWA, 1991).....	29
FIGURA 3. TRIPTAMINAS SIMPLES (SEIGLER, 1981)	31
FIGURA 4. <i>PSILOCIBINA</i> Y <i>PSILOCINA</i> (MANDRILE <i>ET AL.</i> , 1984)	32
FIGURA 5. <i>PSILOCYBE CUBENSIS</i> (EAH01) <i>CULTIVADA</i> EN MEDIO SÓLIDO AGAR MALTA.....	34
FIGURA 6. CROMATOGRAMAS DE DOS DIFERENTES FERMENTACIONES DE <i>P. CUBENSIS</i> QUE ILUSTRAN EL CRITERIO DE ESCOGENCIA DEL MEJOR ENSAYO REALIZADO (A) 50 G/L GLUCOSA (B) 50 G/L SACAROSA	78
FIGURA 7. CROMATOGRAMAS DE DOS DIFERENTES FERMENTACIONES DE <i>P. CUBENSIS</i> QUE ILUSTRAN EL CRITERIO DE ESCOGENCIA DEL MEJOR ENSAYO REALIZADO (A) 0.5 G/L F.A (B) 1.5 G/L F.A	80
FIGURA 8. MUESTRA DE BIOMASA UNA VEZ ANALIZADA MEDIANTE EL REACTIVO DE DRAGENDORFF	107
FIGURA 9. PERFIL CROMATOGRÁFICO (TSUJIKAWA <i>ET AL.</i> , 2003)	108

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICELIAL DE <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO SUMERGIDO (FANG-ZHONG) UTILIZANDO TRES DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO (PESO SECO).....	46
GRÁFICO 2. CRECIMIENTO MICELIAL DE <i>P. CUBENSIS</i> EN CULTIVO SUMERGIDO BAJO TRES CONCENTRACIONES DE GLUCOSA.....	47
GRÁFICO 3. VALORES DE CONCENTRACIÓN DE BIOMASA EXPERIMENTAL Y TEÓRICO GRAFICADOS CON RESPECTO AL TIEMPO PARA LAS FERMENTACIONES CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCOSA.....	49
GRÁFICO 4. CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICELIAL DE <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO SUMERGIDO (FANG-ZHONG) UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA COMO FUENTE DE CARBONO (PESO SECO).....	50
GRÁFICO 5. CRECIMIENTO MICELIAL PARA TRES DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA.....	52
GRÁFICO 6. VALORES DE CONCENTRACIÓN DE BIOMASA EXPERIMENTAL Y TEÓRICO GRAFICADOS CON RESPECTO AL TIEMPO PARA LAS FERMENTACIONES CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA.....	54
GRÁFICO 7. CRECIMIENTO MICELIAL PARA DOS DIFERENTES FUENTES DE CARBONO (GLUCOSA Y SACAROSA).....	56
GRÁFICO 8. CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICELIAL DE <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO SUMERGIDO (FANG-ZHONG) UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE F.A Y 50 G/L DE GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO (PESO SECO).....	57
GRÁFICO 9. CRECIMIENTO MICELIAL PARA GLUCOSA A UNA CONCENTRACIÓN DE 50 G/L Y TRES DIFERENTES CONCENTRACIONES DE F.A.....	59
GRÁFICO 10. VALORES DE CONCENTRACIÓN DE BIOMASA EXPERIMENTAL Y TEÓRICO GRAFICADOS CON RESPECTO AL TIEMPO PARA LAS FERMENTACIONES CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE F.A Y 50 G/L DE GLUCOSA.....	61
GRÁFICO 11. CINÉTICA DE CONSUMO DE SUSTRATO POR PARTE DEL <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO SUMERGIDO UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO.....	62
GRÁFICO 12. CINÉTICA DE CONSUMO DE SUSTRATO POR PARTE DEL <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO SUMERGIDO UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA COMO FUENTE DE CARBONO.....	64
GRÁFICO 13. CONSUMO DE SUSTRATO PARA CADA UNA DE LAS FUENTES DE CARBONO UTILIZADAS.....	66
GRÁFICO 14. CINÉTICA DE CONSUMO DE SUSTRATO POR PARTE DEL <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO SUMERGIDO UTILIZANDO 50 G/L DE GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE F.A.....	67
GRÁFICO 15. CONSUMO DE SUSTRATO PARA CADA UNA DE LAS CONCENTRACIONES DE F.A UTILIZADAS.....	68
GRÁFICO 16. CINÉTICA DE CONSUMO DE PROTEÍNA POR PARTE DEL <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO SUMERGIDO UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO.....	70
GRÁFICO 17. CINÉTICA DE CONSUMO DE PROTEÍNA POR PARTE DEL <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO SUMERGIDO UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA COMO FUENTE DE CARBONO.....	71
GRÁFICO 18. CONSUMO DE PROTEÍNA PARA CADA UNA DE LAS FUENTES DE CARBONO UTILIZADAS.....	73

GRÁFICO 19. CINÉTICA DE CONSUMO DE PROTEÍNA POR PARTE DEL <i>P. CUBENSIS</i> EN MEDIO SUMERGIDO UTILIZANDO 50 G/L DE GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE F.A.....	74
GRÁFICO 20. CONSUMO DE PROTEÍNA PARA LOS ENSAYOS CON Y SIN F.A	75
GRÁFICO 21. ÁREA DEL COMPUESTO OBTENIDO DE <i>P. CUBENSIS</i> EN TIEMPO DE RETENCIÓN ENTRE 6.2 Y 7.2 MINUTOS PARA LAS DOS FUENTES DE CARBONO	77
GRÁFICO 22. ÁREA DEL COMPUESTO OBTENIDO DE <i>P. CUBENSIS</i> EN TIEMPO DE RETENCIÓN ENTRE 6.2 Y 7.2 MINUTOS EN LOS ÚLTIMOS TRES DÍAS DE LA FERMENTACIÓN CON F.A Y GLUCOSA	79
GRÁFICO 23. ÁREA DEL COMPUESTO OBTENIDO DE <i>P. CUBENSIS</i> EN TIEMPO DE RETENCIÓN ENTRE 6.2 Y 7.2 MINUTOS PARA CADA UNA DE LAS FUENTES DE CARBONO UTILIZADAS	82
GRÁFICO 24. ÁREA DEL COMPUESTO OBTENIDO DE <i>P. CUBENSIS</i> EN TIEMPO DE RETENCIÓN ENTRE 6.2 Y 7.2 MINUTOS PARA CADA UNA DE LAS CONCENTRACIONES DE F.A UTILIZADAS	85
GRÁFICO 25. CROMATOGRAMAS DEL DÍA 12 PARA EL <i>P. CUBENSIS CULTIVADO</i> EN MEDIO SUMERGIDO FANG-ZHONG CON DOS DIFERENTES TIPOS DE SUSTRATOS (A) 30 G/L GLUCOSA (B) 30 G/L SACAROSA	109
GRÁFICO 26. CROMATOGRAMAS DEL DÍA 12 PARA EL <i>P. CUBENSIS CULTIVADO</i> EN MEDIO SUMERGIDO FANG-ZHONG CON DOS DIFERENTES TIPOS DE SUSTRATOS (A) 50 G/L GLUCOSA (B) 50 G/L SACAROSA	110
GRÁFICO 27. CROMATOGRAMAS DEL DÍA 12 PARA EL <i>P. CUBENSIS CULTIVADO</i> EN MEDIO SUMERGIDO FANG-ZHONG CON DOS DIFERENTES TIPOS DE SUSTRATOS (A) 50 G/L GLUCOSA (B) 50 G/L SACAROSA	111
GRÁFICO 28. CROMATOGRAMA DEL DÍA 12 PARA EL <i>P. CUBENSIS CULTIVADO</i> EN MEDIO SUMERGIDO FANG-ZHONG CON FUENTE DE CARBONO GLUCOSA Y ADICIÓN DE FENILALANINA EN TRES CONCENTRACIONES. (A) 0.5 G/L F.A (B) 1 G/L F.A (C) 1.5G/L F.A	112
GRÁFICO 29. CROMATOGRAMAS DEL DÍA 13 PARA EL <i>P. CUBENSIS CULTIVADO</i> EN MEDIO SUMERGIDO FANG-ZHONG CON DOS DIFERENTES TIPOS DE SUSTRATOS (A) 30 G/L GLUCOSA (B) 30 G/L SACAROSA	113
GRÁFICO 30. CROMATOGRAMAS DEL DÍA 13 PARA EL <i>P. CUBENSIS CULTIVADO</i> EN MEDIO SUMERGIDO FANG-ZHONG CON DOS DIFERENTES TIPOS DE SUSTRATOS (A) 50 G/L GLUCOSA (B) 50 G/L SACAROSA	114
GRÁFICO 31. CROMATOGRAMAS DEL DÍA 13 PARA EL <i>P. CUBENSIS CULTIVADO</i> EN MEDIO SUMERGIDO FANG-ZHONG CON DOS DIFERENTES TIPOS DE SUSTRATOS (A) 70 G/L GLUCOSA (B) 70 G/L SACAROSA	115
GRÁFICO 32. CROMATOGRAMAS DEL DÍA 12 PARA EL <i>P. CUBENSIS CULTIVADO</i> EN MEDIO SUMERGIDO FANG-ZHONG CON FUENTE DE CARBONO GLUCOSA Y ADICIÓN DE FENILALANINA EN TRES CONCENTRACIONES. (A) 0.5 G/L F.A (B) 1 G/L F.A (C) 1.5G/L F.A	116
GRÁFICO 33. CROMATOGRAMAS DEL DÍA 14 PARA EL <i>P. CUBENSIS CULTIVADO</i> EN MEDIO SUMERGIDO FANG-ZHONG CON DOS DIFERENTES TIPOS DE SUSTRATOS (A) 30 G/L GLUCOSA (B) 30 G/L SACAROSA	117
GRÁFICO 34. CROMATOGRAMAS DEL DÍA 14 PARA EL <i>P. CUBENSIS CULTIVADO</i> EN MEDIO SUMERGIDO FANG-ZHONG CON DOS DIFERENTES TIPOS DE SUSTRATOS (A) 50 G/L GLUCOSA (B) 50 G/L SACAROSA	118

GRÁFICO 35. CROMATOGRAMAS DEL DÍA 14 PARA EL <i>P. CUBENSIS</i> CULTIVADO EN MEDIO SUMERGIDO FANG-ZHONG CON DOS DIFERENTES TIPOS DE SUSTRATOS (A) 70 G/L GLUCOSA (B) 70 G/L SACAROSA	119
GRÁFICO 36. CROMATOGRAMAS DEL DÍA 12 PARA EL <i>P. CUBENSIS</i> CULTIVADO EN MEDIO SUMERGIDO FANG-ZHONG CON FUENTE DE CARBONO GLUCOSA Y ADICIÓN DE FENILALANINA EN TRES CONCENTRACIONES. (A) 0.5 G/L F.A (B) 1 G/L F.A (C) 1.5G/L F.A (A) 0.5 G/L F.A (B) 1 G/L F.A (C) 1.5G/L F.A	120

LISTA DE ECUACIONES

ECUACIÓN 1. ECUACIÓN LINEALIZADA DEL MODELO LOGÍSTICO	38
ECUACIÓN 2. VALORES TEÓRICOS DE BIOMASA EN EL TIEMPO	39

LISTAS DE ANEXOS

ANEXO 1. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL CRECIMIENTO DE BIOMASA DE LAS FERMENTACIONES CON GLUCOSA _____	90
ANEXO 2. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL CRECIMIENTO DE BIOMASA DE LAS FERMENTACIONES CON SACAROSA _____	91
ANEXO 3. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL CRECIMIENTO DE BIOMASA DE LAS FERMENTACIONES CON GLUCOSA Y SACAROSA _____	92
ANEXO 4. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL CRECIMIENTO DE BIOMASA DE LAS FERMENTACIONES CON GLUCOSA 50 G/L Y F.A _____	93
ANEXO 5. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL CONSUMO DE SUSTRATO EN LAS FERMENTACIONES SIN F.A _____	94
ANEXO 6. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL CONSUMO DE SUSTRATO EN LAS FERMENTACIONES CON F.A _____	95
ANEXO 7. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL CONSUMO DE PROTEÍNA EN LAS FERMENTACIONES SIN F.A _____	96
ANEXO 8. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL CONSUMO DE PROTEÍNA EN LAS FERMENTACIONES CON F.A _____	97
ANEXO 9. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LA PRODUCCIÓN DE <i>PSILOCIBINA</i> EN LAS FERMENTACIONES SIN F.A _____	98
ANEXO 10. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LA PRODUCCIÓN DE <i>PSILOCIBINA</i> EN LAS FERMENTACIONES CON F.A _____	99
ANEXO 11. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LA CUANTIFICACIÓN PORCENTUAL DE <i>PSILOCIBINA</i> EN LAS FERMENTACIONES SIN F.A _____	100
ANEXO 12. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LA CUANTIFICACIÓN PORCENTUAL DE <i>PSILOCIBINA</i> EN LAS FERMENTACIONES CON F.A _____	101
ANEXO 13. DETERMINACIÓN DE CONSUMO DE AZÚCARES POR EL MÉTODO DE DNS (ÁCIDO DINITROSALICÍLICO) _____	102
ANEXO 14. CINÉTICA DE CONSUMO DE SUSTRATO _____	104
ANEXO 15. DETERMINACIÓN DE CONSUMO DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY _____	105
ANEXO 16. CINÉTICA CONSUMO DE PROTEÍNA _____	106
ANEXO 17. PRUEBA DE REACTIVO DE DRAGENDORFF _____	107
ANEXO 18. BARRIDO ESPECTRAL PARA EL <i>PSILOCYBE CUBENSIS</i> _____	108
ANEXO 19. CROMATOGRAMAS (HPLC) DEL DÍA 12 DE FERMENTACIÓN _____	109
ANEXO 20. CROMATOGRAMAS (HPLC) DEL DÍA 13 DE FERMENTACIÓN _____	113
ANEXO 21. CROMATOGRAMAS (HPLC) DEL DÍA 14 DE FERMENTACIÓN _____	117

RESUMEN

El *Psilocybe cubensis* es un hongo de gran importancia a nivel industrial, gracias a la presencia de una sustancia llamada *Psilocibina* en su cuerpo fructífero.

Dicho alcaloide, derivado de la triptamina, es muy similar al neurotransmisor *serotonina*, el cual es responsable de la percepción sensorial, la regulación de la temperatura, el inicio del reposo nocturno, del hígado y los riñones. Por tal motivo, este estudio se enfocó en la producción de la *Psilocibina* mediante el cultivo del *P. cubensis* en medio sumergido (Fang-Zhong).

Se evaluaron los efectos de dos fuentes de carbono (glucosa y sacarosa), a tres concentraciones diferentes en cultivo sumergido para *Psilocybe cubensis*, con el fin de determinar la incidencia de éstas en la producción de biomasa y en la producción y presencia de *Psilocibina*; alcaloide de interés. Para las concentraciones de glucosa de 30 g/L, 50 g/L y 70 g/L se presentó un crecimiento máximo de biomasa de 0.48 g/L; 0.55 g/L y 0.62 g/L y un porcentaje de alcaloide de 60.65% w/v, 73.96% w/v y 67.33% w/v respectivamente. Esto último si se asume que el tiempo de retención oscila entre 6.2 y 7.2 minutos, contándose con una fase móvil de HCOONH_4 en una columna C18. Mientras que para las mismas concentraciones de sacarosa se presentó un crecimiento máximo de biomasa de 0.26 g/L; 0.45 g/L y 0.57 g/L, con porcentajes del compuesto presente entre el rango de 6.2 y 7.2 minutos de 36.64% w/v, 58.57% w/v y 55.83% w/v respectivamente.

Una vez realizada la investigación se encontró que las diferencias existentes en cuanto a la cantidad de biomasa generada con respecto al tipo de sustrato utilizado, no fueron significativas, es decir, era irrelevante si se utilizaba glucosa o sacarosa como principal fuente de carbono para la fermentación del *P. cubensis*

en medio sumergido con el fin de obtener biomasa, sin embargo, se hallaron diferencias significativas con respecto a las diferentes concentraciones empleadas de dichas fuentes de carbono.

Al analizar las muestras mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), se determinó que el medio que contenía 50 g/L de glucosa era el deseado, debido a que fue en éste donde se presentaron picos más definidos, mostrando una mejor resolución del compuesto. Adicionalmente, presentó un buen crecimiento micelial.

Una vez elegido dicho criterio, se evaluó el efecto que tenía la adición de un aminoácido llamado Fenilalanina (F.A) al medio que contenía 50 g/L de glucosa, con el fin de determinar si éste tenía alguna incidencia positiva en la producción de biomasa y en la generación del alcaloide de interés; cabe resaltar que se utilizaron diferentes concentraciones de F.A correspondientes a 0.5 g/L; 1.0 g/L y 1.5 g/L. Finalizados dichos ensayos se obtuvieron valores de crecimiento de biomasa máxima de 1.06 g/L; 1.08 g/L y 1.01 g/L, y un porcentaje de área de 75.49% w/v, 62.36% w/v y 27.21% w/v respectivamente.

Es necesario hacer hincapié en que las diferencias obtenidas mediante el análisis estadístico entre cada una de las concentraciones de F.A con respecto a la generación de biomasa y la producción del compuesto, no fueron significativas, lo que llevó a elegir una concentración de 0.5 g/L de F.A, debido a que fue la menor cantidad utilizada de este compuesto durante la investigación, suponiéndose así, una disminución en los costos de materia prima.

Palabras claves:

Psilocybe cubensis, *Psilocibina*, Alcaloide, HPLC, Cultivo Sumergido, Fuentes de Carbono, Fenilalanina.

INTRODUCCIÓN

Los hongos son una rica fuente de productos naturales con una alta actividad biológica. Desafortunadamente, el cultivo de éstos en cuerpo fructífero, toma varios meses, disminuyendo su calidad, debido a los cambios climáticos y plagas; por tal razón, se implementó la metodología de medio sumergido, la cual es prometedora, gracias a una alta productividad de compuestos bioactivos (Arora, 1986).

El Género *Psilocybe* pertenece al Reino *Fungí*, con un Phylum *Basidiomycota*, una Clase *Homobasidiomycetes*, un Orden *Agaricales*, una Familia *Strofariaceae* (Paris y Hurabielle, 1981).

Dicho género es considerado de gran importancia a nivel mundial, debido a que su cuerpo fructífero y biomasa micelial contienen *Psilocibina*, la cual posee un alto valor para la industria farmacéutica, por su uso en la elaboración de productos antidepresivos. Este alcaloide, derivado de F.A, cuenta con una estructura muy similar al neurotransmisor segregado por el cerebro llamado serotonina; que controla el estado de ánimo, el sueño, el hígado y los riñones (Mandrile *et al.*, 1984); esta característica le otorga la gran importancia a la *Psilocibina* en el mercado, puesto que tiene un alto impacto en la sociedad como ayudante antidepresivo, debido a que no todas las personas segregan la cantidad necesaria (10 mg con límites que varían desde 5 a 20 mg) de serotonina (Mandrile *et al.*, 1984). Adicionalmente, se está empleando como una gran ayuda para la disminución de la adicción a sustancias como heroína y cocaína, gracias a que este alcaloide no genera dependencia (Lee *et al.*, 2004).

Debido a que su consumo puede generar alucinaciones, era consumido por las culturas aborígenes centroamericanas, con el fin de realizar manifestaciones

religiosas. Su uso se remonta a más de 3500 años y era nombrado por los aztecas como “Teonunalli” que significa “carne de dioses” (Mandrile *et al.*, 1984).

La alternativa que se utilizó durante esta investigación, fue el cultivo del *P. cubensis* mediante medio sumergido, debido principalmente a las notables ventajas frente a los sistemas convencionales que éste posee, entre las cuales se destacan la disminución del tiempo para la obtención de la biomasa (14 días) y la reducción de los costos de obtención (Lee *et al.*, 2004). De acuerdo a lo dimensionado anteriormente, este estudio estaba orientado primordialmente a la búsqueda de alternativas que permitieran la producción de biomasa de forma rápida y confiable.

Con el fin de llevar a cabo lo dicho anteriormente, se pretendió evaluar el efecto del uso de dos diferentes fuentes de carbono, en este caso glucosa y sacarosa, en el crecimiento micelial de la cepa *P. cubensis*.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto de la fuente de carbono en el crecimiento micelial de una cepa *Psilocybe* sp.

ESPECÍFICOS

- Evaluar la cinética de crecimiento de la cepa *Psilocybe cubensis* en los diferentes medios de cultivo sumergido mediante la cuantificación de biomasa por medio de la metodología de peso seco.
- Evaluar el consumo de sustrato para los diferentes ensayos por medio de técnicas espectrofotométricas.
- Determinar la presencia de *Psilocibina* mediante el uso del reactivo de Dragendorff.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 CONCEPTOS GENERALES DE HONGOS

Los hongos son organismos eucariotas, que no contienen clorofila; con nutrición por absorción, generalmente con reproducción sexual y asexual; el cuerpo consiste generalmente de filamentos ramificados con pared celular quitinosa (Miles y Chang, 1999).

Constituyen uno de los grupos de organismos más importantes para la vida del hombre, ya que son los responsables de gran parte de la descomposición de la materia orgánica aumentando su disponibilidad en el suelo; pueden ser comestibles, venenosos o psicotrópicos; muchos son patógenos; otros, producen ciertas sustancias beneficiosas o intervienen en procesos de elaboración de algunos comestibles (Miles y Chang, 1999).

1.1.1 Hongos laminares (*Agaricales*)

El orden Agaricales también conocido como Euagaricales es el mayor orden de setas y hongos que incluye más de la mitad de todas las especies conocidas de la clase *Homobasidiomycetes* (Hibbett *et al.*, 1997; Hibbett y Thorn, 2001). Más de 9000 especies y alrededor de 350 géneros se han atribuido a este orden, que contiene 26 familias (Kirk *et al.*, 2001). Un consenso de mayor nivel de clasificación de los Agaricales ha sido difícil de lograr, debido a la competencia de sistemas que restringen géneros y familias (o incluso orden) de diferentes maneras (Bas, 1998; Jülich, 1981; Kirk *et al.*, 2001; Kühner, 1980; Singer, 1986).

La base para la clasificación de los hongos fue construida por Fries (1874), quien hizo hincapié en las características macroscópicas, como la textura del tallo, la separación de los filamentos (laminas), presencia o ausencia de velo y color de las esporas.

Posteriormente, dividió los hongos Agaricales en varias especies de acuerdo al color de las esporas depositadas, las cuales pueden ser de color blanco, rosado, marrón, púrpura – marrón y negro. El sistema macroscópico de Fries, que reconoció inicialmente 12 géneros de hongos carnosos que forman los hongos, es taxonómicamente práctico. Éste fue relativamente invariable hasta que Fayod (1989) estudió la anatomía y las características microscópicas de muchos Agaricales, reconociendo 108 géneros (Arora, 1986).

Al igual que todas las setas, los hongos laminares son fábricas de esporas, creados con el único propósito de fabricar esporas microscópicas para dejarse llevar por las corrientes de aire y con suerte, caer en un lugar adecuado en la tierra para germinar y comenzar un nuevo organismo. Las probabilidades de que cualquier individuo que tiene esporas de este tipo tenga suerte, son tan bajas que el hongo produce millones de esporas para compensar esto. En las láminas se encuentran numerosas esporas, las cuales aumentan considerablemente el número de esporas que el hongo puede producir. Ambos lados de cada lámina está cubierta con esporas microscópicas (Kuo, 2007). A continuación se muestra de manera ilustrativa en la figura 1 las láminas que poseen los hongos Agaricales, en las cuales se da la formación de las esporas.



Figura 1. Hongo Agaricales (Laminar) (Kuo, 2007)

1.2 MEDIOS DE CULTIVO

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el *medio de cultivo* (García, 1995).

Para que los microorganismos crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial, éste debe reunir una serie de condiciones como lo son: temperatura, grado de humedad y presión; así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo contiene los nutrientes y factores de crecimiento necesarios para que el microorganismo se desarrolle correctamente y debe estar exento de cualquier tipo de microorganismo que pueda generar contaminación (García, 1995).

1.2.1 Tipos de medios de cultivo

En la actualidad existen diversos tipos de medio de cultivo, si se centra en la composición, éstos pueden ser *medios sintéticos* que contienen fuente de carbono, fuente de nitrógeno, sales que suplan los iones y demás elementos tales como estimuladores del crecimiento; *medios complejos* que contienen ingredientes tales como extracto de levadura, peptona, infusión de cerebro, etc., ricos en nutrientes; *medios de enriquecimiento*, siendo estos complejos con aditivos adicionales para favorecer así al crecimiento y desarrollo de determinados microorganismos; *medios selectivos*, los cuales son diseñados para favorecer el crecimiento específico de un microorganismo determinado o un grupo microbiano; *medios diferenciales* que proporcionan la distinción microbiana de una mezcla por sus propiedades diferenciales de crecimiento en dichos medios; *medios de mantenimiento*; siendo disímiles de los de crecimiento óptimo por el

crecimiento rápido y prolífico que deriva en la muerte rápida de las células (García, 1995).

Atendiendo a su estado, los medios de cultivo pueden presentarse como **medios sumergidos** y *medios sólidos* que contienen agar que gelifica por debajo de 45 °C y cuya concentración en su uso es de 1.5% y *medios semisólidos* que contiene un agar a una concentración de 0.7% (García, 1995).

1.2.1 Medio sumergido

Debido a que cultivar el cuerpo fructífero toma varios meses y se dificulta el control de calidad del producto final porque se está sujeto a los cambios permanentes del clima y las plagas; se ha empleado la metodología de medio sumergido, la cual es una alternativa muy prometedora para la producción eficiente del micelio y de los metabolitos (Lindequist y Niedermeyer, 2005).

Dicha forma es la mejor para producir, extraer y purificar metabolitos de un cultivo de hongo, ya que facilita una mayor producción de biomasa, en menor tiempo y de mayor calidad que el cultivo en medio sólido; además, facilita la dispersión y adaptación del hongo y reduce los vectores de contaminación. De igual forma, un cultivo de esta índole es la opción más viable si se quiere escalar procesos fermentativos en aras de desarrollar mercados, como en este caso, el de metabolitos medicinales (Navarro *et al.*, 1998).

A su vez, el uso de cultivo sumergido puede beneficiar la producción de muchos metabolitos secundarios y disminuir los costos de producción por reducir las labores que involucran los métodos de etapas sólidas (Domínguez y Webb, 2003). Los metabolitos bioactivos de los hongos pueden ser potencialmente producidos a nivel industrial mediante el uso de la metodología de cultivo sumergido, pero el

éxito a escala comercial depende del costo, comparado con la tecnología existente y la ventaja económica que la industria puede ver usando este método. El uso de la tecnología puede ser facilitada por el aumento en el rendimiento de la producción y el desarrollo del sistema (Hwang *et al.*, 2004).

El cultivo de hongos sumergidos se caracteriza por un aumento en la viscosidad del caldo con el tiempo, debido a uno o más factores tales como el aumento de la concentración de células, los cambios de la morfología del crecimiento o la producción de productos extracelulares que alteran el carácter reológico de la cultura del líquido. El aumento en la viscosidad puede ser visto como un fenómeno indeseable pero inevitable, ya que causan dificultades en el suministro de oxígeno, en la eliminación de dióxido de carbono y en posibles problemas de agitación (Hwang *et al.*, 2004).

1.3 ALCALOIDES

1.3.1 Generalidades

La diversidad estructural y la variedad en la actividad biológica, hacen de los alcaloides como también de los antibióticos, los grupos más importantes entre las sustancias naturales de interés terapéutico. (Paris y Hurabielle, 1981).

Se han aislado principalmente en plantas superiores y se han encontrado en más de 100 familias de Fanerógamas (aquellas plantas que se reproducen por semillas producidas en sus inflorescencias). Su actividad biológica a nivel del sistema nervioso, dio pie a las primeras investigaciones, siendo los alcaloides las primeras sustancias naturales estudiadas (Paris y Hurabielle, 1981).

El término alcaloide, propuesto por el farmacéutico W. Meissner en 1819; se aplicó a los compuestos de origen vegetal con propiedades alcalinas; este carácter básico es debido a la presencia de nitrógeno amínico en su estructura. Los

alcaloides se pueden considerar como: “Un compuesto orgánico de origen natural, nitrogenado, derivados generalmente de aminoácidos, más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación” (Paris y Hurabielle, 1981).

1.3.2 Propiedades fisicoquímicas

Los alcaloides tienen masas moleculares que varían entre 100 y 9000 g/mol; son casi siempre incoloros; son normalmente sólidos a temperatura ambiente a excepción de los alcaloides no oxigenados. Los alcaloides son poco solubles en agua gracias a su carácter básico; dicho carácter se debe al par de electrones libres del nitrógeno (Paris y Hurabielle, 1981).

En la naturaleza se encuentran en forma de sales, generalmente. En las plantas se consideraba que eran productos obtenidos durante la extracción y poco solubles en disolventes típicos de extracción por su polaridad. Son solubles en disolventes orgánicos como cloroformo, etanol, metanol, acetato de etilo, éter, benceno. En forma de sales son solubles en agua excepto las sales de berberina (Paris y Hurabielle, 1981).

Todos los alcaloides son activos a la luz polarizada, Presentan una fluorescencia característica bajo la luz U.V o IR, dando lugar a espectros característicos (Paris y Hurabielle, 1981).

1.3.3 Reconocimiento de los alcaloides

Las técnicas de reconocimiento son basadas en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio, tungsteno, formando precipitados, se

utilizan reactivos generales para detectar alcaloides como: reactivo de Wagner, reactivo de Mayer, reactivo de **Dragendorff**, reactivo de Hager, reactivo de Bertrand, reactivo de Ehrlich y reactivo de Vitali-Morin (Paris y Hurabielle, 1981).

1.3.4 Clasificación de los alcaloides

Habitualmente los alcaloides se han clasificado en función de su estructura, distinguiéndose principalmente los compuestos heterocíclicos de los no heterocíclicos. Actualmente existen varias formas de clasificarlos (Bruneton, 1987), entre ellas se pueden distinguir:

1.3.4.1 Alcaloides alifáticos

- a. Derivados de la ornitina (pirrolidinas, tropánicos, pirrolizidínicos)
- b. Derivados de la lisina (piperidinas, quinolizidínicos)

1.3.4.2 Alcaloides de origen diverso

- a. Alcaloides terpénicos y esteroidales
- b. Alcaloides diversos (purinas, macrociclos, etc.)

1.3.4.3 Alcaloides aromáticos

- a. Derivados del ácido nicotínico (piridinas)
- b. Derivados de la fenilalanina y tirosina (isoquinoleinas)
- c. Derivados del **triptofano** (indólicos, quinoleinas)
- d. Derivados de la histidina (imidazoles)

- **Alcaloides derivados del triptofano (Alcaloides Indólicos)**

Desde el punto de vista farmacológico ha habido mucho interés sobre las bases que contienen el núcleo indólico a raíz del descubrimiento de la actividad alucinógena del LSD, así como la actividad sedante de la reserpina aislada del género *Rauwolfia*. El auge del estudio fitoquímico ocurrió en la década de los 60 y se dirigía principalmente a la familia Apocynaceae (Mercano y Hasegawa, 1991).

Existen unos 800 alcaloides de este tipo, distribuidos principalmente en la familia Apocynaceae, (géneros *Rauwolfia*, *Aspidos-perma*, *Strychnos* y *Vinca*), menos frecuentes en hongos y familias como *Leguminoseae*, *Malphiaceae*, *Rubiaceae* y *Rutaceae* donde los alcaloides presentan el grupo indólico sencillo (Mercano y Hasegawa, 1991).

El triptofano es el precursor de estos alcaloides, los cuales se clasifican en triptaminas y en no triptaminas; las triptaminas a su vez, se subdividen en β -carbolinas y en indoleninas y pueden ser **triptaminas simples** o triptaminas complejas y estas pueden ser isoprénicas o no isoprénicas (Mercano y Hasegawa, 1991). La figura 2 muestra la estructura química del triptofano, triptamina y sus divisiones.

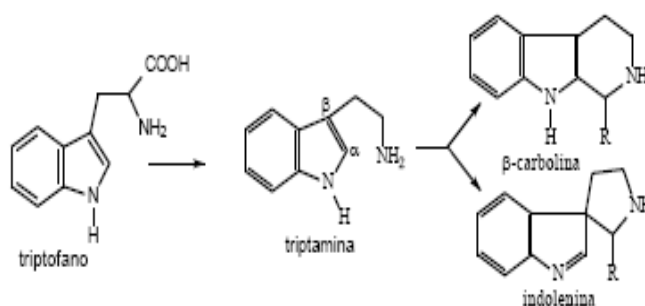


Figura 2. Alcaloides derivados del Triptofano (Mercano y Hasegawa, 1991).

- **Triptaminas simples**

Las triptaminas simples juegan un importante papel en la cultura indígena de América por sus efectos alucinógenos y extáticos en sus ceremonias mágico religiosas (Furst, 1994). Se han encontrado en hongos alucinógenos de Mesoamérica del género *Psilocybe*, *Stropharia* y *Conocybe* (“teonacatl” o “carne de los dioses”) usados por los indios Aztecas en sus ceremonias religiosas desde hace más de 1700 años. Se han encontrado en estos hongos los alcaloides alucinógenos, la *Psilocina* y la *Psilocibina* que al ingerirlos produce diferentes sensaciones auditivas y visuales, relajación muscular, depresiones y euforias alternadas (Mercano y Hasegawa, 1991).

La serotonina que juega un importante papel en la actividad neuronal, se encuentra también en vegetales. Se ha aislado en el pericarpio del banano, el cual seco, cuando es fumado, actúa como un alucinógeno ligero (Seigler, 1981).

De las glándulas parótidas del sapo común *Bufo vulgaris* se aísla la bufotenina derivado N-dimetilado de la serotonina que también es el principio activo del Yopó, polvo de las semillas de *Anadenanthera peregrina* (*Piptadenia peregrina*) Leguminosae y especies del género *Virola* (*Myristicaceae*) que contiene también triptaminas; son mezclados con cenizas e inhalados por medio de tubos de bambú por los indígenas del Orinoco en ceremonias mágico religiosas produciendo alucinación e incoordinación motriz (Seigler, 1981).

En la figura 3 se observan las estructuras de aquellos compuestos que están clasificados como triptaminas simples.

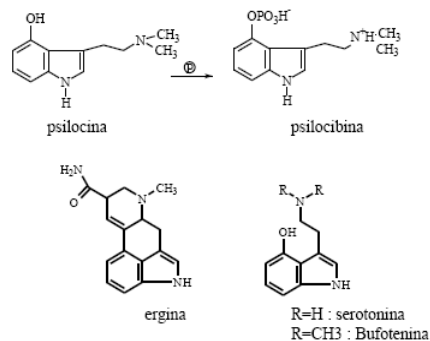


Figura 3. Triptaminas simples (Seigler, 1981)

1.3 PSILOCIBINA Y PSILOCINA

La *Psilocibina* y la *Psilocina*, son biológicamente sintetizadas en los hongos pertenecientes a los géneros de *Psilocybe* (Bigwood y Beug, 1982; Wurst *et al.*, 1984).

La *Psilocibina* y la *Psilocina* se han identificado en todo el mundo en una variedad de setas, que son llamados "hongos mágicos". La ingestión de pequeñas cantidades de alucinógenos provoca el éxtasis. La actividad alucinógena de la *Psilocibina* es relativamente más baja que la de la *Psilocina*. Sin embargo, la *Psilocibina* se convierte fácilmente en *Psilocina* (componente activo principal) en los sistemas biológicos. Así, el desarrollo de un método de determinación de la *Psilocibina* es importante, lo misma que la de la *Psilocina* (Kimie *et al.*, 2005).

La hidrólisis de la *Psilocibina* se consigue saturando con anhídrido carbónico una solución acuosa de *Psilocibina* (para eliminar el oxígeno del aire y calentándola) obteniendo así una molécula de 4hidroxi-dimetiltryptamina y una molécula de ácido fosfórico (Mandrile *et al.*, 1984).

Como todos los fármacos derivados del indol, estas sustancias han despertado interés porque se sospechó la posibilidad de que algunas de ellas se formen en el

organismo y que en ciertas psicosis, especialmente en la esquizofrenia, se produzcan elevados niveles sanguíneos que ocasionan algunos de los síntomas (Mandrile *et al.*, 1984).

La figura 4 muestra la estructura química de alcaloides como la *Psilocibina* y *Psilocina*.

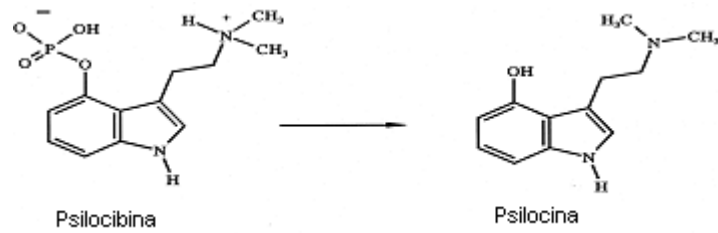


Figura 4. *Psilocibina* y *Psilocina* (Mandrile *et al.*, 1984)

1.3.1 Antecedentes acerca de la obtención de *Psilocibina* y *Psilocina*

Una gran variedad de métodos cromatográficos para la determinación de *Psilocibina* y *Psilocina* presentes en las incautaciones de hongos se han publicado. La cromatografía de capa fina, es utilizada debido a que ésta es muy apropiada para la detección de sustancias derivadas del triptofano (Brown *et al.*, 1972; Tanimukai, 1967; Beug y Bigwood, 1981). Aun así, métodos que involucran tanto la cromatografía de alta eficiencia (HPLC), como la detección fotométrica de U.V (Beug y Bigwood, 1981; Wurst *et al.*, 1984; Borner y Brenneisen, 1987; Perkal *et al.*, 1980; Vanhaelen-Faestré y Vanhaelen, 1984; Thomson, 1980; White, 1979; Sottolano y Lurie, 1983) fueron establecidas y optimizadas para la cuantificación de *Psilocibina*.

Durante los últimos años se han venido utilizando diferentes tipos de columna y fase móvil, con el fin de obtener la mayor cantidad posible de la sustancia de interés (*Psilocibina*).

En el año 1981, en el instituto farmacéutico de la Universidad de Oslo, realizaron una investigación con una columna de sílice, con una fase móvil de metanol-nitrato de amonio, en donde no sólo se logró obtener *Psilocibina* y *Psilocina*, sino también un nuevo producto conocido como beocistín. Se logró un porcentaje de separación máxima de 75% w/w (Christiansen *et al.*, 1981).

Asimismo, en el año 1984, en el instituto de microbiología de Amsterdam, se realizó un estudio con una columna C18 de sílice y una fase móvil de agua-etanol-ácido acético, de forma isocrática en donde se obtuvo un porcentaje 0.25%-1.15% y 0.02-0.16% de *Psilocibina* y *Psilocina*, respectivamente en el hongo (Wurst, 1984).

De igual manera, en el año 2003, en el instituto de ciencia policiaca, en Japón, se ejecutó la cromatografía de alta eficiencia, utilizando una columna C18, con una fase móvil de ácido fórmico, de forma isocrática y un detector de 220 nm; un rango de porcentaje de *Psilocibina* 0.14-0.42 % w/v en la capa, mientras un 0.09-0.3 %w/v en el tallo (Tsujikawa *et al.*, 2003).

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LOCALIZACIÓN

Las fermentaciones, la medición del crecimiento micelial y la cuantificación del consumo del sustrato y de proteína, se llevaron a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT; mientras que los análisis de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), se realizaron en el laboratorio de Química Instrumental de dicha Universidad.

2.2 MICROORGANISMO DE ESTUDIO

La cepa del hongo *Psilocybe cubensis* (EAH01) con la cual se trabajó, fue donada por José Rodrigo Moreno, Ingeniero del laboratorio de la Universidad Católica de Oriente (UCO). La EAH01 permanece aún en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT.

Dicha cepa se cultivó en una caja Petri que contenía Agar Extracto de Malta (MEA) y se incubó a 30°C en una incubadora digital del laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT. La figura 5 representa una cepa de *P. cubensis* cultivada en medio sólido MEA.



Figura 5. *Psilocybe cubensis* (EAH01) cultivada en medio sólido Agar Malta

2.3 COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO (FANG-ZHONG)

El medio sumergido utilizado para llevar a cabo las diferentes fermentaciones de *P. cubensis* fue el descrito por Fang-Zhong (2002). La tabla 1 muestra los componentes de dicho medio y la concentración de cada uno de ellos. Se destaca que las fuentes de carbono utilizadas fueron glucosa y sacarosa, usándolas cada una por separado para cada experimento y haciendo variaciones de concentraciones de las mismas para los distintos ensayos.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo sumergido para evaluar el crecimiento micelial del *P. cubensis*

Componentes	Cantidad (g/L)
Fuente de Carbono	30 – 50 - 70
Peptona	5
Extracto de levadura	5
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
Vitamina B1	0.05

2.4 PREPARACIÓN DE LOS DIFERENTES PREINÓCULOS DE *P. cubensis* EMPLEADOS PARA LAS FERMENTACIONES SUMERGIDAS

Con el propósito de llevar a cabo cada uno de los ensayos, fue necesario realizar la preparación de un preinóculo; ésto con el fin de realizar un proceso de adaptación del *P. cubensis* al medio, favoreciendo la disminución en cuanto a tiempo (preferiblemente la eliminación de la aparición de un fase de latencia una vez comenzada la fermentación).

La preparación de cada uno de los preinóculos se realizó en 6 erlenmeyers de 1000 mL con 200 mL de medio cada uno, los cuales fueron esterilizados a 120°C por 15 minutos e inoculados con 4 discos de 5 mm aproximadamente de *P.*

cubensis, provenientes de la cepa previamente activada en Agar Malta durante 6 días. Los erlenmeyers se llevaron a un agitador orbital por 6 días a 30°C y 100 rpm.

2.5 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y LOS INÓCULOS DE *P. cubensis* UTILIZADOS PARA LAS FERMENTACIONES SUMERGIDAS

Una vez realizado el preinóculo, se procedió a preparar los medios de cultivo utilizados para realizar los distintos experimentos de la siguiente manera: se prepararon medios que diferían en la fuente de carbono (glucosa o sacarosa) y en la concentración de la misma (30 g/L, 50 g/L y 70 g/L); teniendo así un total de seis fermentaciones. Las demás cantidades de los componentes del medio de Fang-Zhong fueron las mismas que las usadas en el preinóculo descritas en la Tabla 1.

En primer lugar, se llevaron a cabo las tres fermentaciones de glucosa, preparando un total de 90 erlenmeyers (30 por cada concentración de azúcar, por duplicado); cada uno de los frascos contenía 50 mL del medio en erlenmeyers de 250 mL e inoculados con 0.1 g de peso húmedo del preinóculo, aproximadamente. Los 90 frascos se llevaron durante 14 días a un agitador orbital a 100 rpm con una temperatura de 30 °C.

Posteriormente, se llevaron a cabo las tres fermentaciones de sacarosa, siguiendo el mismo proceso descrito anteriormente para la glucosa.

Una vez terminadas las fermentaciones de glucosa y sacarosa y realizados todos los análisis correspondientes (generación de biomasa, consumo de sustrato, consumo de proteína y evaluación de la presencia de *Psilocibina* por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)), se procedió a elegir la fuente de carbono y concentración que mejores resultados arrojó tanto para la generación

de biomasa, como para la producción del alcaloide, con el fin de evaluarla nuevamente, adicionándole un precursor (F.A).

Para finalizar, se procedió a preparar los medios con la fuente de carbono y la concentración de la misma que arrojó mejores resultados, es decir, los ensayos realizados con una concentración de 50 g/L de glucosa; adicionándole al medio F.A a diferentes concentraciones, correspondiente a valores de 0.5 g/L, 1.0 g/L y 1.5 g/L, las demás cantidades de los componentes remanentes del medio fueron las mismas que las descritas anteriormente en la tabla 1.

2.6 CUANTIFICACIÓN DEL CRECIMIENTO DE BIOMASA MEDIANTE LOS MÉTODOS DE PESO HÚMEDO Y PESO SECO PARA CULTIVO SUMERGIDO DE *P. cubensis*

La cuantificación de biomasa para cada uno de los tratamientos se realizó usando la metodología de peso húmedo y peso seco. Para la cuantificación de biomasa mediante el método de peso húmedo se tomaron dos muestras provenientes de cada erlenmeyer cada 24 horas, las cuales fueron filtradas y pesadas con el fin de obtener el valor de peso húmedo para cada tratamiento del *P. cubensis*. Posteriormente, la biomasa retenida en el papel filtro fue llevada a un secador que se encontraba a una temperatura de 50°C durante 24 horas; transcurrido el tiempo, la biomasa seca fue pesada con el fin de obtener datos de peso seco. Durante los 14 días de la fermentación se obtuvieron datos de peso húmedo y peso seco por duplicado para cada una de las fermentaciones.

2.7 AJUSTE DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *P. cubensis* AL MODELO CINÉTICO LOGÍSTICO

Una vez realizada la recolección de muestras para cada uno de los ensayos y su posterior análisis; se decidió modelar dichos datos mediante el modelo logístico

(ecuación 1), el cual permite obtener variables cinéticas tales como la cantidad de biomasa inicial (X_0) y la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) para cada uno de los tratamientos.

Se decidió emplear el modelo logístico ya que éste muestra resultados más reales cuando se cultivan hongos, debido a que su morfología es muy diferente a otros microorganismos (pellets) dificultando la transferencia de masa (Bailey *et al.*, 1986).

Una vez linealizada la ecuación que describe dicho modelos se llega a la siguiente expresión:

$$\ln\left(\frac{X_{max}}{X} - 1\right) = -\mu_{max} * Tiempo + \ln\left(\frac{X_{max}}{X_0} - 1\right)$$

Ecuación 1. Ecuación linealizada del modelo logístico

Posterior a la linealización de la ecuación, se procedió a graficar $\ln((X_{m\acute{a}x}/X)-1)$ vs. tiempo, con el fin de obtener como pendiente la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) y como intercepto el $\ln((X_{m\acute{a}x}/X_0)-1)$ el cual permitió la obtención de la concentración inicial de biomasa.

Obteniéndose así los parámetros cinéticos para cada ensayo correspondientes a μ_{max} y X_0

Se debe definir la concentración máxima de biomasa ($X_{m\acute{a}x}$) para poder hallar los parámetros cinéticos mediante dicho modelo; cabe aclarar que dicho valor se toma de los resultados de biomasa adquiridos para cada uno de los ensayos mediante la metodología de peso seco; este valor varía para cada fermentación.

Una vez ajustados los datos de cada tratamiento al modelo logístico, se procedió a calcular de manera teórica los valores de X (biomasa) que varía con el tiempo,

teniendo en cuenta los parámetros cinéticos arrojados mediante el modelo logístico utilizando la siguiente ecuación:

$$x = \frac{X_o * X_m * e^{\mu m * t}}{X_m - X_o + X_o * e^{\mu m * t}}$$

Ecuación 2. Valores teóricos de biomasa en el tiempo

Estos valores de X teóricos obtenidos mediante la fórmula anterior se grafican con respecto a los valores de X obtenidos de manera experimental, con el fin de observar el ajuste del modelo logístico a cada uno de los datos experimentales.

2.8 EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE SUSTRATO Y DEL CONSUMO DE PROTEÍNA POR PARTE DEL *P. cubensis* CULTIVADO EN MEDIO SUMERGIDO

Con el fin de evaluar el consumo de sustrato y proteína por parte del *P. cubensis* durante las fermentaciones que contenían glucosa en el medio, se recolectaron muestras cada 24 horas del líquido obtenido después de realizada la filtración de la muestra que se utilizó para efectos de cálculo de peso seo, dicho líquido denominado sobrenadante fue almacenado a -4 °C. Finalizadas cada una de las fermentaciones, se procedió a realizar el protocolo para evaluar el consumo de sustrato para cada medio (Miller, 1959) mediante el método de DNS (Ácido Dinitrosalicílico) (Anexo 13) y el consumo de proteínas mediante el método de LOWRY para cada fermentación (Anexo 15).

Para llevar a cabo la cuantificación de sustrato y proteína en los distintos ensayos fue necesario realizar las curvas de calibración correspondientes, dichas curvas con sus respectivos valores de concentración se muestran en los anexos 14 y 16.

2.9 MÉTODO CUALITATIVO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE ALCALOIDES (*PSILOCIBINA*) MEDIANTE EL USO DEL REACTIVO DE DRAGENDORFF

Como se mencionó anteriormente, el reactivo de Dragendorff es usado para determinar de manera cualitativa la ausencia o presencia de alcaloides en una muestra determinada. Para llevar a cabo dicha prueba se recolectaron muestras de la biomasa seca correspondientes a los días 12, 13 y 14 de cada fermentación, las cuales fueron almacenadas a -4°C.

Para determinar la presencia de *Psilocibina*, se realizó el proceso descrito según Musshoff *et al.*, (2000), el cual consistió en macerar cada una de las muestras de biomasa hasta obtener un polvo fino; luego, se pesaron 10 mg de dicho polvo y a esta cantidad se le agregó 1 mL de metanol. Posteriormente, una pequeña cantidad de esta mezcla se esparció en un papel filtro en donde se le adicionó una gota del reactivo de Dragendorff.

Una vez realizada la prueba, se dice que la muestra contiene presencia de alcaloides si ésta presenta una coloración rojizo-amarilla.

2.10 MÉTODO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE *PSILOCIBINA* MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

Una vez evaluada la presencia del alcaloide mediante el reactivo de Dragendorff, se procedió a determinar mediante el uso de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), la presencia de los alcaloides en la mezcla con sus respectivos tiempos de retención; para llevar a cabo la extracción de la *Psilocibina*, se siguió el método descrito por Musshoff, *et al.*, (2000). Para ello, la muestra de biomasa seca fue macera en un mortero hasta convertirla en un polvo fino. Diez miligramos

de la muestra en polvo se extrajeron dos veces con 1 mL de metanol en un baño de ultrasonido durante 30 minutos. Posterior a ésto, se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante 2 minutos; el sobrenadante se depositó en un vial independiente.

El sobrenadante fue evaporado hasta sequedad bajo una corriente de nitrógeno gaseoso. Una parte de los residuos se disolvió en 200 µL de la fase móvil que contiene HCOONH₄ con una concentración 10 µM y un pH de 3.5.

El equipo utilizado para realizar todos los análisis correspondientes a HPLC cuenta con las siguientes características: equipo Agilent Technologies que consta de una columna C18, de 46 mm * 250 mm * 5 mm, con una fase móvil de HCOONH₄ con un flujo de 1 mL/minuto; un detector UV de 214 nm y una inyección de 20 µL y una temperatura de 25°C. El experimento se corrió de modo isocrático con una fase móvil de agua 70 y HCOONH₄ de 30.

2.11 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA RESOLUCIÓN DEL ALCALOIDE DE INTERÉS PARA LOS DIFERENTES ENSAYOS

Con el fin de determinar de manera cualitativa cuál de los cromatogramas arrojados mediante la técnica de HPLC presentó mejor resolución del alcaloide, fue necesario realizar un supuesto acerca del tiempo de retención de la *Psilocibina* durante la cromatografía; puesto que a pesar de haber contado con un cromatograma (Tsujikawa *et al.*, 2003) (Anexo 18) y haber trabajado en las mismas condiciones de éste, no se utilizó la misma fase móvil, lo que pudo generar variaciones en dicho tiempo. Se asumió que el tiempo de retención varió entre 6.2 y 7.2 minutos; es decir, entre este tiempo se encontró el pico de interés de la investigación.

La elección del criterio de pureza del compuesto de interés, se realizó observando cuál de los picos obtenidos muestra menor ruido, es decir, que a su alrededor no tenga presencia de otros compuestos (Anexos 19, 20 y 21).

2.12 DETERMINACIÓN PORCENTUAL DE COMPUESTOS PARA LOS DIFERENTES ENSAYOS

La cuantificación de los compuestos se hizo mediante un porcentaje de área bajo la curva debido a que no se contó con un estándar interno.

Para realizar dicho porcentaje se obtuvo la totalidad de las áreas presentes en el perfil cromatográfico obtenido para las muestras de los días 12, 13 y 14 de cada fermentación y el porcentaje del área del metabolito de interés, la cual oscilaba entre un tiempo de retención entre 6.2 y 7.2 minutos.

En el momento de analizar los cromatogramas y de elegir el medio que mejor resultados arrojó en cuanto a la producción de alcaloide, se observó la resolución del metabolito en cada una de las fermentaciones.

2.13 CULTIVO SUMERGIDO DE *P. cubensis* EN PRESENCIA DE F.A.

Después de haber elegido la fuente de carbono (glucosa) y su respectiva concentración (50 g/L) que mejores resultados arrojaron durante la investigación, se realizaron nuevamente fermentaciones del *P. cubensis* en medio sumergido (Fang-Zhong); donde la diferencia de estos medios con respecto a los anteriormente utilizados, radicó en la presencia de F.A, aminoácido.

Para dichas fermentaciones se contó con tres concentraciones diferentes de F.A (0.5 g/L, 1 g/L, 1.5 g/L) realizadas por duplicado, adicionalmente se montó

simultáneamente con dichos ensayos las muestras correspondientes a los últimos tres días de fermentación sin F.A en el medio, para efectos de comparación y así poder llevar a cabo un análisis estadístico apropiado.

Los datos obtenidos fueron analizados por medio de una ANOVA con el fin de observar si existían o no diferencias significativas en cuanto al crecimiento micelial (concentración de biomasa) del *P. cubensis* y así poder determinar el medio que mejores resultados arrojó durante la investigación.

2.14 DISEÑO DE EXPERIMENTOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño estadístico utilizado para realizar los análisis correspondientes a las diferentes fermentaciones es un diseño factorial 2^3 . Este estudio se basó en dos factores que fueron las dos fuentes de carbono (glucosa y sacarosa); a su vez, se apoyó en tres niveles que fueron la variación en la concentración de las mismas (30 g/L, 50 g/L y 70 g/L). De igual manera, se fundamentó en dos variables de respuesta, el crecimiento micelial de *P. cubensis* y el porcentaje de *Psilocibina* presente en el microorganismo.

Por medio del *Software Statgraphics plus 5.1* se realizó un análisis estadístico basado en una ANOVA factorial. Con ello, se pretendió comparar estadísticamente los resultados de crecimiento micelial de biomasa (concentración) y producción de *Psilocibina* para cada uno de los medios durante los 14 días de fermentación y en especial en los últimos tres días de la misma; puesto que durante este período fue evaluada la presencia del alcaloide.

Es necesario hacer hincapié que para realizar dicha estadística, fue necesario ejecutar un estudio de normalidad, el cual se comprobó utilizando la gráfica de probabilidad normal; a su vez, se requirió un análisis de igualdad de varianzas por medio de una gráfica de residuos Vs previsto, con el fin de ver visualmente la

hipótesis de la homocedasticidad; todo ello con el fin de garantizar que la investigación se comportó de forma *normal*. Adicionalmente, se contó con una hipótesis nula (H_0) y una Hipótesis alterna (H_a), las cuales permitieron realizar las conclusiones respectivas. A continuación se enunciarán cada una de éstas y los parámetros necesarios para dicho estudio.

- **H_0 :** Todas las medias son iguales, es decir, no existen diferencias significativas entre los datos analizados.
- **H_a :** Alguna de las medias es diferente, lo que quiere decir que sí existen diferencias significativas.

- **Parámetro:**

$P_{\text{valor}} > 0.05$ \longrightarrow Se acepta H_0

$P_{\text{valor}} \leq 0.05$ \longrightarrow Se rechaza H_0

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICELIAL DE *P. cubensis* EN CULTIVO SUMERGIDO (FANG-ZHONG) UTILIZANDO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

Con el propósito de evaluar el crecimiento micelial del *P. cubensis* en medio sumergido durante los 14 días de la fermentación, se recurrió al uso de metodologías conocidas como peso húmedo y peso seco, en dicho trabajo sólo se exponen los datos arrojados por el método de peso seco.

A continuación se presentan cada una de las fermentaciones de acuerdo al tipo de sustrato empleado en las mismas, los respectivos valores de peso seco obtenidos y los análisis pertinentes para cada uno de los casos.

3.1.1 Crecimiento micelial de *P. cubensis* en medio sumergido utilizando diferentes concentraciones de glucosa

Inicialmente se evaluaron tres concentraciones de glucosa en el cultivo de *P. cubensis* en medio sumergido (Fang-Zhong) correspondientes a 30 g/L, 50 g/L y 70 g/L, siendo en este caso la glucosa la principal fuente de carbono del *P. cubensis*.

A continuación se muestran los valores de peso seco obtenidos para cada una de las concentraciones de glucosa utilizadas, durante los 14 días de la fermentación.

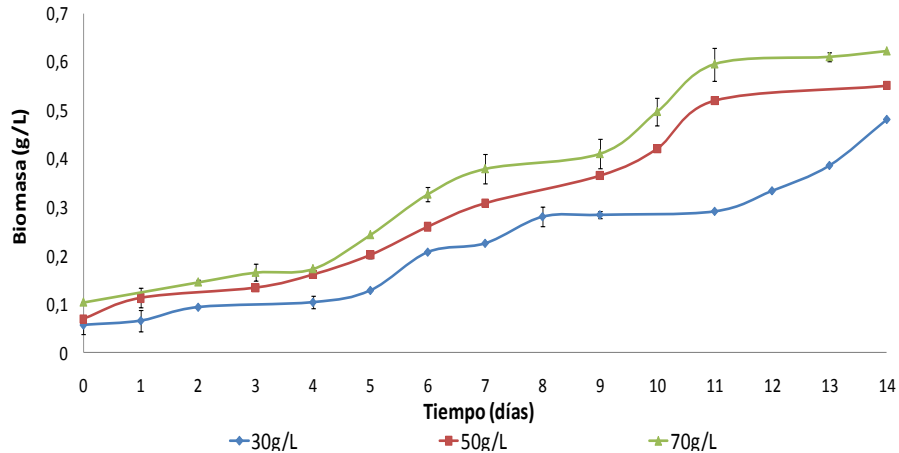


Gráfico 1. Cinética de crecimiento micelial de *P. cubensis* en medio sumergido (Fang-Zhong) utilizando tres diferentes concentraciones de glucosa como fuente de carbono (Peso seco)

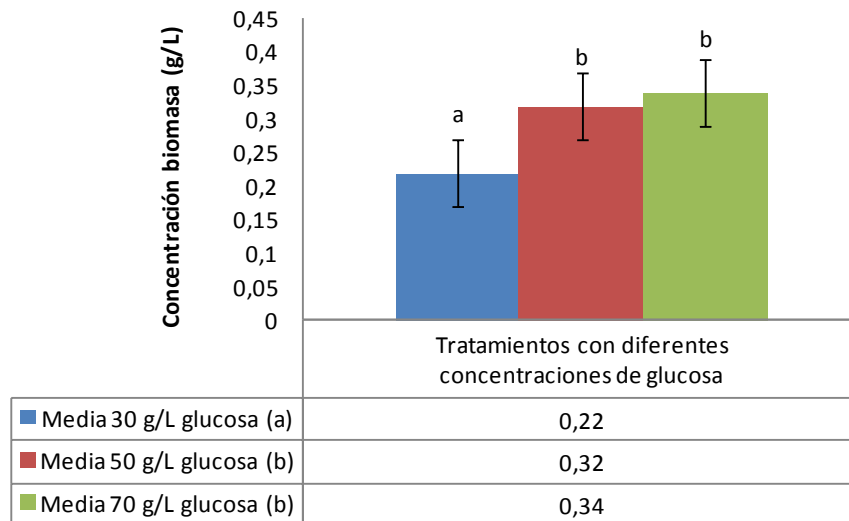
Del gráfico 1 se puede observar que no hubo evidencia de fase de latencia para ninguno de los ensayos, posteriormente se aprecia que el crecimiento de biomasa aumentó con el tiempo para las diferentes concentraciones de glucosa empleadas.

Analizando las fermentaciones que contenían 50 g/L y 70 g/L de glucosa, se puede afirmar que ambas presentan un comportamiento similar, mostrando una fase exponencial hasta el día 11 y una fase estacionaria hasta el día 14 de la fermentación, mientras que la fermentación que contenía 30 g/L de glucosa no presentó fase estacionaria, la fermentación durante los 14 días se encontraba en fase exponencial, a pesar de que entre los días 8 y 11 el crecimiento de *P. cubensis* se mantuvo constante.

Asimismo, se puede observar que el crecimiento más bajo, en cuanto a concentración de biomasa, se generó en la concentración de 30 g/L siendo éste de 0.48 g/L, mientras que en las concentraciones de 50 g/L y 70 g/L de glucosa, los crecimientos máximos fueron muy similares: 0.55 g/L y 0.62 g/L respectivamente.

Lo dicho anteriormente se ratifica una vez analizados los resultados obtenidos estadísticamente, donde se obtuvo un *P-valor* igual a cero, indicando que existen diferencias significativas en cuanto al crecimiento micelial de biomasa (concentración de biomasa durante los 14 días de la fermentación). El gráfico 2 ilustra la presencia de dos grupos homogéneos; lo que indica que las concentraciones de 50 g/L y 70 g/L no tienen diferencias significativas del crecimiento micelial entre cada una de ellas; mientras que la concentración de 30 g/L sí presenta dichas diferencias significativas con respecto a las dos concentraciones anteriores. (Anexo 1).

Con todo ésto, se expone que la concentración de glucosa de 50 g/L es la que se eligió debido a que es más económico utilizar 50 g/L de glucosa que 70 g/L.



Letras diferentes denotan diferencias significativas (prueba LSD)

Gráfico 2. Crecimiento micelial de *P. cubensis* en cultivo sumergido bajo tres concentraciones de glucosa

- **Modelo logístico para las fermentaciones donde se utilizó glucosa como fuente de carbono**

Una vez realizada la cinética de crecimiento del *P. cubensis* en medio sumergido (Fang-Zhong) usando diferentes concentraciones de glucosa, se procedió a ajustar los datos obtenidos al modelo logístico. Los crecimientos máximos de biomasa obtenidos mediante el método de peso seco para cada uno de los ensayos, fueron: 0.48 g/L, 0.65 g/L y 0.62 g/L para concentraciones de 30 g/L, 50 g/L y 70 g/L de glucosa respectivamente. La tabla 2 muestra los parámetros cinéticos obtenidos mediante el modelo para cada una de las concentraciones.

Tabla 2. Parámetros cinéticos obtenidos mediante el modelo logístico para las diferentes fermentaciones de *P. cubensis* utilizando glucosa como fuente de carbono

30g/L		50g/L		70g/L	
μ_x (día ⁻¹)	0,16	μ_x (día ⁻¹)	0,17	μ_x (día ⁻¹)	0,15
μ_{max} (día ⁻¹)	0,27	μ_{max} (día ⁻¹)	0,35	μ_{max} (día ⁻¹)	0,34
X_0 (g/L)	0,05	X_0 (g/L)	0,08	X_0 (g/L)	0,08
R^2	0,96	R^2	0,92	R^2	0,85

De la tabla 2 se puede observar que la concentración inicial de biomasa (X_0), estuvo muy cercana para cada una de las concentraciones de glucosa utilizadas.

Para 30 g/L de glucosa la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) fue mucho menor que la obtenida para 50 g/L y 70 g/L; ésto pudo ser debido a que fue el medio que menor cantidad de glucosa contenía; mientras que para las otras dos concentraciones de glucosa, la velocidad máxima de crecimiento fue similar.

Al comparar las velocidades máximas de las tres concentraciones de glucosa utilizadas, se evidencia que la fermentación que contenía 50 g/L presentó una μ_{max} mayor correspondiente a 0.35 día⁻¹, esto sugiere que a mayores concentración de glucosa (70 g/L) puede ocurrir una inhibición por sustrato; otro

criterio que afirma que dicha concentración fue la que mejores resultados arrojó de las tres concentraciones de glucosa utilizadas para el crecimiento del *P. cubensis* en el medio de Fang-Zhong. Además se observa que este experimento fue el que mayor velocidad específica de crecimiento presentó siendo esta de 0.17 día^{-1} .

Finalmente, se calcularon los valores de biomasa teóricos utilizando la ecuación descrita anteriormente en la metodología, con el propósito de observar que tanto se ajustaron los valores de biomasa hallados experimentalmente con los valores de biomasa teóricos arrojados por el modelo logístico. El gráfico 3 muestra los valores de biomasa (X) tanto teóricos como experimentales con respecto al tiempo.

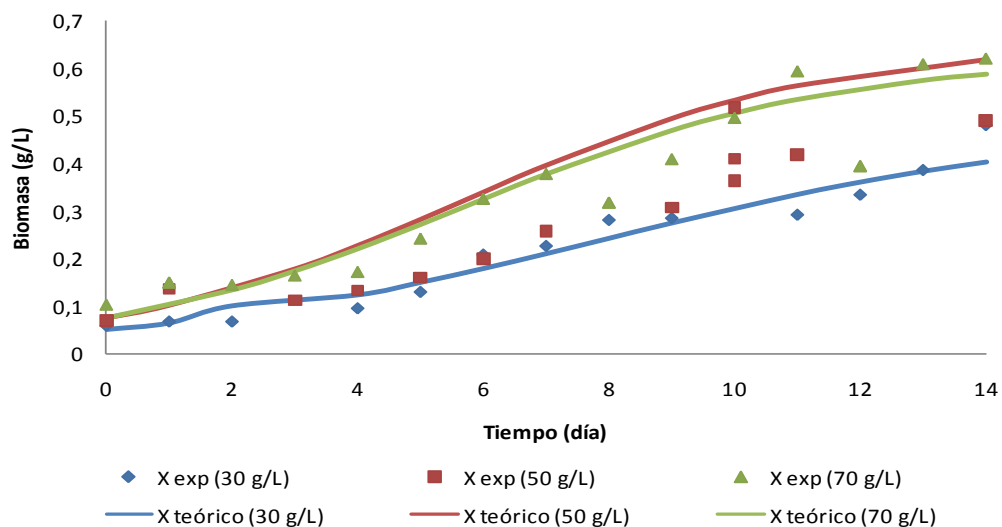


Gráfico 3. Valores de concentración de biomasa experimental y teórico graficados con respecto al tiempo para las fermentaciones con diferentes concentraciones de glucosa

Al observar el gráfico 3 se puede notar que para los ensayos de 50 g/L y 70 g/L de glucosa, los valores de biomasa teóricos se encuentran un poco desfasados de los valores de biomasa hallados de manera experimental; mientras que para el ensayo que contenía 30 g/L de glucosa se observa un buen ajuste de los datos

obtenidos experimentalmente al modelo logístico. La tabla 2 reitera lo dicho anteriormente, al exponer los valores de R^2 , los cuales explican la relación que tienen los datos teóricos con los experimentales.

3.1.2 Crecimiento micelial del *P. cubensis* en medio sumergido utilizando diferentes concentraciones de sacarosa.

Una vez evaluado el crecimiento de biomasa usando glucosa como fuente de carbono, se procedió a evaluar el efecto que tenía el cambio de la fuente de carbono por sacarosa en el crecimiento micelial del *P. cubensis* en medio sumergido.

El gráfico 4 muestra de manera ilustrativa como fue el crecimiento micelial del *P. cubensis* para cada una de las concentraciones de sacarosa utilizadas durante los 14 días, mediante el método de peso seco.

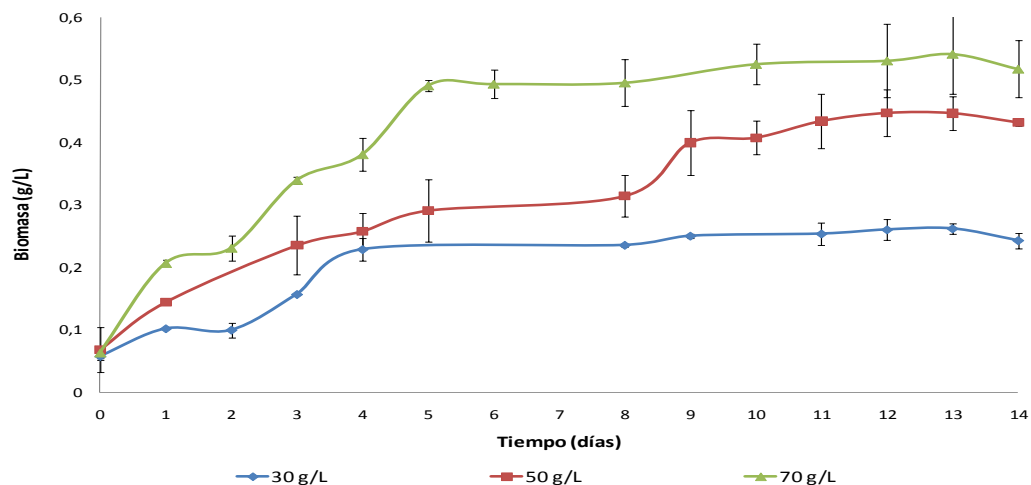


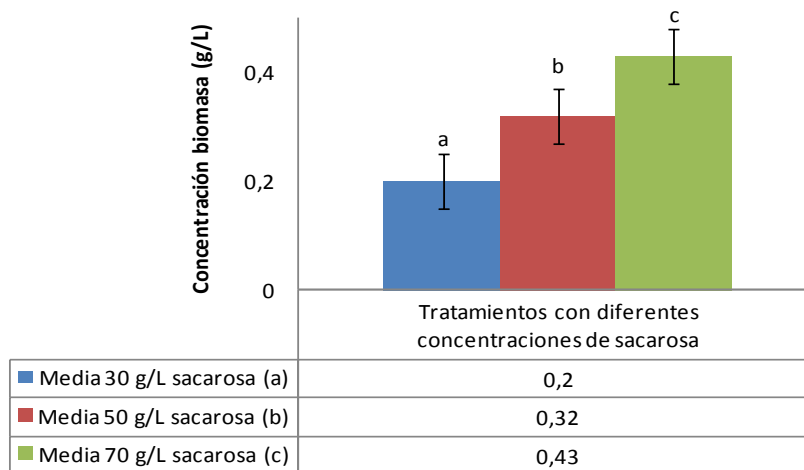
Gráfico 4. Cinética de crecimiento micelial de *P. cubensis* en medio sumergido (Fang-Zhong) utilizando diferentes concentraciones de sacarosa como fuente de carbono (Peso seco)

En el gráfico 4 se puede observar que tanto para una concentración de 30 g/L como para 70 g/L de sacarosa, el hongo llega a su fase estacionaria cerca del quinto día de la fermentación; mientras que para una concentración de 50 g/L se observa un comportamiento diferente, puesto que el microorganismo tiene un crecimiento exponencial hasta el día 5, en donde entra a una etapa de transición o estacionaria durante 3 días aproximadamente; luego de la cual, inicia nuevamente su crecimiento de forma exponencial hasta llegar al día 11, en donde sí empieza su fase estacionaria.

Al igual que en las tres fermentaciones que contenían glucosa, en estas fermentaciones de sacarosa, se observa mediante el gráfico anterior que no hubo presencia de fase de latencia.

El crecimiento máximo de biomasa, en cuanto a concentración, lo presentó aquella fermentación que contenía 70 g/L de sacarosa, el cual fue de 0.57 g/L, seguida de la de 50 g/L con un crecimiento máximo de biomasa de 0.45 g/L y posteriormente la concentración de 30 g/L obtuvo un crecimiento máximo de 0.26 g/L.

De acuerdo al análisis estadístico que se realizó para cada una de las fermentaciones, se dedujo que las diferencias en cuanto al crecimiento micelial de biomasa con respecto a la concentración de la misma, son significativas entre cada una de las fermentaciones, es decir, fue diferente la concentración de biomasa obtenida cuando se trabajó con cada una de distintas concentraciones de sacarosa. Lo dicho anteriormente se muestra a través del gráfico 5 (Anexo 2).



Letras diferentes denotan diferencias significativas (prueba LSD)

Gráfico 5. Crecimiento micelial para tres diferentes concentraciones de sacarosa

- **Modelo logístico para las fermentaciones donde se utilizó sacarosa como fuente de carbono**

Una vez realizadas las cinéticas de crecimiento del *P. cubensis* para cada concentración de sacarosa empleada, se procedió a ajustar los datos obtenidos al modelo logístico; cabe recalcar que es necesario establecer los crecimientos máximos de biomasa obtenidos para cada uno de los ensayos los cuales fueron: 0.26 g/L, 0.45 g/L y 0.57 g/L para concentraciones de 30 g/L, 50 g/L y 70 g/L de sacarosa respectivamente.

Una vez aplicado el modelo logístico para cada tratamiento, se obtuvieron valores de velocidad máxima de crecimiento y biomasa inicial para cada concentración de sacarosa utilizada en el medio, los cuales se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros cinéticos obtenidos mediante el modelo logístico para las diferentes fermentaciones de *P. cubensis* utilizando sacarosa como fuente de carbono

30g/L		50g/L		70g/L	
μ_x (día ⁻¹)	0,30	μ_x (día ⁻¹)	0,14	μ_x (día ⁻¹)	0,41
μ_{max} (día ⁻¹)	0,37	μ_{max} (día ⁻¹)	0,42	μ_{max} (día ⁻¹)	0,67
X_0 (g/L)	0,1	X_0 (g/L)	0,1	X_0 (g/L)	0,11
R^2	0,61	R^2	0,89	R^2	0,95

De la tabla 3 se ratifica que se utilizó una concentración inicial de biomasa igual para cada una de las fermentaciones, aproximadamente 0.1 g/L, además se observa un aumento en la velocidad máxima de crecimiento con respecto a la cantidad de sacarosa empleada, es decir, que el hecho de haber aumentado la concentración de sacarosa en el medio favoreció el aumento en la velocidad máxima de crecimiento del *P. cubensis* siendo ésta mayor cuando se trabajó a una concentración de 70 g/L de sacarosa. De igual manera se aprecia que el tratamiento que contenía 70 g/L de sacarosa presentó una velocidad específica de crecimiento mayor que los demás, siendo ésta de 0.41 día⁻¹.

Finalmente se calcularon los valores de biomasa teóricos; el gráfico 6 ilustra los valores de biomasa (X) tanto teóricos como experimentales graficados con respecto al tiempo.

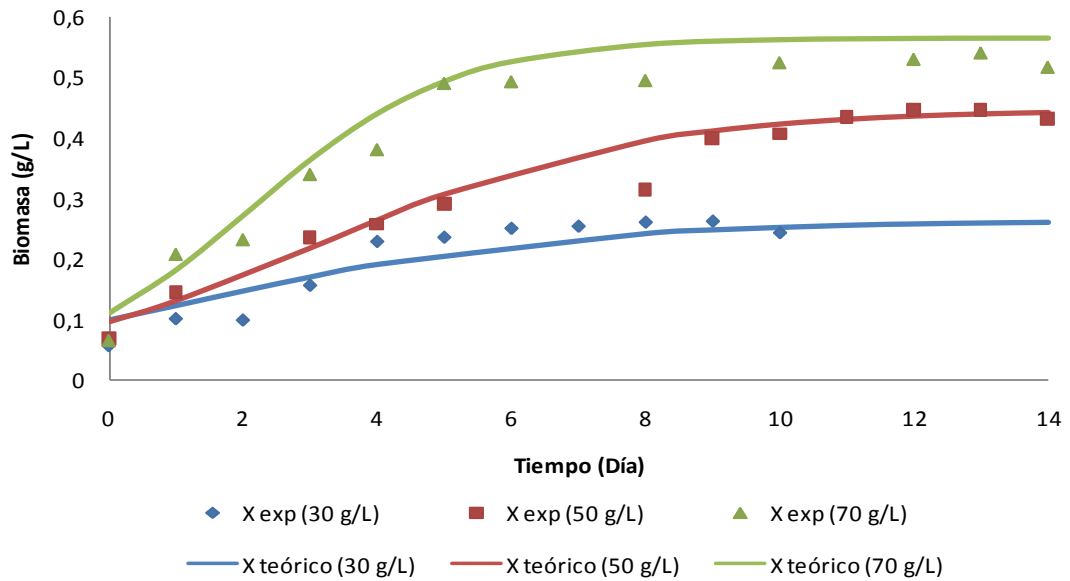


Gráfico 6. Valores de concentración de biomasa experimental y teórico graficados con respecto al tiempo para las fermentaciones con diferentes concentraciones de sacarosa

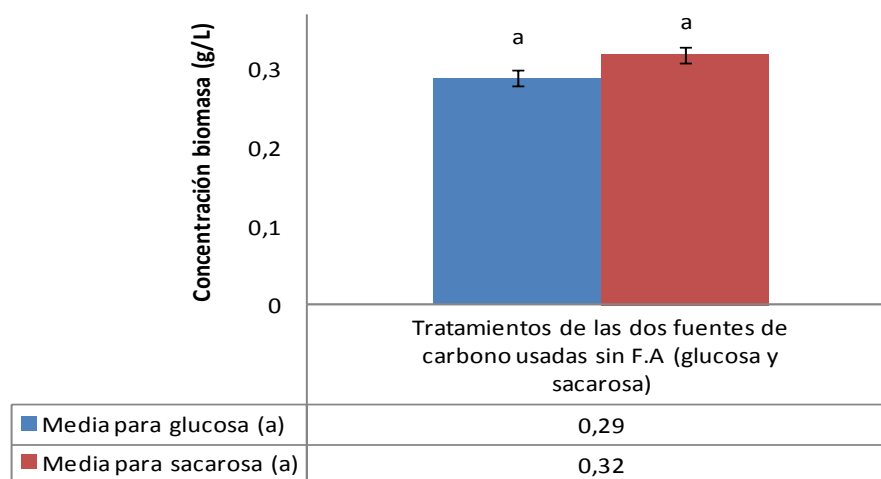
Del gráfico 6, se puede observar como los valores de biomasa experimentales se ajustaron a los valores de biomasa teóricos arrojados por el modelo logístico, lo que quiere decir, la cinética de crecimiento del *P. cubensis* en medio sumergido cuando se utilizó 70 g/L se ajustó correctamente al modelo logístico; lo que se corrobora en la tabla 2 gracias al valor obtenido para el R^2 que indica la relación de los datos teóricos con respecto a los experimentales. Por otro lado, para las fermentaciones de 30 g/L y 50 g/L de sacarosa, a pesar de parecer que presentaron un buen ajuste, al calcular la relación de los datos teóricos con respecto a los experimentales (R^2), se concluye que el ajuste no fue tan bueno.

3.1.3 Comparación entre el crecimiento micelial de *P. cubensis* en los cultivos sumergidos utilizando glucosa y sacarosa como fuente de carbono.

Ahora bien, es igualmente importante realizar un análisis comparativo entre ambas fuentes de carbono empleadas, con el fin de determinar si existen o no diferencias significativas entre dichas fuentes de carbono.

De acuerdo al análisis estadístico, se dice que existen diferencias significativas del crecimiento micelial del *P. cubensis*, en cuanto al día y la concentración de sustrato empleado, es decir, concentración de glucosa y sacarosa (Anexo 3), pero se observa claramente que no hay diferencias significativas de dicho crecimiento con respecto al tipo de sustrato utilizado, debido a que el *P-valor* arrojado por la estadística fue de 0.1217; lo que sugiere que se debe utilizar la sacarosa, gracias a la disminución de costos que se generarían durante el proceso; todo ello, gracias al costo de la sacarosa es inferior al de glucosa. Sin embargo, para elegir la fuente de carbono que mejores resultados arrojó, no sólo se basó en la cantidad de biomasa producida sino que se procedió a examinar los barridos espectrales arrojados por el análisis de HPLC, con el fin de determinar la fuente de carbono que mejor resolución mostró del alcaloide, que en esta investigación fue glucosa a una concentración de 50 g/L.

De igual manera, el gráfico 7 muestra las medias obtenidas mediante el análisis estadístico para las fermentaciones trabajadas con glucosa y sacarosa. Aun así, es necesario hacer hincapié que éste no es el criterio principal para la obtención del medio que mejores resultados arrojó durante la investigación, por lo tanto, se deben seguir realizando los diferentes análisis descritos anteriormente en este trabajo.



Letras diferentes denotan diferencias significativas (Prueba LSD)

Gráfico 7. Crecimiento micelial para dos diferentes fuentes de carbono (glucosa y sacarosa)

3.1.4 Crecimiento micelial del *P. cubensis* en cultivo sumergido utilizando glucosa y fenilalanina en el medio.

Se decidió realizar un último ensayo acerca del efecto que tenía la adición de un aminoácido llamado Fenilalanina (F.A) al medio Fang-Zhong sobre la producción del alcaloide y por ende sobre la generación de biomasa.

Debido a los análisis realizados anteriormente, se concluyó que la mejor fuente de carbono fue la glucosa a una concentración de 50 g/L. De la misma manera que en los numerales anteriores, se evaluó la cinética del crecimiento micelial del *P. cubensis* mediante los métodos de peso húmedo y peso seco. Las mediciones fueron realizadas por duplicado y promediadas para la fuente de carbono elegida (glucosa 50 g/L) y las diferentes concentraciones de F.A en el medio, correspondientes a 0.5 g/L; 1 g/L; 1.5 g/L, con el fin de encontrar el medio que mejores resultados arrojó en cuanto a crecimiento micelial y generación del

alcaloide de interés. Los datos obtenidos mediante el método de peso seco se muestran en el gráfico 8.

Cabe resaltar que junto con las tres fermentaciones de 0.5 g/L, 1.0 g/L y 1.5 g/L de F.A, se montaron a su vez seis muestras correspondientes a los días 12, 13 y 14 de la fermentación, que contenía 0 g/L de F.A; ésto con el propósito de analizar los datos de manera estadística y poder hacer comparaciones con respecto a la generación de biomasa y a la producción del alcaloide de interés, ambas medidas con respecto a la concentración.

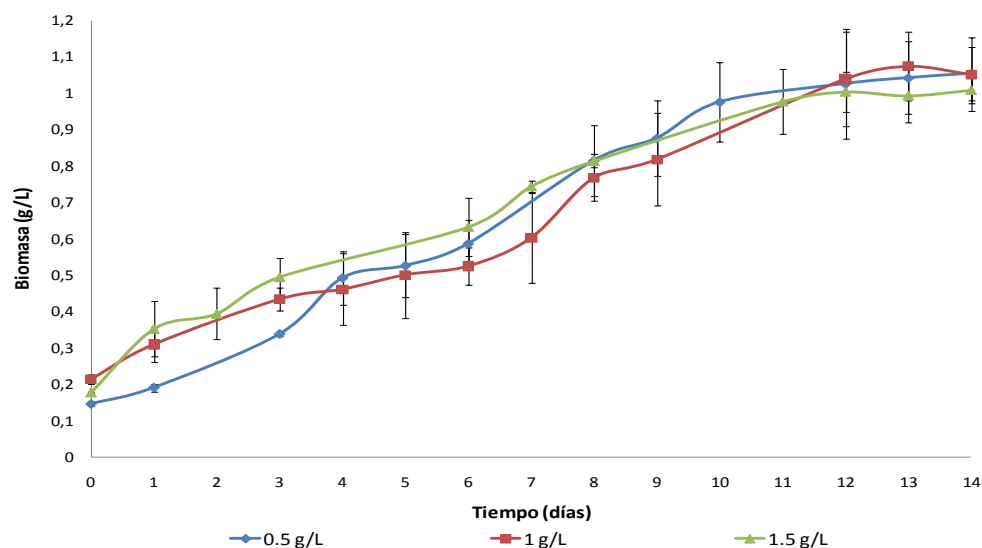


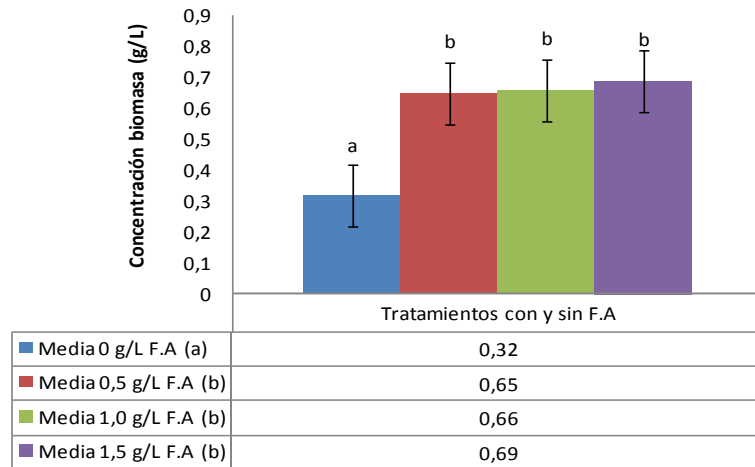
Gráfico 8. Cinética de crecimiento micelial de *P. cubensis* en medio sumergido (Fang-Zhong) utilizando diferentes concentraciones de F.A y 50 g/L de glucosa como fuente de carbono (Peso seco)

Al analizar el gráfico 8, es decir, el crecimiento micelial (concentración de biomasa) según la concentración de F.A en el tiempo, se puede notar que no hubo presencia de fase de latencia para ninguna de las concentraciones de F.A utilizadas, además, el crecimiento de biomasa en cada caso se aprecia de manera

muy similar, llegando los tres ensayos a la fase estacionaria el día 12 de la fermentación.

Observando el gráfico 8, se puede identificar que el mayor contenido de biomasa fue de 1.08 g/L obtenida el día 13 para una concentración 1.0 g/L de F.A, para concentraciones de 0.5 g/L y 1.5 g/L de F.A la concentración máxima de biomasa fue 1.06 g/L y 1.01 g/L, respectivamente. Aún así, al considerar los resultados obtenidos se puede ratificar que es indiferente la cantidad de F.A necesaria para obtener concentración de biomasa; por ende, se decide que el medio que mejores resultados arrojó fue el que contenía 0.5 g/L F.A, debido a que fue la concentración de F.A que mejor resolución del alcaloide presentó, parámetro observado mediante los cromatogramas obtenidos del análisis de HPLC (Anexos 19, 20 y 21) y además porque con dicha cantidad los costos de la materia prima serían menores. Cabe resaltar que el uso de F.A generó un aumento significativo, duplicando la producción de biomasa; por lo tanto, se testifica que sí hubo duplicación en cuanto a la concentración de biomasa en los medios que contenía F.A con respecto a los medios que no contenían F.A; se dice entonces que a su vez, se podría haber generado mayor cantidad de *Psilocibina* en los medios que tenían F.A, ya que dicho alcaloide se produce de manera intracelular; por tal razón, al aumentar la cantidad de biomasa en el medio, se aumenta la cantidad de dicho alcaloide.

De igual manera, se analizaron los datos estadísticamente y se llegó a apreciar que no existen diferencias significativas en cuanto a la producción de biomasa y la cantidad de F.A utilizada en el medio. Del mismo modo, al analizar la tabla de contrastes múltiple de rangos, se reitera que sí existen diferencias significativas entre el crecimiento micelial de biomasa (concentración de biomasa) en el tiempo cuando se trabajó con F.A o sin éste. Ésto se puede observar en el gráfico 9 (Anexo 4).



Letras diferentes denotan diferencias significativas (Prueba LSD)

Gráfico 9. Crecimiento micelial para glucosa a una concentración de 50 g/L y tres diferentes concentraciones de F.A

- **Modelo logístico para las fermentaciones donde se utilizó 50 g/L de glucosa como fuente de carbono y diferentes concentraciones de F.A**

En primer lugar, se fijaron los valores de crecimiento máximo de biomasa para cada una de las concentraciones obtenidos mediante el método de peso seco, con el fin de hallar los parámetros cinéticos mediante el modelo logístico. Los crecimientos máximos de biomasa obtenidos fueron los siguientes: 1.06 g/L, 1.08 g/L y 1.01 g/L para concentraciones de 0.5 g/L, 1.0 g/L y 1.5 g/L de F.A respectivamente y 50 g/L de glucosa.

Una vez realizado el modelo logístico para cada tratamiento se obtuvieron los valores de velocidad máxima de crecimiento y concentración de biomasa inicial para cada ensayo, los cuales se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Parámetros cinéticos obtenidos mediante el modelo logístico para las diferentes fermentaciones de *P. cubensis* utilizando 50 g/L de glucosa como fuente de carbono y diferentes concentraciones de F.A

0,5g/L		1,0g/L		1,5g/L	
μ_x (día ⁻¹)	0,18	μ_x (día ⁻¹)	0,12	μ_x (día ⁻¹)	0,12
μ_{max} (día ⁻¹)	0,45	μ_{max} (día ⁻¹)	0,35	μ_{max} (día ⁻¹)	0,44
X_0 (g/L)	0,1	X_0 (g/L)	0,17	X_0 (g/L)	0,16
R^2	0,95	R^2	0,82	R^2	0,88

Según los valores arrojados por el modelo logístico que se encuentran presentados en la tabla 4, se puede decir que se presentó un valor de biomasa inicial similar para los tratamientos de 1 g/L y 1.5 g/L de F.A; mientras que para las fermentaciones que contenían 0.5 g/L de F.A, se tiene una diferencia de un 50% aproximadamente. Además, se puede observar que a la concentración de 0.5 g/L de F.A es la que mayor velocidad máxima de crecimiento presenta, siendo esta 0.45 día⁻¹, a su vez, dicha concentración presentará la μ_x mayor correspondiente a 0,18 día⁻¹. Debido a esto y al criterio de mejor resolución del alcaloide observado en los análisis de HPLC (Anexos 19, 20 y 21), se concluye que el medio que mejores resultados arrojó durante la investigación para la generación de biomasa y la producción de la *Psilocibina* es 0.5 g/L de F.A y 50 g/L de glucosa.

Finalmente, se calcularon los valores de biomasa teóricos; el gráfico 10 muestra los valores de biomasa (X) tanto teóricos como experimentales graficados con respecto al tiempo.

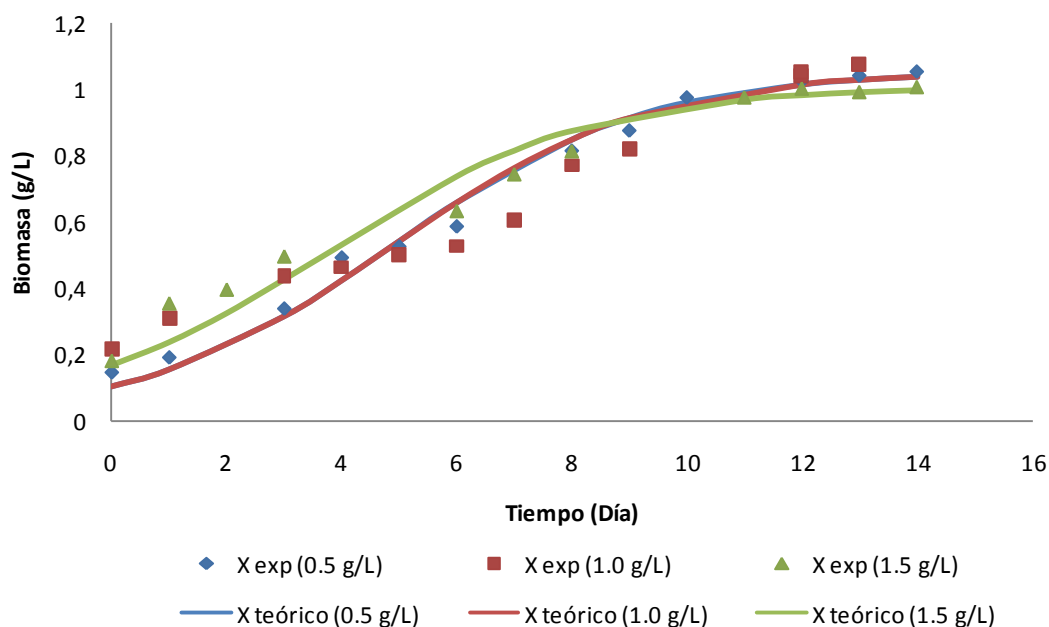


Gráfico 10. Valores de concentración de biomasa experimental y teórico graficados con respecto al tiempo para las fermentaciones con diferentes concentraciones de F.A y 50 g/L de glucosa

Se puede decir, gracias al gráfico 10, que los valores de biomasa experimentales se ajustaron a los valores de biomasa teóricos hallados mediante el modelo logístico, es decir, la cinética de crecimiento del *P. cubensis* en medio sumergido cuando se usaron diferentes concentraciones de F.A en el medio se ajustó correctamente al modelo logístico, esto se reitera con los valores de R^2 mostrados anteriormente en la tabla 4.

3.2 ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE CONSUMO DE SUSTRATO POR PARTE DEL *P. cubensis* CULTIVADO EN MEDIO SUMERGIDO (FANG-ZHONG)

La evaluación del consumo de sustrato durante la fermentación con respecto al tiempo; es de suma importancia, puesto que éste es el principal componente limitante del crecimiento presente en el medio de cultivo.

A continuación se analizarán dichos consumos para los diferentes ensayos.

3.2.1 Consumo de sustrato por parte del *P. cubensis* en medio sumergido utilizando diferentes concentraciones de glucosa

Una vez halladas las concentraciones de sustrato para cada una de las fermentaciones que contenían glucosa en el medio, se procedió a graficar dichos valores con respecto al tiempo.

El gráfico 11 ilustra los datos obtenidos sobre el consumo de sustrato de las tres fermentaciones que contenían glucosa y a su vez como se comportó el crecimiento de biomasa para cada ensayo durante los 14 días de fermentación.

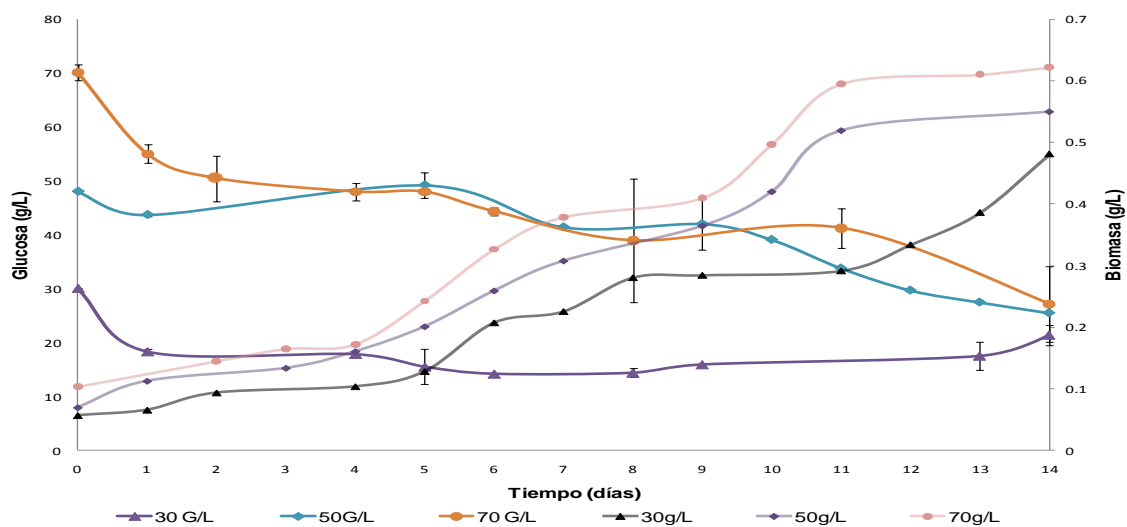


Gráfico 11. Cinética de consumo de sustrato por parte del *P. cubensis* en medio sumergido utilizando diferentes concentraciones de glucosa como fuente de carbono

Al observar el gráfico 11, se expone que el *P. cubensis* consumió mayor cantidad de glucosa cuando esta estaba a una concentración de 70 g/L correspondiendo a

un porcentaje de 62%; mientras que para 50 g/L y 30 g/L fue de 23% y 30%, respectivamente.

Comparando el consumo de glucosa en sus diferentes concentraciones con el crecimiento micelial del hongo, se puede observar que a una concentración de glucosa de 30 g/L, no sólo se tuvo un menor consumo de sustrato, sino que también se generó un menor crecimiento de biomasa. Mientras que a concentraciones de 50 g/L y 70 g/L de glucosa, a pesar de presentar diferencias en cuanto al porcentaje de sustrato consumido, el crecimiento micelial es similar (no presenta diferencias significativas); lo que indica que el hongo no requiere tanta concentración de glucosa para su crecimiento, ésto se puede afirmar sólo para este ensayo a estas condiciones.

De igual manera, en el gráfico 11, al analizar la tendencia del consumo de sustrato, las concentraciones de glucosa de 50 g/L y 70 g/L, presentan una disminución notoria hasta el día 11 para dicho consumo. Esto se debe a que en ese día inició la fase estacionaria del hongo en ambas fermentaciones, en donde el *P. cubensis* requería alimento únicamente para mantenerse y producir metabolitos secundarios. Mientras que para la concentración de glucosa de 30 g/L, el consumo de glucosa fue muy poco a partir del quinto día de la fermentación, esto se atribuye a que la cinética de crecimiento micelial del *P. cubensis* presentó una fase estacionaria temprana entre los días 8 y 11, indicando que no necesitaba consumir casi glucosa puesto que no estaba creciendo.

3.2.2 Consumo de sustrato por parte del *P. cubensis* en medio sumergido utilizando diferentes concentraciones de sacarosa

Los datos obtenidos sobre el consumo de sacarosa para cada una de las concentraciones utilizadas (30 g/L, 50 g/L y 70 g/L de sacarosa) durante los 14 días de la fermentación, se muestran en el gráfico 12, a su vez se ilustran en dicho

gráfico el comportamiento del crecimiento micelial para cada ensayo durante los 14 días de fermentación, para efectos de análisis.

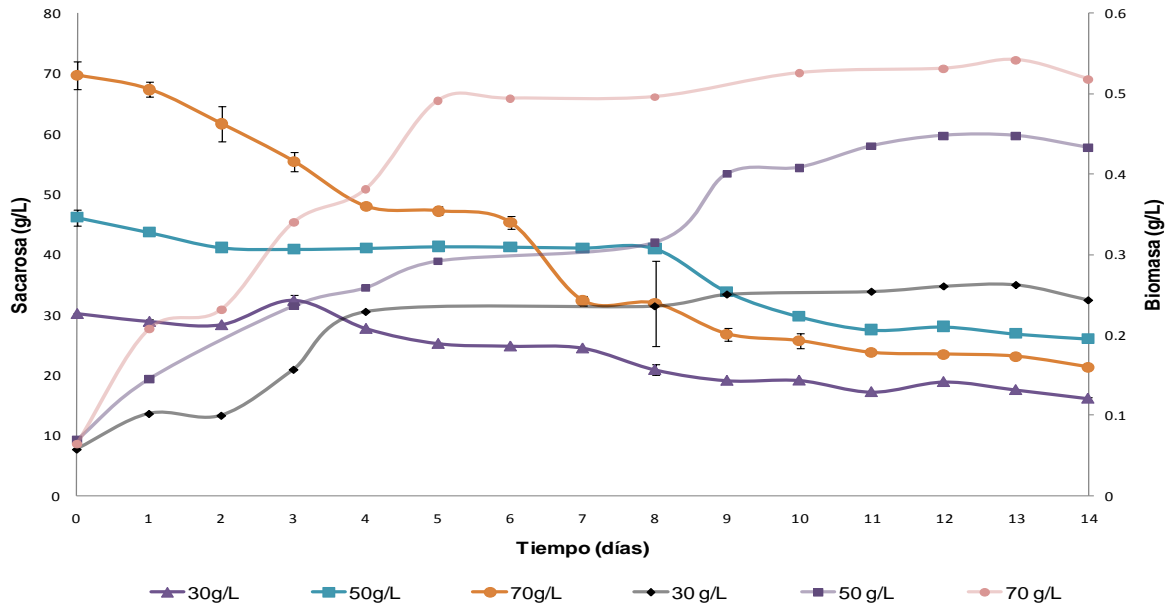


Gráfico 12. Cinética de consumo de sustrato por parte del *P. cubensis* en medio sumergido utilizando diferentes concentraciones de sacarosa como fuente de carbono

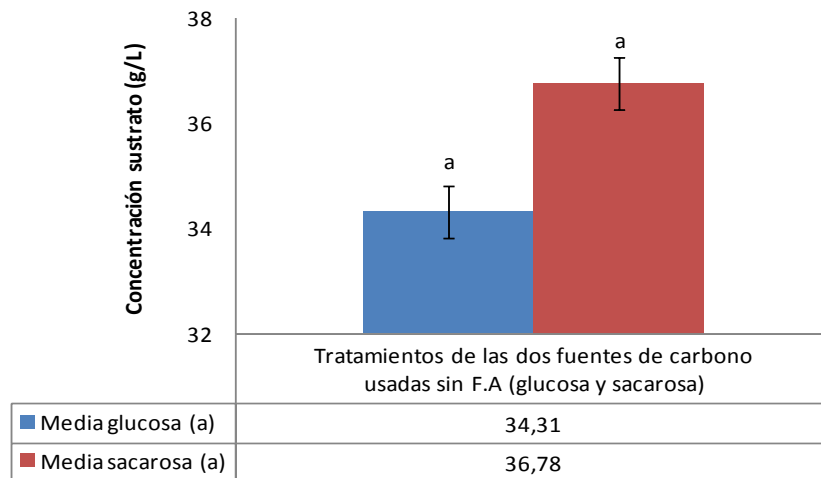
Al observar el gráfico 12, se puede decir que el *P. cubensis* consumió mayor cantidad de sacarosa cuando ésta estaba a una concentración de 70 g/L en el medio, presentando un porcentaje de consumo del 49%; mientras que para las concentraciones de 50 g/L y 30 g/L de sacarosa, se tuvo un porcentaje de consumo de 24% y 37%. Esto igual que en el consumo de glucosa, se puede deber a que al tener mayor concentración de sustrato en el medio, el *P. cubensis* genera mayor afinidad por el mismo, haciendo que dicho hongo se consuma grandes cantidades de sacarosa durante el tiempo.

Igualmente, se observa que aproximadamente en el noveno día de la fermentación, las tres diferentes concentraciones de glucosa (30 g/L, 50 g/L y 70

g/L), se mantienen casi constantes en el tiempo, ello gracias a que en este día el hongo se encontraba en fase estacionaria en los tres ensayos.

3.2.3 Comparación entre el consumo de sustrato de *P. cubensis* en los cultivos sumergidos con diferentes fuentes de carbono

Con el fin de identificar cuál de las dos fuentes de carbono fue consumida en mayor proporción por parte del *P. cubensis* se procedió a realizar un análisis estadístico donde comparamos las dos fuentes de carbono empleados con respecto al consumo de sustrato obtenido (concentración de glucosa y sacarosa en cada uno de los medios), donde se consiguió un *P-valor* de 0.0811 con respecto al tipo de sustrato, lo que indica que no existen diferencias en cuanto al consumo de sustrato y el tipo del mismo, es decir, es indiferente cuál de los dos sustratos (glucosa o sacarosa) se utilice para que se del consumo del mismo por parte del *P. cubensis*. Observación que se reitera en la tabla de contraste múltiple que muestra que se trabajó como un grupo homogéneo. Igualmente, el gráfico 13 muestra las medias de consumo de sustrato (concentración durante los 14 días) obtenidas mediante el análisis estadístico y reitera que no existen diferencias significativas con respecto al tipo de sustrato utilizado para el cultivo del *P. cubensis* en medio sumergido (Anexo 5).



Letras diferentes denotan diferencias significativas (Prueba LSD)

Gráfico 13. Consumo de sustrato para cada una de las fuentes de carbono utilizadas

Aun así, al comparar los gráficos 11 y 12, se puede observar un mayor consumo de glucosa que de sacarosa; lo que lleva a concluir que es mejor emplear la primera (glucosa).

3.2.4 Consumo de sustrato por parte del *P. cubensis* en medio sumergido utilizando glucosa y fenilalanina en el medio.

Los datos obtenidos acerca del consumo de sustrato durante los 14 días de la fermentación para cada uno de los medios que contenían 50 g/L de glucosa y diferentes concentraciones de F.A (0.5 g/L, 1 g/L y 1.5 g/L) se muestran en el gráfico 14. De igual manera, se ilustran en dicho gráfico, las cinéticas de crecimiento micelial para cada una de las fermentaciones que tenían 50 g/L de glucosa y diferentes concentraciones de F.A, con el fin de realizar los análisis pertinentes.

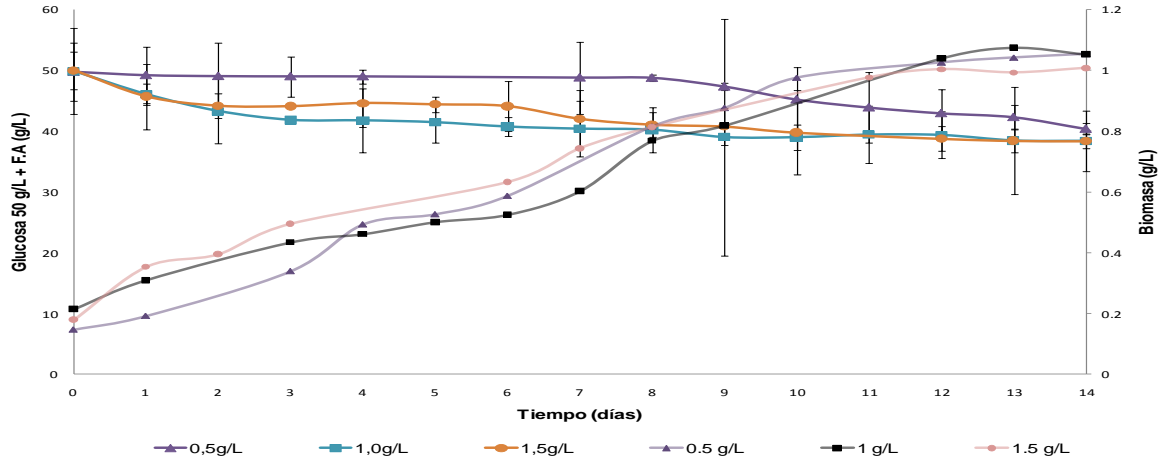


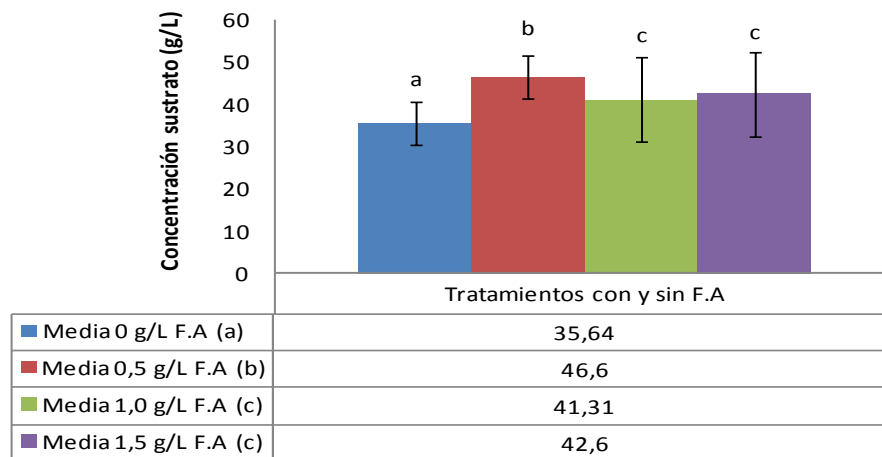
Gráfico 14. Cinética de consumo de sustrato por parte del *P. cubensis* en medio sumergido utilizando 50 g/L de glucosa como fuente de carbono y diferentes concentraciones de F.A

Analizando el gráfico 14, se puede decir que el consumo de glucosa durante el tiempo fue igual para las fermentaciones que contenía concentraciones de 1 g/L y 1.5 g/L de F.A, dichos consumos corresponde a valores de 23%; mientras que para el ensayo que tenía una concentración de 0.5 g/L de F.A el porcentaje de consumo fue del 18%. Asimismo, se presentaron diferencias significativas en cuanto al consumo de sustrato entre los diferentes ensayos.

El gráfico 15 expone las medias del consumo de sustrato (concentración) de cada una de las muestras y las diferencias existentes entre ellas; se evidencia que la adición de F.A, disminuyó el consumo de glucosa; además, que en los ensayos se presentaron tres grupos homogéneos diferentes. En el primer grupo (a), que contiene las fermentaciones del *P. cubensis* con una concentración de 50 g/L de glucosa y en ausencia de F.A, se obtuvo una media de 35.6 g/L, la cual indica un mayor consumo de sustrato. Luego, el segundo grupo (c), se compone de las concentraciones de 1 g/L y 1.5 g/L de F.A, presentando una media de 41.3 g/L y de 42.6 g/L, respectivamente. y el último grupo (b) corresponde a una

concentración de 0.5 g/L de F.A, el cual presenta el menor consumo de glucosa, al exponer una media 46.6 g/L.

Según lo anterior y el gráfico 15, se dice que sí existieron diferencias significativas en cuanto al consumo de sustrato (concentración durante los 14 días) en los últimos tres días cuando se trabajo con F.A y sin F.A y a su vez se encontraron diferencias significativas de la concentración de sustrato en el medio cuando se tenía una concentración de F.A correspondiente a 0.5 g/L con relación a las otras dos concentraciones de F.A (1.0 g/L y 1.5 g/L), mientras que entre estas dos últimas concentraciones de F.A (1.0 g/L y 1.5 g/L) no se encontraron diferencias significativas (Anexo 6).



Letras diferentes denotan diferencias significativas (prueba LSD)

Gráfico 15. Consumo de sustrato para cada una de las concentraciones de F.A utilizadas

3.3 ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE CONSUMO DE PROTEÍNA POR PARTE DEL *P. cubensis* CULTIVADO EN MEDIO SUMERGIDO (FANG-ZHONG)

Las fuentes de proteína que posee el medio de Fang-Zhong son extracto de levadura y peptona, que representan una cantidad de 10 g/L para cada ensayo, ésta cantidad se mantuvo constante para cada fermentación.

Se evaluó el consumo de proteína por parte del *P. cubensis* durante los 14 días de la fermentación, para cada uno de los ensayos.

A continuación se analizan los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos.

3.3.1 Consumo de proteína por *P. cubensis* en medio sumergido utilizando diferentes concentraciones de glucosa

Una vez se calcularon las concentraciones de proteína en el medio para cada ensayo, se graficaron dichos valores con respecto al tiempo.

El gráfico 16 muestra como se comportó el consumo de proteína con respecto al tiempo para cada una de las tres concentraciones de glucosa utilizadas y a su vez como se comportó el crecimiento de biomasa para cada ensayo durante los 14 días de fermentación.

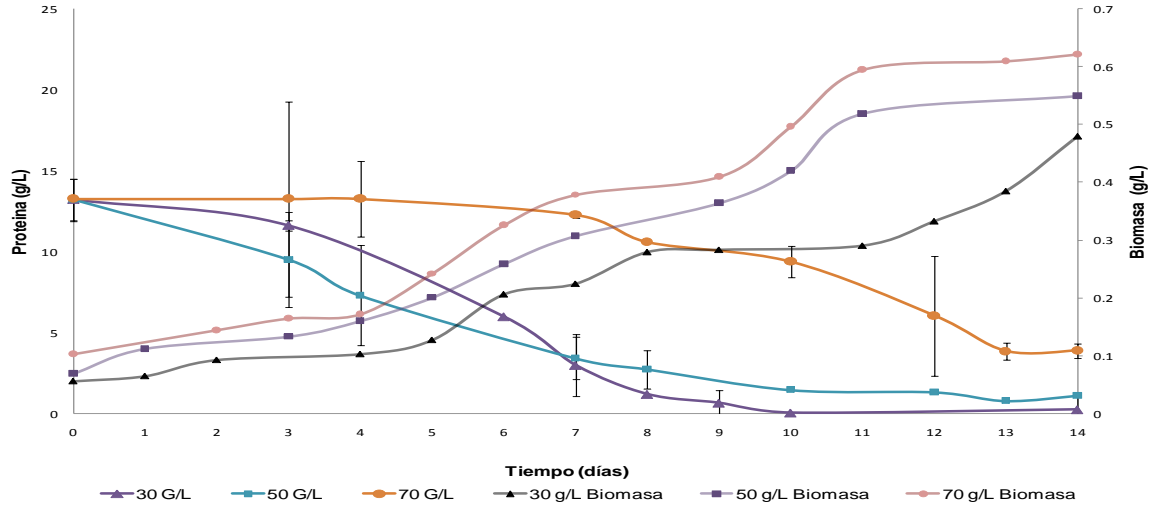


Gráfico 16. Cinética de consumo de proteína por parte del *P. cubensis* en medio sumergido utilizando diferentes concentraciones de glucosa como fuente de carbono

Analizando el gráfico 16, se puede observar que el consumo de proteína se dio casi en su totalidad. El ensayo que mayor consumo de proteína presentó fue el que contenía 30 g/L de glucosa, arrojando un porcentaje de consumo del 98%, mientras que las fermentaciones realizadas a concentraciones de 50 g/L y 70 g/L de glucosa, presentaron un porcentaje de consumo de proteína del 91% y 90%, respectivamente.

Al enfocarnos en la relación existente entre el consumo de proteína y el crecimiento micelial del *P. cubensis*, se puede notar gracias al gráfico 16, que la relación es directamente proporcional, debido a que el consumo de proteína fue permanente mientras el hongo se encontraba en fase exponencial, es decir, el *P. cubensis* necesitaba de la proteína para aumentar su crecimiento; mientras que en el momento en que el microorganismo comenzó su fase estacionaria, la concentración de proteína en el medio se mantuvo constante; esto último sólo es válido para concentraciones de 50 g/L y 70 g/L de glucosa, puesto que ambas llegaron a la fase estacionaria.

3.3.2 Consumo de proteína por *P. cubensis* en medio sumergido utilizando diferentes concentraciones de sacarosa

Una vez obtenidos los valores de consumo de proteína para cada concentración de sacarosa utilizada, se precedió a graficarlos con respecto al tiempo, dichos datos se encuentran en el gráfico 17. De igual manera en este gráfico se representa la cinética de crecimiento de biomasa para el *P. cubensis* de acuerdo a las distintas concentraciones de sacarosa utilizadas.

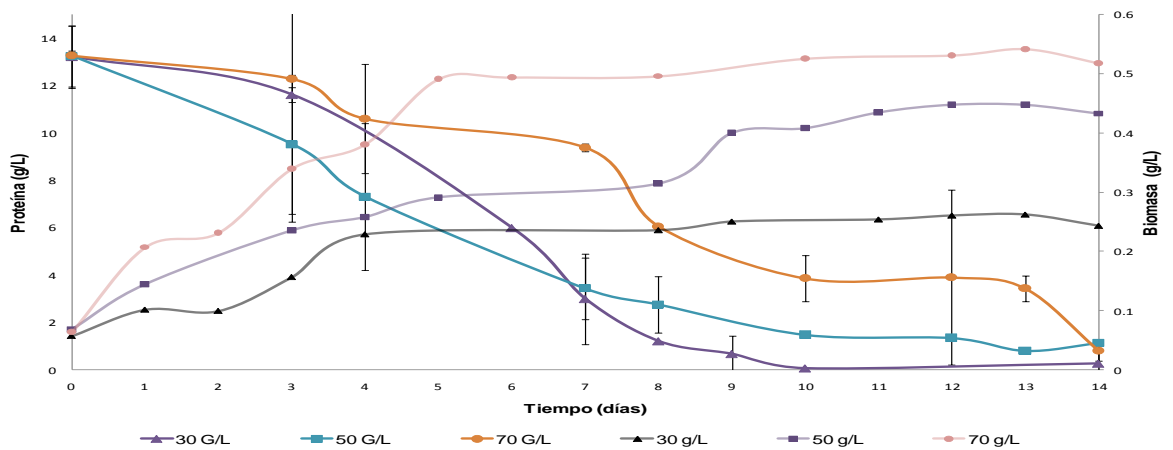


Gráfico 17. Cinética de consumo de proteína por parte del *P. cubensis* en medio sumergido utilizando diferentes concentraciones de sacarosa como fuente de carbono

El gráfico 17 ilustra el consumo casi en su totalidad de la proteína para cada uno de los tratamientos. El ensayo que mayor consumo de proteína presentó fue el que contenía 30 g/L de sacarosa, exponiendo un porcentaje de consumo del 89%; mientras que las concentraciones de 50 g/L y 70 g/L de sacarosa, arrojaron porcentajes de consumo del 86% y 57%, respectivamente.

Ahora bien, al analizar el crecimiento del *P. cubensis* con respecto al consumo de proteína, se evidencia claramente que el consumo disminuyó permanentemente

en el tiempo mientras el hongo se encontraban en estado exponencial; indicando el interés del *P. cubensis* por la proteína, siendo ésta utilizada por el mismo para aumentar su tamaño y biomasa

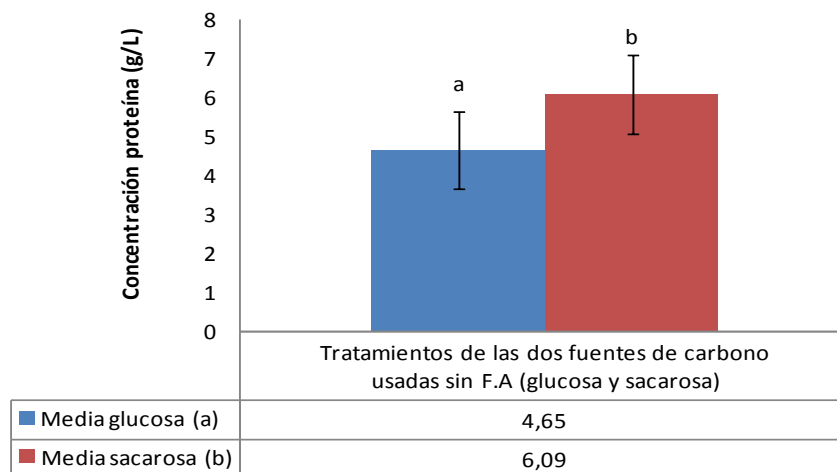
Durante los días 4 y 10, las fermentaciones que contenían concentraciones de 30 g/L y 70 g/L de sacarosa, presentaron un alto consumo de proteína, a pesar de que el *P. cubensis* se encontraba en estos dos ensayos en fase estacionaria, fase en la cual no se requiere consumir grandes cantidades de sustrato, puesto que el hongo sólo necesitaba alimentarse para mantenerse o para producir productos no ligados al crecimiento, más no para cambiar la cantidad de biomasa presente en el medio. Asimismo, la concentración de 50 g/L de sacarosa, también presentó un alto consumo de proteína durante los días 4 y 8, en donde se creía estar en una fase estacionaria temprana, lo dicho anteriormente reitera una vez más la afinidad que el *P. cubensis* presentó con respecto a las fuentes de proteína usadas.

3.3.3 Comparación entre el consumo de proteína de *P. cubensis* en los cultivos sumergidos con diferentes fuentes de carbono

Con el fin de conocer cuál de los dos tipos de sustrato empleado fue mayormente consumido, se realizó un análisis estadístico.

En el gráfico 18 se ilustran las medias de consumo de proteína (concentración) arrojadas mediante el análisis estadístico sobre el consumo de proteína cuando se utilizó glucosa o sacarosa en el medio y se evidencia que existen diferencias significativas en cuanto a la concentración de proteína en el tiempo en el medio cuando se realizó el experimento con glucosa y cuando se utilizó sacarosa, arrojando así dos grupos homogéneos; el primero (a) presenta una media de 4.65 g/L; mientras que el grupo dos (b) arroja un valor de media de 6.09 g/L, indicando un menor consumo de proteína por parte del *P. cubensis* en el medio sumergido

de Fang-Zhong cuando se utilizó sacarosa como principal fuente de carbono (Anexo 7).



Letras diferentes denotan diferencias significativas (prueba LSD)

Gráfico 18. Consumo de proteína para cada una de las fuentes de carbono utilizadas

3.3.4 Consumo de proteína por *P. cubensis* en medio sumergido utilizando glucosa y F.A en el medio

Una vez se obtuvo la concentración de proteína en el medio para cada concentración de F.A utilizada, se procedió a graficar dichos valores con respecto al tiempo, los cuales se ilustran en el gráfico 19, además se muestran en dicho gráfico las cinéticas de crecimiento de biomasa para cada ensayo.

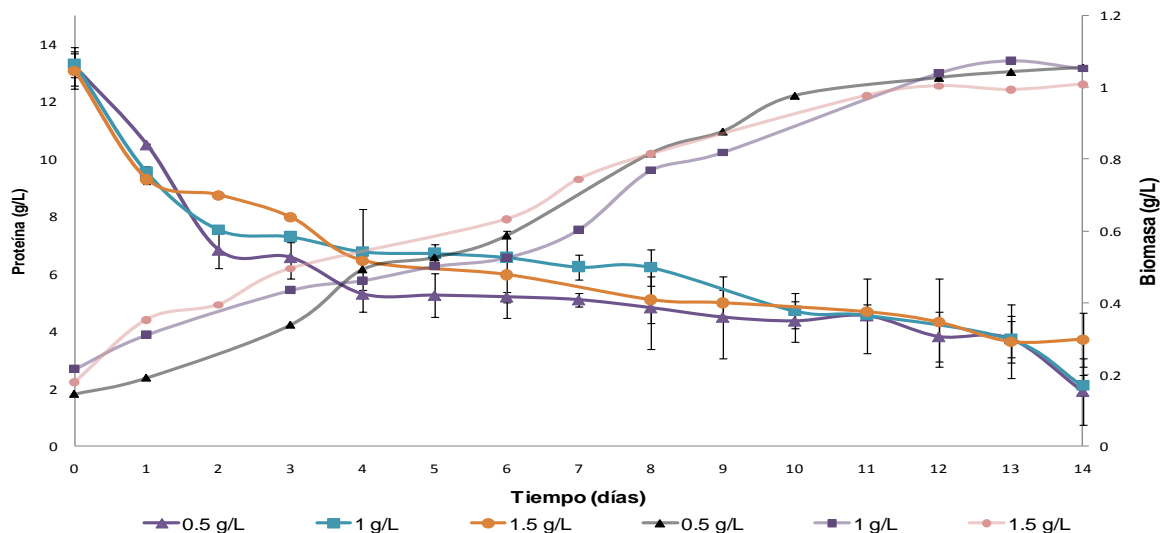


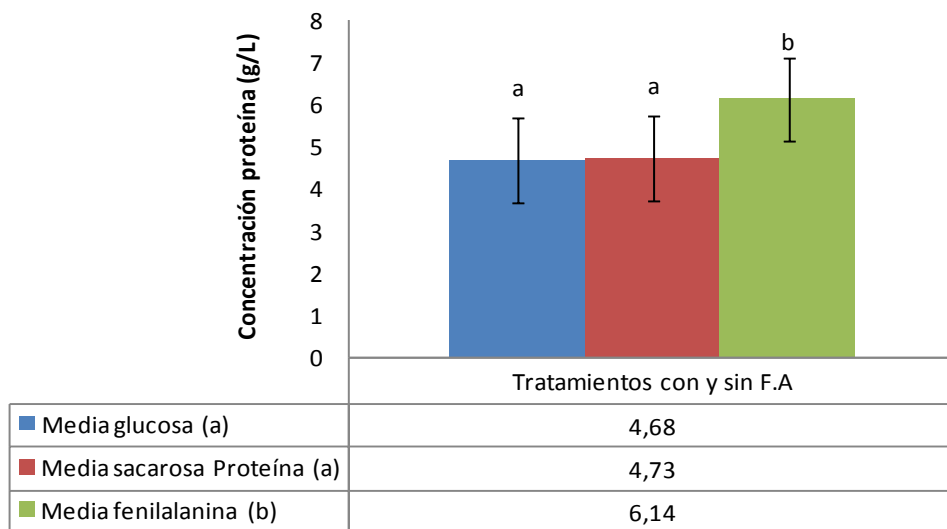
Gráfico 19. Cinética de consumo de proteína por parte del *P. cubensis* en medio sumergido utilizando 50 g/L de glucosa como fuente de carbono y diferentes concentraciones de F.A

De igual forma que para la fermentación que tenía 50 g/L de glucosa en el medio realizada anteriormente, para dichos ensayos el consumo de proteína fue permanente y se dio casi en su totalidad. El ensayo que mayor consumo de proteína presentó fue el que contenía 0.5 g/L de F.A, arrojando un porcentaje de consumo del 86%; aun así, el porcentaje de consumo arrojado por la fermentación de 1 g/L de F.A fue del 84%, indicando que no existen diferencias con respecto al consumo de proteína entre dichas cantidades de F.A utilizadas. Mientras que el porcentaje de consumo para 1.5 g/L de F.A fue inferior, presentando un valor del 72%. De acuerdo a los resultados mencionados anteriormente se puede decir que a mayor concentración de F.A en el medio, se presenta menor consumo de proteína por parte del *P. cubensis*; esto se puede afirmar únicamente para los resultados obtenidos durante esta investigación a ciertas condiciones.

Analizando ahora la relación entre el consumo de proteína y el crecimiento micelial, se puede ver que al igual que para los ensayos con glucosa a 50 g/L, se

tiene un consumo permanente mientras se está en fase exponencial; y una vez se llega a la fase estacionario, alrededor del día 12, la concentración de proteína en el medio se estabilizó.

A la hora de indagar los datos estadísticamente, se puede observar que no existen diferencias significativas sobre el consumo de proteína (concentración) en el tiempo con respecto al tipo de sustrato, pero al comparar los resultados con los ensayos donde se añadió F.A al medio, se encontró que sí existen diferencias significativas. Se crearon dos grupos homogéneos, el primero cuenta con glucosa y sacarosa presentando medias (cantidad de proteína en el medio) de 4.68 g/L y 4.73 g/L, respectivamente; mientras que el ensayo con F.A, se encuentra en otro grupo en donde su consumo de proteína fue menor, presentando una media (cantidad de proteína en el medio) de 6.14 g/L. (Anexo 8).



Letras diferentes denotan diferencias significativas (prueba LSD)

Gráfico 20. Consumo de proteína para los ensayos con y sin F.A

3.4 ESTUDIO CUALITATIVO DE LA PRESENCIA DEL ALCALOIDE

Posterior a las fermentaciones de glucosa, sacarosa y glucosa 50 g/L con F.A y los respectivos análisis, se realizó un último análisis, que a la vez, fue el de mayor relevancia a la hora de determinar cuál de los medios fue el que mejores resultados arrojó. En primera instancia, se utilizó el reactivo de Dragendorff como indicador de alcaloide para analizar las muestras de los días 12, 13 y 14; con el fin de esclarecer la presencia de alcaloides (Anexo 17).

Una vez detectada la presencia de alcaloides, gracias a la coloración naranja presentada en las muestras, se procedió a realizar la técnica de HPLC con el fin de hallar un porcentaje del compuesto de interés basado en las áreas obtenidas de los cromatogramas (asumiendo un tiempo de retención entre 6.2 y 7.2 minutos).

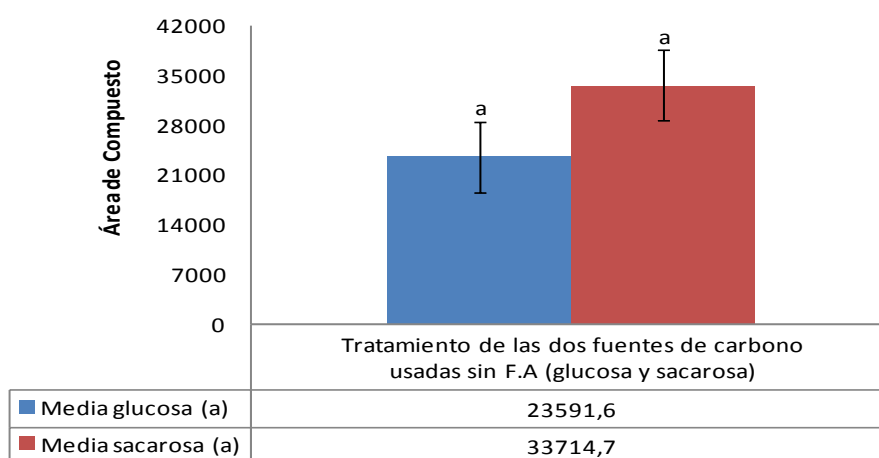
3.4.1 Producción de compuestos producidos por *P. cubensis* cuando el medio no contenía F.A

A la hora de analizar y confirmar cuál fue el mejor ensayo de los experimentos realizados, se tuvo como criterio base determinar la fuente de carbono y su respectiva concentración que mejor presencia del compuesto de interés arrojó, supuesto a un tiempo de retención entre 6.2 y 7.2 minutos.

Inicialmente, al obtener los análisis estadísticos, se deduce que no existieron diferencias significativas entre el área del pico de interés con respecto a todos los picos arrojados por el cromatograma y los factores estudiados (tipo de sustrato, día de fermentación, y concentración) puesto que se obtuvieron valores de *P-valor*

de 0.3310, 0.9580 y 0.8336, respectivamente; es decir, no importa qué tipo de sustrato se utilice, la producción de alcaloide no tendrá variaciones (Anexo 9).

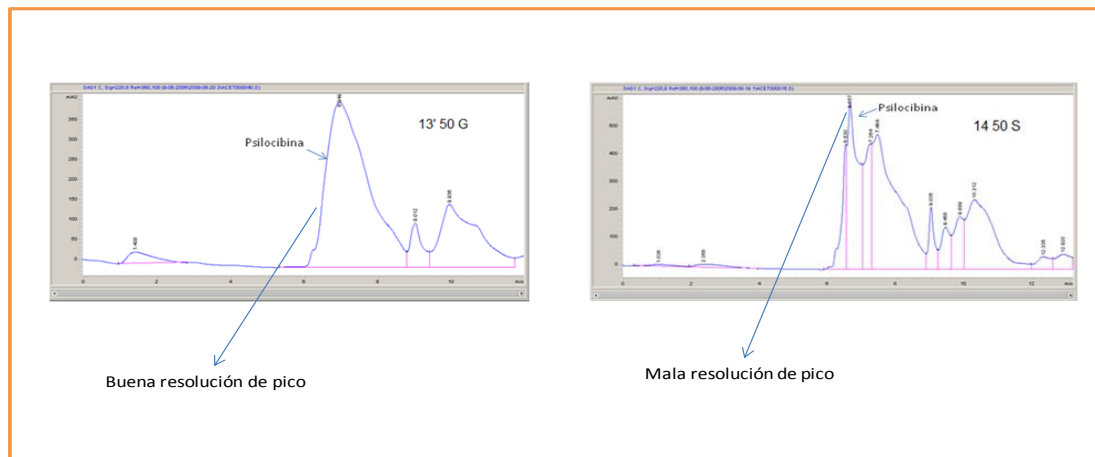
Al analizar el gráfico 21, se puede observar que las medias de las áreas halladas para los diferentes ensayos con glucosa y sacarosa no presentaron diferencias significativas, es decir, pertenecen al mismo grupo homogéneo (a); lo que ratifica lo dicho anteriormente.



Letras diferentes denotan diferencias significativas (prueba LSD)

Gráfico 21. Área del compuesto obtenido de *P. cubensis* en tiempo de retención entre 6.2 y 7.2 minutos para las dos fuentes de carbono

Por tal razón, fue necesario hacer un análisis cualitativo de los cromatogramas obtenidos mediante HPLC, el cual se basó en la forma del pico arrojado por la técnica. La figura 6 ilustra dicho análisis.



(a)

(b)

Figura 6. Cromatogramas de dos diferentes fermentaciones de *P. cubensis* que ilustran el criterio de escogencia del mejor ensayo realizado (a) 50 g/L glucosa (b) 50 g/L sacarosa

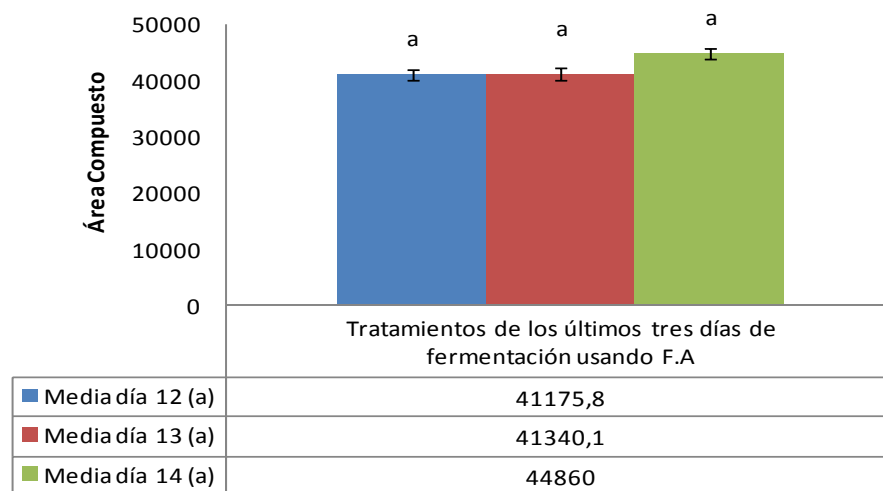
Primero, fue necesario observar el tamaño del pico y posterior a esto, determinar su resolución. La figura 6 ilustra dos ejemplos, el de 50 g/L de glucosa el día 13 y 50 g/L de sacarosa el día 14; mientras el primero muestra un pico grande y definido, la segunda fermentación ilustra un pico grande, pero poco definido, indicando que en este caso no se resolvió correctamente el alcaloide, es decir, no se logró una buena separación. De esta manera, se analizaron los diferentes cromatogramas para los días 12 (Anexo 19), 13 (Anexo 20) y 14 (Anexo 21) de cada fermentación; arrojando diferencias entre los ensayos y llevando a la conclusión de que la fermentación que mejores resultados arrojó fue la que contenía 50 g/L de glucosa.

3.4.2 Producción de compuestos producidos por *P. cubensis* cuando el medio contenía F.A

Después de realizada la fermentación con glucosa 50 g/L y concentraciones de F.A de 0.5 g/L, 1.0 g/L y 1.5 g/L, se procedió de igual manera que en el estudio sin F.A a evaluar cuál de estas tres concentraciones de F.A exhibió mejor resolución del alcaloide.

Inicialmente se realizó un análisis estadístico, el cual arrojó que no existen diferencias significativas con respecto al área de pico, que en este caso debido al supuesto, representa la *Psilocibina* y los días 12, 13 y 14 de la fermentación.

Mediante el gráfico 22 se puede decir que en los últimos tres días de las fermentaciones que contenían F.A en el medio no existen diferencias significativas con respecto al alcaloide de interés obtenido, es decir, en los tres se produjo el alcaloide (Anexo 10).



Letras diferentes denotan diferencias significativas

Gráfico 22. Área del compuesto obtenido de *P. cubensis* en tiempo de retención entre 6.2 y 7.2 minutos en los últimos tres días de la fermentación con F.A y glucosa

Igual que en numeral anterior, fue necesario realizar análisis cualitativo para los cromatogramas; por ende, se requirió observar el tamaño del pico y posterior a ésto, determinar su resolución.



Figura 7. Cromatogramas de dos diferentes fermentaciones de *P. cubensis* que ilustran el criterio de escogencia del mejor ensayo realizado (a) 0.5 g/L F.A (b) 1.5 g/L F.A

La figura 7 ejemplifica el análisis realizado para la selección del mejor ensayo ejecutado. Se tienen dos cromatogramas, el de 0.5 g/L de F.A en el día 13 y el de 1.5 g/L de F.A para el mismo día.

A todos los cromatogramas obtenidos para los días 12 (Anexo 19), 13 (Anexo 20) y 14 (Anexo 21), se realizó el mismo análisis y se concluyó que la concentración más apropiada para la obtención de los compuestos producidos por *P. cubensis* fue de 0.5 g/L de F.A, debido a que éste generaría una disminución en los costos.

3.5 ESTUDIO PORCENTUAL (ÁREA) DEL ALCALOIDE REALIZADO PARA LOS DIFERENTES ENSAYOS

Se calculó el porcentaje de área correspondiente al pico que identificó que se asumió como el correspondiente a la *Psilocibina*, gracias a la suposición realizada del tiempo de retención.

A continuación se presentan los valores obtenidos y sus respectivos análisis para cada tratamiento.

3.5.1 Porcentaje de la *Psilocibina* (suposición) cuando el medio no contenía F.A

Debido a que no se contaba con un estándar de *Psilocibina*, los resultados mostrados en la tabla 5, se obtuvieron realizando un porcentaje con respecto a las áreas bajo la curva, arrojadas mediante el análisis de cromatografía de alta eficiencia (Anexos 19, 20 y 21). En dichos anexos se encuentran resaltadas en negrilla aquellas aéreas utilizadas.

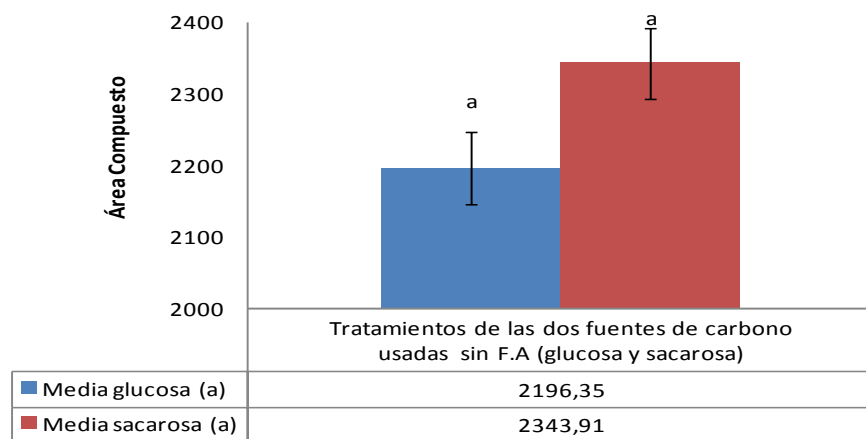
Tabla 5. Porcentaje de área hallado mediante HPLC para los últimos tres días de la fermentación con concentraciones de 30 g/L, 50 g/L y 70 g/L de glucosa y sacarosa con un tiempo de retención de 6.2 y 7.2 minutos

Día	Glucosa (g/L)	% Área (compuesto Tr= 6.2-7.2)	Sacarosa (g/L)	% Área (compuesto Tr= 6.2-7.2)
12	30	60.650	30	36.64
12	50	73.96	50	58.57
12	70	48.16	70	34.15
13	30	7.02	30	28.76
13	50	68.15	50	41.13
13	70	67.33	70	55.83
14	30	48.24	30	27.56
14	50	48.21	50	27.92
14	70	0.17	70	14.29

A la hora de analizar los datos de la tabla 5, se puede observar que el mayor porcentaje de área se obtuvo cuando se trabajó con glucosa como fuente de carbono y concretamente a una concentración de 50 g/L.

Analizando los datos estadísticamente, no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la producción del compuesto (área) con respecto al tipo de sustrato utilizado durante las fermentaciones; es decir, es indiferente si se utiliza glucosa o sacarosa en el cultivo de *P. cubensis* en medio sumergido de Fang-Zhong.

El gráfico 23 ilustra las medias (área) obtenidas para la producción de alcaloide en las dos diferentes fuentes de carbono, es decir, glucosa y sacarosa; exponiendo un único grupo homogéneo, con medias (producción de alcaloide) de áreas de 2196.35 y 2343.91 para glucosa y sacarosa, respectivamente (Anexo 11).



Letras diferentes denotan diferencias significativas (prueba LSD)

Gráfico 23. Área del compuesto obtenido de *P. cubensis* en tiempo de retención entre 6.2 y 7.2 minutos para cada una de las fuentes de carbono utilizadas

Aun así, estudiando los gráficos de HPLC con el criterio mencionado anteriormente, es decir, observando el tamaño del pico y su resolución del mismo,

se observó claramente que la presencia del alcaloide (tiempo de retención supuesto entre 6.2 y 7.2 minutos) fue mejor cuando se trabajó con glucosa a una concentración de 50 g/L, debido que presenta el mejor pico.

3.5.2 Porcentaje de área de compuestos presentes en *P. cubensis* cuando el medio contenía F.A

Con el fin de observar si la adición de F.A al medio si arrojó mejores resultados en cuanto a la producción del compuesto presente entre un rango de 6.2 y 7.2 minutos como tiempo de retención, se procedió a calcular el porcentaje del área de interés, de acuerdo a las áreas arrojadas para cada ensayo por medio del análisis de HPLC. Los datos obtenidos, se ilustran a continuación en la tabla 6.

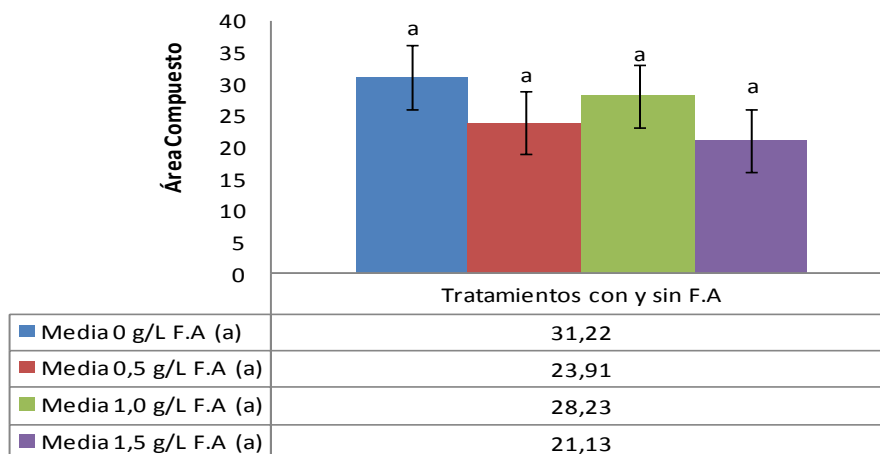
Tabla 6. Porcentaje hallado mediante HPLC para los últimos tres días de la fermentación con concentraciones de 0.5 g/L, 1.0 g/L y 1.5 g/L de F.A y 50 g/L de glucosa con un tiempo de retención entre 6.2 y 7.2 minutos

Día	Glucosa 50 g/L + F.A	% Área (compuesto Tr=6.2-7.2)
12	0	43.15
12	0.5	29.31
12	1	62.36
12	1.5	8.47
13	0	32.57
13	0.5	75.49
13	1	47.90
13	1.5	27.21
14	0	48.22
14	0.5	38.63
14	1	58.01
14	1.5	21.02

Al detallar la tabla 6, puede observarse que el ensayo que mayor porcentaje de área arrojó fue el que contenía 0.5 g/L de F.A, arrojando su máximo porcentaje correspondiente a 75.5% el día 13. Aun así, las diferencias existentes entre ellos, no fueron significativas.

Ahora bien, al analizarlos estadísticamente, se encontró que la producción del alcaloide en presencia de F.A, presentó la misma tendencia que los ensayos analizados anteriormente sin ésta; pero gracias a que este aminoácido duplico la cantidad de biomasa y debido a que el compuesto de interés se produce intracelularmente, se afirma que el uso de F.A aumentó la generación del compuesto evaluado (Anexo 12).

El gráfico 24 presenta las diferentes medias en cuanto al porcentaje de área del compuesto presente entre 6.2 y 7.2 minutos para los diferentes tratamientos de glucosa a una concentración de 50 g/L y sus concentraciones respectivas de F.A. Claramente se ve que sólo existe un grupo homogéneo lo que reafirma que no existen diferencias significativas de la producción con respecto a las concentraciones de F.A.



Letras diferentes denotan diferencias significativas (prueba LSD)

Gráfico 24. Área del compuesto obtenido de *P. cubensis* en tiempo de retención entre 6.2 y 7.2 minutos para cada una de las concentraciones de F.A utilizadas

Debido a que no se encontraron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de área obtenido mediante los cromatogramas, se concluye que el mejor medio es el que tiene como fuente de carbono, glucosa a una concentración de 50 g/L y una adición de 0.5 g/L de F.A, puesto que genera una disminución en costos.

CONCLUSIONES

- No existen diferencias significativas en el crecimiento micelial de *P. cubensis* en medio sumergido Fang-Zhong cuando se trabaja con fuentes de carbono glucosa y sacarosa; sin embargo, se decide trabajar con 50 g/L de glucosa puesto que éste tiene una buena presencia de alcaloide y a su vez, una mejor producción de biomasa.
- La concentración de glucosa utilizada para el crecimiento de *P. cubensis* influye en el crecimiento micelial, obteniendo concentraciones de biomasa de 0.62 g/L, 0.55 g/L y 0.48 g/L para concentraciones de sustrato de 70, 50 y 30 g/L de glucosa, siendo las dos primeras significativamente diferentes con respecto a la de 30 g/L.
- La concentración de sacarosa utilizada para el crecimiento de *P. cubensis* influye en el crecimiento micelial, obteniendo concentraciones de biomasa de 0.57 g/L, 0.45 g/L y 0.26 g/L para concentraciones de sustrato de 70, 50 y 30 g/L de sacarosa; siendo significativamente diferentes entre ellas.
- La resolución de los picos obtenidos por RP-HPLC del extracto de *P. cubensis* fue mayor para las fermentaciones realizadas con una concentración de 50 g/L de glucosa; lo que conllevó a utilizarlo al realizar los ensayos que contenían en el medio F.A.
- La concentración de biomasa de *P. cubensis* obtenida en cultivo sumergido en medio Fang-Zhong con glucosa se duplicó con la adición de F.A. No obstante no existen diferencias significativas entre las concentraciones de F.A utilizadas.

- El consumo de proteína presentada por *P. cubensis* en medio Fang-Zhong fue casi del 100 %; mientras que el consumo de sustrato para el mismo medio estuvo alrededor del 40%.
- El consumo de sustrato durante el transcurso de las fermentaciones que no contenían F.A en el medio no presentó diferencias significativas con respecto a las dos fuentes de carbono utilizadas. Mientras que en aquellas fermentaciones donde se agregó F.A al medio sí existieron diferencias significativas entre las fermentaciones de 1.5 y 1 g/L de F.A con respecto a los ensayos realizados con 0.5 g/L F.A. Sin embargo, el *P. cubensis* consumió mayor cantidad de sustrato cuando el medio no contenía F.A.
- Se evidenció que el *P. cubensis* consumió mayor cantidad de proteína cuando el sustrato utilizado en el medio fue glucosa, y a su vez se detectó que la adición de F.A al medio tuvo como efecto la disminución en el consumo de sustrato por parte del microorganismo.
- El consumo de sustrato y de proteína tuvo un comportamiento similar puesto que fue consumido permanentemente durante la fase exponencial para cada uno de los tratamientos realizados; es decir, las concentraciones de 30 g/L, 50 g/L y 70 g/L de glucosa y sacarosa como fuente de carbono y de 0.5 g/L, 1 g/L y 1.5 g/L de F.A, teniendo como fuente de carbono glucosa a una concentración de 50 g/L; mientras que en la fase estacionaria su consumo se disminuyó, permaneciendo casi constante.
- Después de realizados los estudios en cuanto a la producción del compuesto presente entre 6.2 y 7.2 minutos para cada uno de los ensayos, no se evidenciaron diferencias significativas entre las dos fuentes de carbono utilizadas (glucosa y sacarosa).

- La adición del precursor llamado Fenilalanina (F.A) al medio sumergido Fang-Zhong para llevar a cabo el cultivo del *P. cubensis* tuvo influencia en cuanto a la producción de compuesto presente entre tiempo de retención de 6.2 y 7.2 minutos, debido a que éste duplicó la concentración de biomasa en el medio se dice entonces que la producción aumentó al ser éste de producción intracelular.
- La resolución del compuesto presente entre el tiempo de retención de 6.2 a 7.2 minutos, se obtuvo mejor en el ensayo que contenía 0.5 g/L de F.A; y, al saber que no existieron diferencias significativas en la producción en cuanto al porcentaje de áreas obtenido con respecto a las demás concentraciones de F.A, se afirma que éste es el medio que mejores resultados arrojó para el crecimiento de *P. cubensis* y la producción de *Psilocibina*.

RECOMENDACIONES

- Se sugiere observar el efecto que tiene la variación de las revoluciones a las cuales se realizaron las fermentaciones para ver como varía el crecimiento del *P. cubensis* en medio sumergido Fang-Zhong con respecto a dicho factor.
- Debido a que sólo se realizaron análisis sobre el crecimiento del *P. cubensis* en medio sumergido haciendo uso de dos sustratos diferentes (glucosa y sacarosa), sería recomendable realizar el mismo análisis para otro tipo de sustrato como por ejemplo melaza, por su bajo costo.
- Del mismo modo, sería apropiado realizar el estudio con otro tipo de precursor y en otras concentraciones, para ver la incidencia de éste en el comportamiento del hongo.
- Se recomienda realizar un escalamiento de dicho proceso en un biorreactor, con el fin, de evaluar a mayor escala el crecimiento del *P. cubensis* y la producción del alcaloide.
- Debido a que la proteína se comportó como el principal nutriente, se sugiere para una próxima investigación, evaluar diferentes concentraciones de proteína en el medio.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza (ANOVA) para el crecimiento de biomasa de las fermentaciones con glucosa

Tabla 7. Análisis de Varianza para el crecimiento micelial (glucosa)

Análisis de la Varianza para Biomasa Glucosa - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	0.119299	2	0.0596495	26.69	0.0000
B:Día	1.10762	14	0.0791159	35.40	0.0000
RESIDUOS	0.0625757	28	0.00223485		
TOTAL (CORREGIDO)	1.2895	44			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla 8. Análisis Múltiple de Rangos para el crecimiento micelial (glucosa)

Contraste Múltiple de Rangos para Biomasa Glucosa según Concentración

Método: 95.0 porcentaje LSD				
Concentración	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
30	15	0.223333	0.0122061	X
50	15	0.319533	0.0122061	X
70	15	0.342067	0.0122061	X
Contraste		Diferencias		+/- Límites
30 - 50		*-0.0962		0.0353598
30 - 70		*-0.118733		0.0353598
50 - 70		-0.0225333		0.0353598

* indica una diferencia significativa.

Anexo 2. Análisis de Varianza (ANOVA) para el crecimiento de biomasa de las fermentaciones con sacarosa

Tabla 9. Análisis de Varianza para el crecimiento micelial (sacarosa)

Análisis de la Varianza para Biomasa Sacarosa - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	0.394936	2	0.197468	74.73	0.0000
B:Día	0.544259	14	0.0388756	14.71	0.0000
RESIDUOS	0.0739844	28	0.0026423		
TOTAL (CORREGIDO)	1.01318	44			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla 10. Análisis Múltiple de Rangos para el crecimiento micelial (sacarosa)

Contraste Múltiple de Rangos para Biomasa Sacarosa según Concentración				
Método: 95.0 porcentaje LSD				
Concentración	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
30	15	0.203133	0.0132723	X
50	15	0.3194	0.0132723	X
70	15	0.4326	0.0132723	X
Contraste			Diferencias	+/- Límites
30 - 50			*-0.116267	0.0384483
30 - 70			*-0.229467	0.0384483
50 - 70			*-0.1132	0.0384483

* indica una diferencia significativa.

Anexo 3. Análisis de Varianza (ANOVA) para el crecimiento de biomasa de las fermentaciones con glucosa y sacarosa

Tabla 11. Análisis de Varianza para el crecimiento micelial (glucosa y sacarosa)

Análisis de la Varianza para Biomasa - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo	0.0123201	1	0.0123201	2.45	0.1217
B:Concentración	0.462022	2	0.231011	45.99	0.0000
C:Día	1.47898	14	0.105642	21.03	0.0000
RESIDUOS	0.361669	72	0.00502317		
TOTAL (CORREGIDO)	2.315	89			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla 12. Análisis Múltiple de Rangos para el crecimiento micelial (glucosa y sacarosa)

Contraste Múltiple de Rangos para Biomasa según Tipo

Método: 95.0 porcentaje LSD				
Tipo	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Glucosa	45	0.294978	0.0105653	X
Sacarosa	45	0.318378	0.0105653	X
Contraste			Diferencias	+/- Límites
Glucosa - Sacarosa			-0.0234	0.0297856

* indica una diferencia significativa.

Anexo 4. Análisis de Varianza (ANOVA) para el crecimiento de biomasa de las fermentaciones con glucosa 50 g/L y F.A

Tabla 13. Análisis de Varianza para el crecimiento micelial (glucosa 50 g/L y F.A)

Análisis de la Varianza para Biomasa - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	1.37882	3	0.459606	75.35	0.0000
B:Día	3.92714	14	0.28051	45.99	0.0000
RESIDUOS	0.256194	42	0.00609986		
TOTAL (CORREGIDO)	5.56215	59			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla 14. Análisis Múltiple de Rangos para el crecimiento micelial (glucosa 50 g/L y F.A)

Contraste Múltiple de Rangos para Biomasa según Concentración

Método: 95.0 porcentaje LSD				
Concentración	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	15	0.319533	0.0201657	X
0.5	15	0.654933	0.0201657	X
1	15	0.656467	0.0201657	X
1.5	15	0.692333	0.0201657	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
0 - 0.5	*-0.3354	0.0575531
0 - 1	*-0.336933	0.0575531
0 - 1.5	*-0.3728	0.0575531
0.5 - 1	-0.00153333	0.0575531
0.5 - 1.5	-0.0374	0.0575531
1 - 1.5	-0.0358667	0.0575531

* indica una diferencia significativa.

Anexo 5. Análisis de varianza (ANOVA) para el consumo de sustrato en las fermentaciones sin F.A

Tabla 15. Análisis de Varianza para el consumo de Sustrato sin F.A

Análisis de la Varianza para DNS - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo	136.527	1	136.527	3.13	0.0811
B:Sustrato	9342.93	2	4671.47	107.12	0.0000
C:Día	2991.83	14	213.702	4.90	0.0000
RESIDUOS	3140.04	72	43.6117		
TOTAL (CORREGIDO)	15611.3	89			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla 16. Análisis Múltiple de Rangos para el consumo de Sustrato sin F.A

Contraste Múltiple de Rangos para DNS según Tipo				
Método: 95.0 porcentaje LSD				
Tipo	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Glucosa	45	34.3131	0.984453	X
Sacarosa	45	36.7764	0.984453	X
Contraste			Diferencias	+/- Límites
Glucosa - Sacarosa			-2.4633	2.77536

* indica una diferencia significativa.

Anexo 6. Análisis de Varianza (ANOVA) para el consumo de sustrato en las fermentaciones con F.A

Tabla 17. Análisis de Varianza para el consumo de Sustrato con F.A

Análisis de la Varianza para DNS - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	923.145	3	307.715	15.47	0.0000
B:Día	931.594	14	66.5424	3.34	0.0012
RESIDUOS	835.56	42	19.8943		
TOTAL (CORREGIDO)	2690.3	59			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla 18. Análisis Múltiple de Rangos para el consumo de Sustrato con F.A

Contraste Múltiple de Rangos para DNS según Concentración				
Método: 95.0 porcentaje LSD				
Concentración	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	15	35.6439	1.15164	X
1	15	41.3084	1.15164	X
1.5	15	42.6089	1.15164	X
0.5	15	46.5996	1.15164	X
Contraste	Diferencias		+/- Límites	
0 - 0.5	*-10.9557		3.2868	
0 - 1	*-5.66453		3.2868	
0 - 1.5	*-6.957		3.2868	
0.5 - 1	*5.2912		3.2868	
0.5 - 1.5	*3.99873		3.2868	
1 - 1.5	-1.29247		3.2868	

* indica una diferencia significativa.

Anexo 7. Análisis de Varianza (ANOVA) para el consumo de proteína en las fermentaciones sin F.A

Tabla 19. Análisis de Varianza para el consumo de Proteína sin F.A

Análisis de la Varianza para Lowry - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Sustrato	46.5472	1	46.5472	7.75	0.0069
B:Concentración	32.1579	2	16.079	2.68	0.0757
C:Día	958.619	14	68.4728	11.40	0.0000
RESIDUOS	432.612	72	6.0005		
TOTAL (CORREGIDO)	1469.94	89			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla 20. Análisis Múltiple de Rangos para el consumo de Proteína sin F.A

Contraste Múltiple de Rangos para Lowry según Sustrato				
Método: 95.0 porcentaje LSD				
Sustrato	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Glucosa	45	4.65387	0.365407	X
Sacarosa	45	6.09219	0.365407	X
Contraste			Diferencias	+/- Límites
Glucosa - Sacarosa			*-1.43832	1.03015

* indica una diferencia significativa.

Anexo 8. Análisis de Varianza (ANOVA) para el consumo de proteína en las fermentaciones con F.A

Tabla 21. Análisis de Varianza para el consumo de Proteína con F.A

Análisis de la Varianza para LOWRY - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo	61.6074	2	30.8037	7.86	0.0006
B:DÍA	1159.1	14	82.793	21.12	0.0000
RESIDUOS	462.555	118	3.91995		
TOTAL (CORREGIDO)	1683.26	134			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla 22. Análisis Múltiple de Rangos para el consumo de Proteína con F.A

Contraste Múltiple de Rangos para LOWRY según Tipo				
Método: 95.0 porcentaje LSD				
Tipo	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Sacarosa	45	4.67756	0.295144	X
Glucosa	45	4.73004	0.295144	X
Fenilalanina	45	6.13611	0.295144	X
Contraste			Diferencias	+/- Límites
Fenilalanina - Glucosa			*1.40607	0.826561
Fenilalanina - Sacarosa			*1.45856	0.826561
Glucosa - Sacarosa			0.0524889	0.826561

* indica una diferencia significativa.

Anexo 9. Análisis de Varianza (ANOVA) para la producción de *Psilocibina* en las fermentaciones sin F.A

Tabla 23. Análisis de Varianza para la producción de *Psilocibina* sin F.A

Análisis de la Varianza para Alcaloide - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo	4.61139E8	1	4.61139E8	1.03	0.3310
B:Día	3.87264E7	2	1.93632E7	0.04	0.9580
C:Concentración	1.66058E8	2	8.30291E7	0.18	0.8336
RESIDUOS	5.39061E9	12	4.49218E8		
TOTAL (CORREGIDO)	6.05653E9	17			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla 24. Análisis Múltiple de Rangos para la producción de *Psilocibina* según el Sustrato sin F.A

Contraste Múltiple de Rangos para Alcaloide según Tipo

Método: 95.0 porcentaje LSD				
Tipo	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Sacarosa	9	23591.6	7064.92	X
Glucosa	9	33714.7	7064.92	X
Contraste			Diferencias	+/- Límites
Glucosa - Sacarosa			10123.0	21769.2

* indica una diferencia significativa.

Anexo 10. Análisis de Varianza (ANOVA) para la producción de *Psilocibina* en las fermentaciones con F.A

Tabla 25. Análisis de Varianza para la producción de *Psilocibina* con F.A

Análisis de la Varianza para Área - Sumas de Cuadrados de Tipo III						
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor	
EFFECTOS PRINCIPALES						
A:Día	5.19805E7	2	2.59903E7	0.12	0.8855	
B:Concentración	1.07821E9	5	2.15642E8	1.02	0.4547	
RESIDUOS	2.11133E9	10	2.11133E8			
TOTAL (CORREGIDO)	3.24152E9	17				

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla 26. Análisis Múltiple de Rangos para la producción de *Psilocibina* según el día con F.A

Contraste Múltiple de Rangos para Área según Día				
Método: 95.0 porcentaje LSD				
Día	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
13	6	41175.8	5932.01	X
15	6	41340.1	5932.01	X
14	6	44860.0	5932.01	X
Contraste			Diferencias	+/- Límites
13 - 14			-3684.22	18692.2
13 - 15			-164.3	18692.2
14 - 15			3519.92	18692.2

* indica una diferencia significativa.

Anexo 11. Análisis de Varianza (ANOVA) para la cuantificación porcentual de *Psilocibina* en las fermentaciones sin F.A

Tabla 27. Análisis de Varianza para la cuantificación de *Psilocibina* sin F.A

Análisis de la Varianza para Alcaloide - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo	97984.4	1	97984.4	0.09	0.7673
B:Concentración	3.7537E6	2	1.87685E6	1.76	0.2144
C:Día	2.34054E6	2	1.17027E6	1.09	0.3659
RESIDUOS	1.28286E7	12	1.06905E6		
TOTAL (CORREGIDO)	1.90208E7	17			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla 28. Análisis Múltiple de Rangos para la cuantificación de *Psilocibina* según el tipo de sustrato sin F.A

Contraste Múltiple de Rangos para Alcaloide según Tipo				
Método: 95.0 porcentaje LSD				
Tipo	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Sacarosa	9	2196.35	344.65	X
Glucosa	9	2343.91	344.65	X
Contraste			Diferencias	+/- Límites
Glucosa - Sacarosa			147.561	1061.97

* indica una diferencia significativa.

Anexo 12. Análisis de Varianza (ANOVA) para la cuantificación porcentual de *Psilocibina* en las fermentaciones con F.A

Tabla 29. Análisis de Varianza para la cuantificación de *Psilocibina* con F.A

Análisis de la Varianza para Alcaloide - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	147.778	3	49.2592	0.57	0.6565
B:Día	35.204	2	17.602	0.20	0.8219
RESIDUOS	520.902	6	86.817		
TOTAL (CORREGIDO)	681.08	11			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla 30. Análisis Múltiple de Rangos para la cuantificación de *Psilocibina* según la concentración con F.A

Contraste Múltiple de Rangos para Alcaloide según Concentración				
Método: 95.0 porcentaje LSD				
Concentración	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1.5	2	21.1255	6.89512	X
0.5	3	23.905	5.3795	X
1	4	28.2288	4.76842	X
0	3	31.2186	5.3795	X
Contraste			Diferencias	+/- Límites
0 - 0.5			7.3136	18.6156
0 - 1			2.98979	17.5901
0 - 1.5			10.0931	21.3992
0.5 - 1			-4.3238	17.5901
0.5 - 1.5			2.77952	21.3992
1 - 1.5			7.10332	21.1081

* indica una diferencia significativa.

Anexo 13. Determinación de consumo de azúcares por el método de DNS (Ácido Dinitrosalicílico)

a. DNS para glucosa

Pasos para preparar DNS:

- Disolver 1.6 gr de NaOH en agua destilada
- Adicionar 30 gr de tartrato de Na y K
- Aforar a 100 ml con agua destilada
- Almacenar en frascos ámbar a 4°C

Se debe mantener un stock de glucosa 4mg/ml y almacenarlo a 4°C. A partir de la solución de glucosa se preparan las soluciones para hacer la curva patrón con las siguientes concentraciones (g/L): 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 y 4.00

Procedimiento:

- Tomar 0.5 ml de cada dilución y agregar 0.5 ml de reactivo DNS.
- Preparar una muestra blanco por dilución de 0.5 ml de agua destilada a 0.5 ml de reactivo de DNS.
- Agitar todas las muestras.
- Colocar a ebulir las muestras en baño maría por cinco minutos.
- Enfriar con hielo.
- Adicionar 5 ml de agua destilada.
- Agitar y dejar en reposo 15 minutos.
- Leer en espectrofotómetro a 540 nm.
- Realizar la curva Absorbancia Vs Concentración. Debe tener un coeficiente de correlación de 0.991 a 0.999.

b. DNS para sacarosa

Pasos para preparar DNS sacarosa:

- Preparación de la solución Standard stock de sacarosa (30 g/L): tomar 3.0 gr de sacarosa anhídrida grado reactivo con exactitud hasta la décima de mg, disolver, ajustar a aforo de 100 ml con agua desionizada, empacar en viales y almacenar en congelador.
- **Preparación DNS:** pesar 1,6 gr de hidróxido de sodio grado reactivo, 30 gr de tartrato de sodio y potasio y disolverlos juntos con 50 ml de agua

desionizada, aparte pesar 1.0 gr del DNS, disolver con 30 ml de agua desionizada, agregar lentamente y con agitación la solución del DNS a la solución de tartrato y NaOH anteriormente preparadas, ajustar a 100 ml, filtrar, envasar en frasco ámbar y rotular con fecha de vencimiento incluida (3 meses máximo), mantener a la temperatura del laboratorio.

- **Preparación del reactivo NaOH 1.0 N (500 ml):** pesar con exactitud hasta la décima de mg; 20 gr de NaOH grado reactivo por cada 500 ml de solución, disolver primero con 300 ml de agua desionizada y luego aforar a 500 ml, envasar y rotular correctamente y mantener a la temperatura del laboratorio.
- **Preparación de HCL 10% (100 ml):** tomar 27 ml de ácido clorhídrico al 37% grado reactivo y aforar hasta 100 ml con agua desionizada, envasar, rotular correctamente de acuerdo a la norma del laboratorio y almacenar a la temperatura del laboratorio.

Se debe mantener un stock de glucosa 30 g/L y almacenarlo a 4°C. A partir de la solución de glucosa se preparan las soluciones para hacer la curva patrón con las siguientes concentraciones (g/L): 3, 6, 12, 18, 24 y 30.

Procedimiento:

- Preparar en cada tubo (las soluciones de la curva patrón de sacarosa, las muestras problemas diluidas si es necesario y como blanco agua desionizada) 100µl de solución.
- Adicionar 200 µl de HCL 10% a cada tubo y agitar todos los tubos en vortex.
- Llevar a ebullición por 10 minutos en baño maría precalentado a 95°C.
- Enfriar hasta temperatura ambiente rápidamente.
- Adicionar a cada tubo 1 ml de NaOH 1.0 N y agitar los tubos en vortex.
- Aparte tomar 0.5 ml de cada tubo en otros tubos rotulados y agregar 0.5 ml del DNS.
- Agitar todas las muestras en vortex.
- Llevar a ebullición por 5 minutos en baño maría precalentado a 96°C.
- Enfriar hasta temperatura ambiente rápidamente.
- Adicionar 5 ml de H₂O desionizada, agitar en vortex y dejar reposar por 15 minutos.
- Leer en espectrofotómetro a 540 nm.
- Realizar la curva Absorbancia Vs Concentración. Debe tener un coeficiente de correlación de 0.991 a 0.999

Anexo 14. Cinética de Consumo de Sustrato

La cinética de consumo de sustrato se realizó por el método de Ácido Dinitrosalicílico (DNS). Los rangos de concentración y absorbancia para cada caso se citan a continuación.

- *Rangos de concentraciones y absorbancias para las fermentaciones que usaron glucosa (30 g/L, 50 g/L y 70 g/L) como sustrato:*
Concentración: de 0,2 a 1,2 g/L
Absorbancia: de 0,1234 a 0,6612
Ecuación: $Y = 1,9174x - 0,0517$ $R^2 = 0,9923$
- *Rangos de concentraciones y absorbancias para las fermentaciones que usaron sacarosa (30 g/L, 50 g/L y 70 g/L) como sustrato:*
Concentración: de 3 a 30 g/L
Absorbancia: de 0,0822 a 1,1112
Ecuación: $Y = 25,983x + 0,4857$ $R^2 = 0,9978$
- *Rangos de concentraciones y absorbancias para las fermentaciones que usaron glucosa 50 g/L como sustrato y F.A:*
Concentración: de 0,2 a 1,2 g/L
Absorbancia: de 0,097 a 0,63
Ecuación: $Y = 1,8785x + 0,0019$ $R^2 = 0,9986$

Anexo 15. Determinación de consumo de proteínas por el método de LOWRY

Pasos para la preparación de LOWRY

- Para obtener la curva estándar de Albúmina se preparan 5 soluciones patrones de Albúmina en NaCL al 0.9% (P/V) de las siguientes concentraciones: 15.2, 80, 200, 300, 400 Pg/ml. Si la concentración de Proteína total es menor de 500 Pg/ml se lee la absorbancia a 750 nm, si está entre 1000 y 2000 Pg/ml se lee a 550nm.
- Se prepara un blanco que no lleva Albúmina y en su reemplazo se adiciona 0-5 ml de solución salina (NaCL) al 0.9 % (P/V). Se aplica el mismo procedimiento que a las demás muestras.

Procedimiento

- Servir en tubos de ensayo 0.5 ml de las soluciones patrón de Albúmina, las muestras problema y NaCL al 0.9% como blanco. Deben estar marcados para conservar el orden de concentraciones para la curva.
- Adicionar a cada tubo 0.5 ml de NaOH 2N y llevar al baño María precalentado a 100°C por un tiempo de 10 minutos.
- Dejar enfriar hasta que alcance la Temperatura Ambiente.
- Agregar a cada tubo 5 ml de la solución complejante, mezclar y dejar reposar por 10 minutos.
- Adicionar 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu 1:1, vortexiar durante 20 segundos.
- Reposar en un cuarto oscuro durante 30 minutos.
- Leer la absorbancia a 750 nm y con las soluciones patrón construir la gráfica Absorbancia Vs. Concentración de Albúmina Sérica de Bovina (BSA); con ésta se puede determinar la concentración de las muestras problema interpolando el valor de la Absorbancia. La curva estándar debe tener un coeficiente de correlación de 0.991 a 0.999

Anexo 16. Cinética consumo de Proteína

La cinética de consumo de proteína se realizó por el método LOWRY. Los rangos de concentración y absorbancia para cada caso se citan a continuación.

- *Rangos de concentraciones y absorbancias para las fermentaciones que usaron glucosa (30 g/L, 50 g/L y 70 g/L) como sustrato:*
Concentración: de 0,016 a 0,4 g/L
Absorbancia: de 0,0094 a 0,5382
Ecuación: $Y = 0,7427x - 0,0021$ $R^2 = 0,9955$
- *Rangos de concentraciones y absorbancias para las fermentaciones que usaron sacarosa (30 g/L, 50 g/L y 70 g/L) como sustrato:*
Concentración: de 0,016 a 0,4 g/L
Absorbancia: de 0,0374 a 0,6178
Ecuación: $Y = 0,6567x - 0,0166$ $R^2 = 0,9968$
- *Rangos de concentraciones y absorbancias para las fermentaciones que usaron glucosa 50 g/L como sustrato y F.A:*
Concentración: de 0,016 a 0,4 g/L
Absorbancia: de 0,0708 a 0,4647
Ecuación: $Y = 0,9814x - 0,0581$ $R^2 = 0,9992$

Anexo 17. Prueba de reactivo de Dragendorff

- **Preparación de reactivo de Dragendorff para alcaloides:**

Reactivo de Dragendorff: se prepara mezclando 8 gr de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico al 30% con una solución de 27.2 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua. Se deja en reposo por 24 horas, se decanta y se afora a 100 ml. La presencia de alcaloides se detecta por la formación de un precipitado naranja rojizo cuando se le adiciona esta reactivo a una solución ácida de alcaloides. De los precipitados lavados se puede recuperar los alcaloides con una solución saturada de carbonato de sodio (Mercano y Hasegawa, 1991).

La figura mostrada a continuación refleja la presencia del alcaloide debido a la coloración amarillo-rojiza que ésta sufrió.



Figura 8. Muestra de biomasa una vez analizada mediante el reactivo de Dragendorff

Anexo 18. Barrido Espectral para el *Psilocybe cubensis*

La metodología mencionada a continuación está basada en artículo base (Tsujikawa *et al.*, 2003)

El Sistema de HPLC consiste en un Shimadzu LC-10^a Series Cromatografía Líquida equipada con un diodo SPD-M10A detector de red fija en 220nm. La separación cromatográfica se realizó con una columna simétrica C18 (2:1 mm a 150 mm, 5mm, Waters Assoc, Milford, EE.UU.

La fase móvil utilizada fue de 10 mM de formato de amonio-ácido fórmico (95:5 V/V) a un pH de 3.5 y bombeado a un caudal de 0.2 ml/minuto.

El perfil cromatográfico obtenido durante la investigación de Tsujikawa *et al.*, (2003) se muestra en la figura 6 que aparece a continuación.

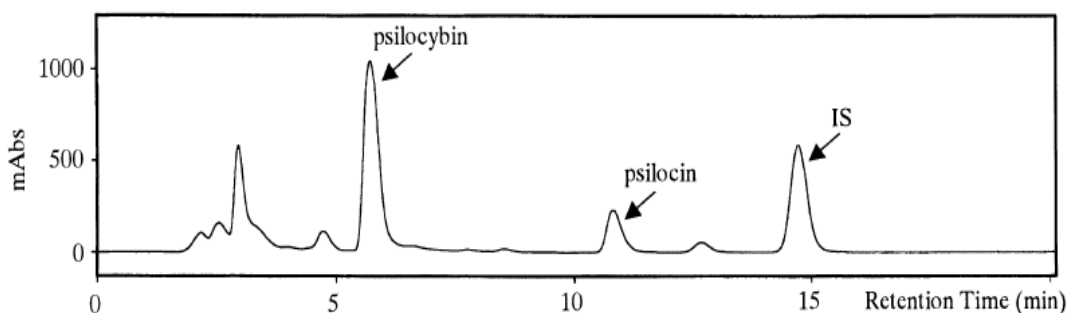
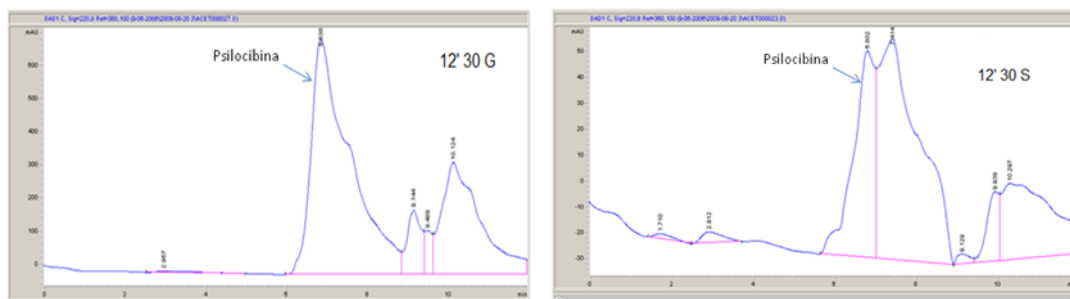


Figura 9. Perfil cromatográfico (Tsujikawa *et al.*, 2003)

Anexo 19. Cromatogramas (HPLC) del día 12 de fermentación

Tabla 31. Áreas obtenidas de los cromatogramas para el *P. cubensis* en medio Fang-Zhong en el día 12 para concentraciones de 30g/L glucosa y 30g/L sacarosa

Sustrato	Concentración (g/L)	Tiempo (s)	Área
Glucosa	30	2.957	383.7
Glucosa	30	6.838	47475.3
Glucosa	30	9.144	4725.6
Glucosa	30	9.489	1682.2
Glucosa	30	10.124	22434.9
Sacarosa	30	6.538	14377.2
Sacarosa	30	7.234	26945.8
Sacarosa	30	9.721	33646
Sacarosa	30	11.845	2438.4



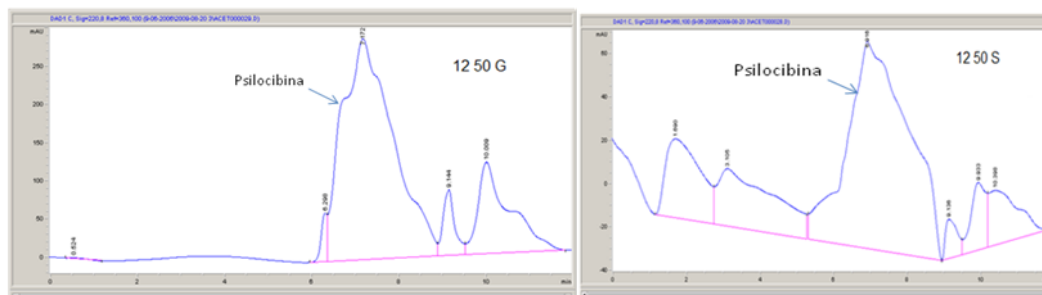
(a)

(b)

Gráfico 25. Cromatogramas del día 12 para el *P. cubensis* cultivado en medio sumergido Fang-Zhong con dos diferentes tipos de sustratos (a) 30 g/L glucosa (b) 30 g/L sacarosa

Tabla 32. Áreas obtenidas de los cromatogramas para el *P. cubensis* en medio Fang-Zhong en el día 12 para concentraciones de 50g/L glucosa y 50g/L sacarosa

Sustrato	Concentración (g/L)	Tiempo (s)	Área
Glucosa	50	0.524	31.9
Glucosa	50	6.298	599.1
Glucosa	50	7.172	23704.2
Glucosa	50	9.144	1638.7
Glucosa	50	10.009	6077
Sacarosa	50	1.69	2401.1
Sacarosa	50	3.105	2857.3
Sacarosa	50	6.916	11216.6
Sacarosa	50	9.136	405.7
Sacarosa	50	9.933	882.1
Sacarosa	50	10.398	1387.2



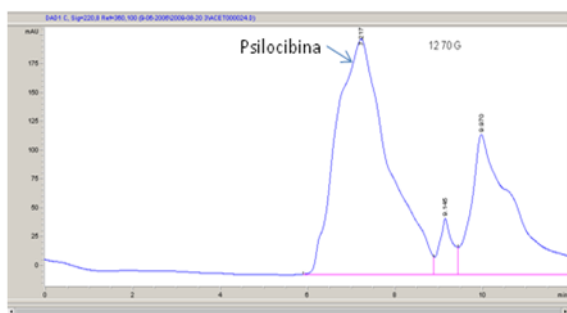
(a)

(b)

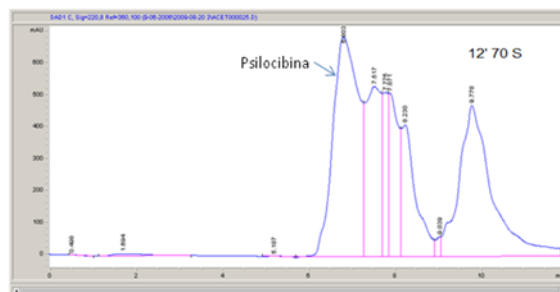
Gráfico 26. Cromatogramas del día 12 para el *P. cubensis* cultivado en medio sumergido Fang-Zhong con dos diferentes tipos de sustratos (a) 50 g/L glucosa (b) 50 g/L sacarosa

Tabla 33. Áreas obtenidas de los cromatogramas para el *P. cubensis* en medio Fang-Zhong en el día 12 para concentraciones de 50g/L glucosa y 50g/L sacarosa

Sustrato	Concentración (g/L)	Tiempo (s)	Área
Glucosa	70	7.217	16859.8
Glucosa	70	9.145	997.7
Glucosa	70	9.97	8055.8
Sacarosa	70	6.803	28738.7
Sacarosa	70	7.517	13104.9
Sacarosa	70	7.775	4434
Sacarosa	70	7.871	7710.9
Sacarosa	70	8.23	9623.9
Sacarosa	70	9.039	511.4
Sacarosa	70	9.778	25394



(a)

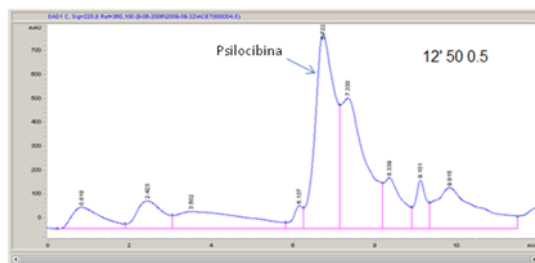


(b)

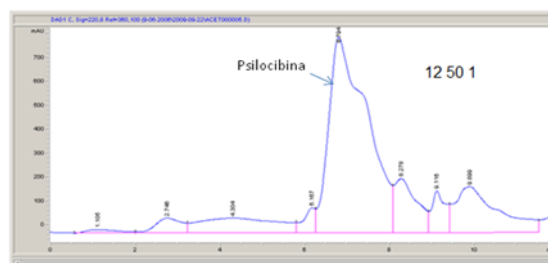
Gráfico 27. Cromatogramas del día 12 para el *P. cubensis* cultivado en medio sumergido Fang-Zhong con dos diferentes tipos de sustratos (a) 50 g/L glucosa (b) 50 g/L sacarosa

Tabla 34. Áreas obtenidas de los cromatogramas para el *P. cubensis* en medio Fang-Zhong en el día 12 para concentraciones de 50g/L y glucosa 50g/L sacarosa

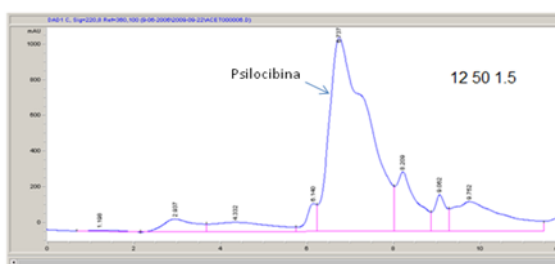
Sustrato	Concentración (g/L)	Tiempo (s)	Área
Glucosa 50	0.5	0.818	4722
Glucosa 50	0.5	2.423	5257.9
Glucosa 50	0.5	3.502	8876.5
Glucosa 50	0.5	6.137	1600.9
Glucosa 50	0.5	6.722	27525.8
Glucosa 50	0.5	7.33	22639.9
Glucosa 50	0.5	8.339	6513.9
Glucosa 50	0.5	9.101	3679.7
Glucosa 50	0.5	9.815	13088.3
Glucosa 50	1	1.105	743
Glucosa 50	1	2.746	2701
Glucosa 50	1	4.304	8030.4
Glucosa 50	1	6.167	1964.9
Glucosa 50	1	6.794	51753
Glucosa 50	1	8.282	8299.7
Glucosa 50	1	9.116	3865.9
Glucosa 50	1	9.899	13695.3
Glucosa 50	1.5	1.198	331.3
Glucosa 50	1.5	2.937	3787.5
Glucosa 50	1.5	4.332	5107.9
Glucosa 50	1.5	6.14	2560.2
Glucosa 50	1.5	6.737	66890.5
Glucosa 50	1.5	8.209	10733.2
Glucosa 50	1.5	9.602	3890.2
Glucosa 50	1.5	9.752	13961.3



(a)



(b)



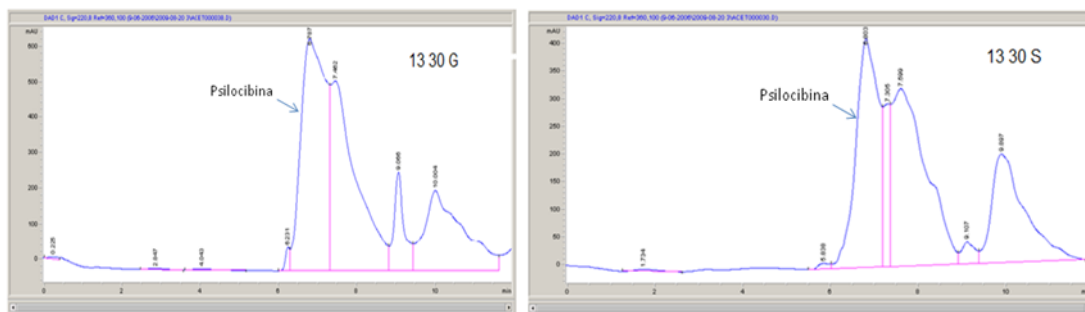
(c)

Gráfico 28. Cromatograma del día 12 para el *P. cubensis* cultivado en medio sumergido Fang-Zhong con fuente de carbono glucosa y adición de fenilalanina en tres concentraciones. (a) 0.5 g/L F.A (b) 1 g/L F.A (c) 1.5g/L F.A

Anexo 20. Cromatogramas (HPLC) del día 13 de fermentación

Tabla 35. Áreas obtenidas de los cromatogramas para el *P. cubensis* en medio Fang-Zhong en el día 13 para concentraciones de 30g/L glucosa y 30g/L sacarosa

Sustrato	Concentración (g/L)	Tiempo (s)	Área
Glucosa	30	0.225	115.5
Glucosa	30	2.847	69.9
Glucosa	30	4.043	103.8
Glucosa	30	6.231	499.4
Glucosa	30	6.787	29518.2
Glucosa	30	7.462	24114.6
Glucosa	30	9.066	5183.6
Glucosa	30	10.004	15874.6
Sacarosa	30	1.734	135
Sacarosa	30	5.838	185.7
Sacarosa	30	6.803	14786.7
Sacarosa	30	7.305	3046.4
Sacarosa	30	7.599	17464.3
Sacarosa	30	9.107	856.4
Sacarosa	30	9.897	10427.8



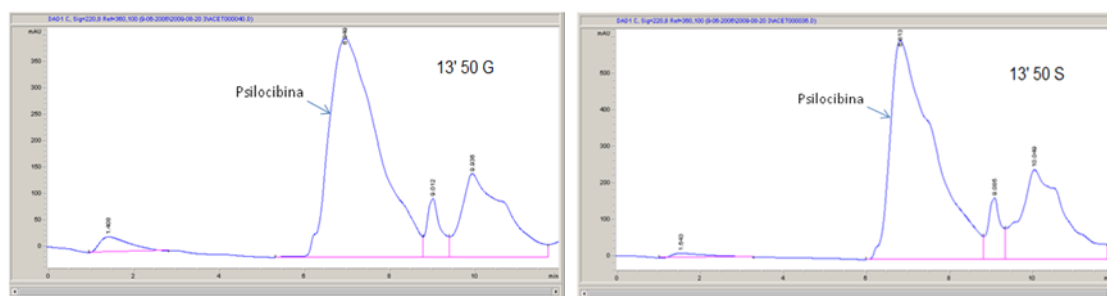
(a)

(b)

Gráfico 29. Cromatogramas del día 13 para el *P. cubensis* cultivado en medio sumergido Fang-Zhong con dos diferentes tipos de sustratos (a) 30 g/L glucosa (b) 30 g/L sacarosa

Tabla 36. Áreas obtenidas de los cromatogramas para el *P. cubensis* en medio Fang-Zhong en el día 13 para concentraciones de 50g/L glucosa y 50g/L sacarosa

Sustrato	Concentración (g/L)	Tiempo (s)	Área
Glucosa	50	1.408	1398.2
Glucosa	50	6.949	33144.9
Glucosa	50	9.012	2520.1
Glucosa	50	9.936	2721.6
Sacarosa	50	1.543	729.3
Sacarosa	50	6.813	43776.5
Sacarosa	50	9.085	3589.7
Sacarosa	50	10.049	18446.1



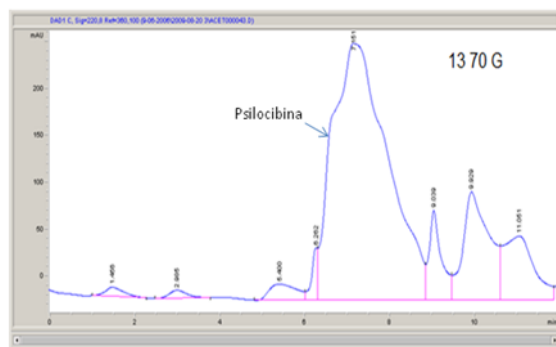
(a)

(b)

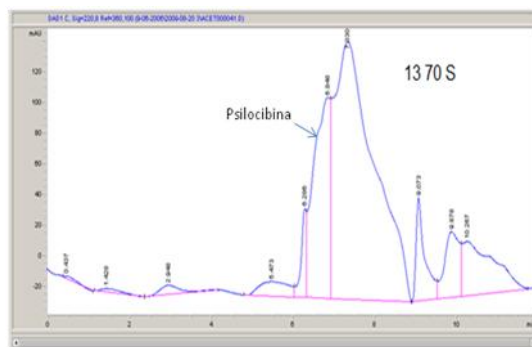
Gráfico 30. Cromatogramas del día 13 para el *P. cubensis* cultivado en medio sumergido Fang-Zhong con dos diferentes tipos de sustratos (a) 50 g/L glucosa (b) 50 g/L sacarosa

Tabla 37. Áreas obtenidas de los cromatogramas para el *P. cubensis* en medio Fang-Zhong en el día 13 para concentraciones de 70g/L glucosa y 70g/L sacarosa

Sustrato	Concentración (g/L)	Tiempo (s)	Área
Glucosa	70	1.456	322.3
Glucosa	70	2.985	242.3
Glucosa	70	5.4	758.6
Glucosa	70	6.262	514.9
Glucosa	70	7.151	24833.1
Glucosa	70	9.039	1934.6
Glucosa	70	9.929	4906
Glucosa	70	11.051	3369.8
Sacarosa	70	0.437	34.2
Sacarosa	70	1.428	81.2
Sacarosa	70	2.948	219.1
Sacarosa	70	5.473	485.4
Sacarosa	70	6.286	533.6
Sacarosa	70	6.848	3649
Sacarosa	70	7.33	11383
Sacarosa	70	9.073	1018
Sacarosa	70	9.878	1107.2
Sacarosa	70	10.267	1879.7



(a)

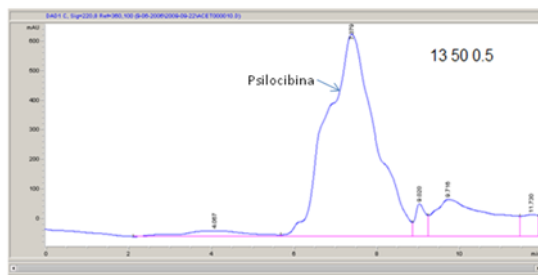


(b)

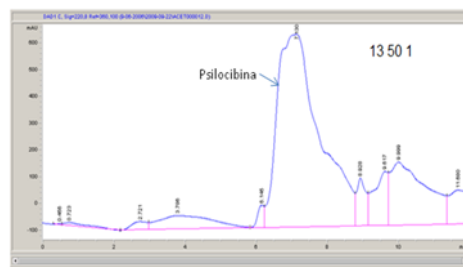
Gráfico 31. Cromatogramas del día 13 para el *P. cubensis* cultivado en medio sumergido Fang-Zhong con dos diferentes tipos de sustratos (a) 70 g/L glucosa (b) 70 g/L sacarosa

Tabla 38. Áreas obtenidas de los cromatogramas para el *P. cubensis* en medio Fang-Zhong en el día 13 para concentraciones de 50g/L y glucosa 50g/L sacarosa

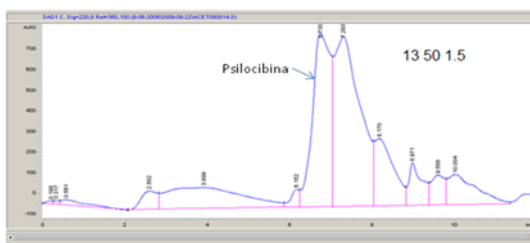
Sustrato	Concentración (g/L)	Tiempo (s)	Área
Glucosa 50	0.5	4.067	2222.2
Glucosa 50	0.5	7.379	55573
Glucosa 50	0.5	9.02	1951.3
Glucosa 50	0.5	9.716	11926.1
Glucosa 50	0.5	11.73	1942.7
Glucosa 50	1	0.793	1477.6
Glucosa 50	1	2.868	2853.7
Glucosa 50	1	6.224	1206
Glucosa 50	1	6.782	57129.9
Glucosa 50	1	8.303	9266.5
Glucosa 50	1	9.081	3037.1
Glucosa 50	1	9.738	16895.9
Glucosa 50	1	11.813	2792.1
Glucosa 50	1.5	0.412	26.9
Glucosa 50	1.5	2.482	1469.2
Glucosa 50	1.5	3.486	9105.9
Glucosa 50	1.5	6.039	689.2
Glucosa 50	1.5	6.627	21698.6
Glucosa 50	1.5	7.216	26079.5
Glucosa 50	1.5	8.112	6577.6
Glucosa 50	1.5	8.888	1908.3
Glucosa 50	1.5	9.497	3781.2
Glucosa 50	1.5	9.839	6592.2
Glucosa 50	1.5	11.655	733.1



(a)



(b)



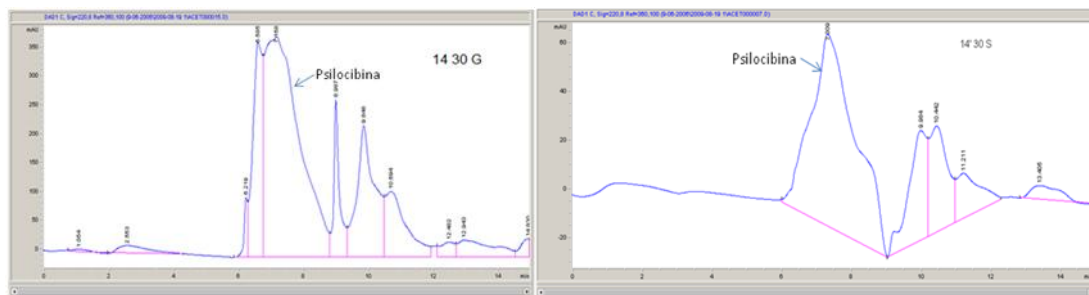
(c)

Gráfico 32. Cromatogramas del día 12 para el *P. cubensis* cultivado en medio sumergido Fang-Zhong con fuente de carbono glucosa y adición de fenilalanina en tres concentraciones. (a) 0.5 g/L F.A (b) 1 g/L F.A (c) 1.5g/L F.A

Anexo 21. Cromatogramas (HPLC) del día 14 de fermentación

Tabla 39. Áreas obtenidas de los cromatogramas para el *P. cubensis* en medio Fang-Zhong en el día 14 para concentraciones de 30g/L glucosa y 30 g/L sacarosa

Sustrato	Concentración (g/L)	Tiempo (s)	Área
Glucosa	30	1.054	181
Glucosa	30	2.553	893.9
Glucosa	30	6.219	755.7
Glucosa	30	6.585	7708.3
Glucosa	30	7.158	28506.9
Glucosa	30	8.987	3387.5
Glucosa	30	9.848	8746.1
Glucosa	30	10.694	5215.1
Glucosa	30	12.482	799.2
Glucosa	30	12.943	2306.4
Glucosa	30	14.93	594.8
Sacarosa	30	7.309	7075
Sacarosa	30	9.984	1680
Sacarosa	30	10.442	1539.5
Sacarosa	30	11.211	851.1
Sacarosa	30	13.405	339.8



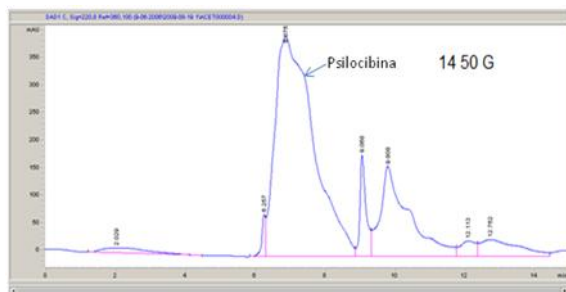
(a)

(b)

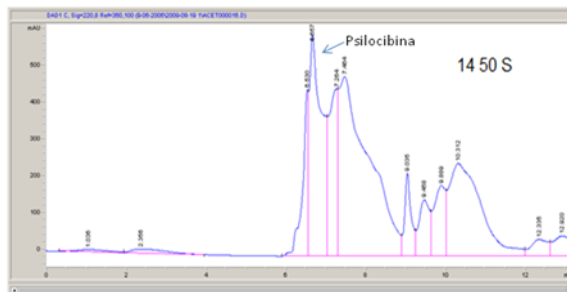
Gráfico 33. Cromatogramas del día 14 para el *P. cubensis* cultivado en medio sumergido Fang-Zhong con dos diferentes tipos de sustratos (a) 30 g/L glucosa (b) 30 g/L sacarosa

Tabla 40. Áreas obtenidas de los cromatogramas para el *P. cubensis* en medio Fang-Zhong en el día 14 para concentraciones de 50g/L glucosa y 50g/L sacarosa

Sustrato	Concentración (g/L)	Tiempo (s)	Área
Glucosa	50	2.029	831.8
Glucosa	50	6.257	578.2
Glucosa	50	6.875	30668.4
Glucosa	50	9.068	2281.9
Glucosa	50	9.808	9249.2
Glucosa	50	12.113	882.3
Glucosa	50	12.752	2398.8
Sacarosa	50	1.036	378.3
Sacarosa	50	2.356	700.5
Sacarosa	50	6.53	4483.1
Sacarosa	50	6.657	12761.7
Sacarosa	50	7.264	6690.8
Sacarosa	50	7.464	25514.1
Sacarosa	50	9.035	2617.2
Sacarosa	50	9.458	28427
Sacarosa	50	9.889	37574
Sacarosa	50	10.312	14088.1
Sacarosa	50	12.335	1339.1
Sacarosa	50	12.92	1706.6



(a)

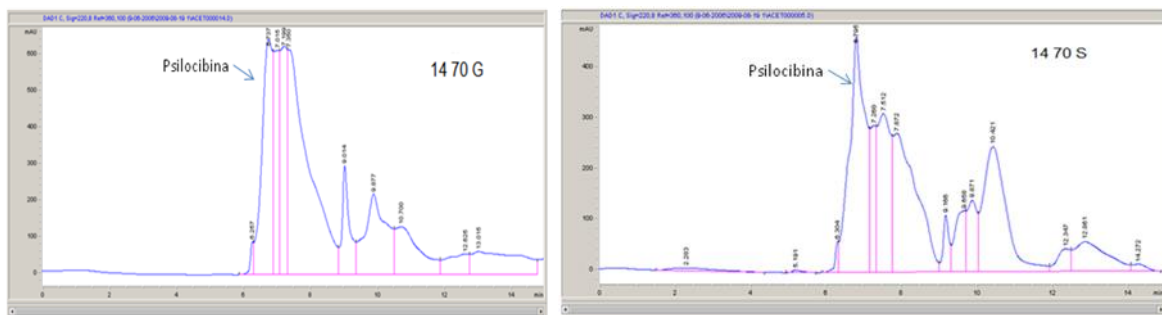


(b)

Gráfico 34. Cromatogramas del día 14 para el *P. cubensis* cultivado en medio sumergido Fang-Zhong con dos diferentes tipos de sustratos (a) 50 g/L glucosa (b) 50 g/L sacarosa

Tabla 41. Áreas obtenidas de los cromatogramas para el *P. cubensis* en medio Fang-Zhong en el día 14 para concentraciones de 70g/L glucosa y 70g/L sacarosa

Sustrato	Concentración (g/L)	Tiempo (s)	Área
Glucosa	70	6.257	587.9
Glucosa	70	6.373	14555.1
Glucosa	70	7.015	6822.3
Glucosa	70	7.199	9085
Glucosa	70	7.35	26575.5
Glucosa	70	9.014	4642
Glucosa	70	9.877	9780.4
Glucosa	70	10.7	6742.1
Glucosa	70	12.625	2623.1
Glucosa	70	13.05	6560.7
Sacarosa	70	2.283	468.3
Sacarosa	70	5.191	93
Sacarosa	70	6.304	371.9
Sacarosa	70	6.795	13654.2
Sacarosa	70	7.26	2986.9
Sacarosa	70	7.515	7554.5
Sacarosa	70	7.872	11956.3
Sacarosa	70	9.166	1244
Sacarosa	70	9.658	2309.6
Sacarosa	70	9.871	2586.6
Sacarosa	70	10.421	10510.8
Sacarosa	70	12.347	1111.5
Sacarosa	70	12.861	3550.3
Sacarosa	70	14.272	367.6



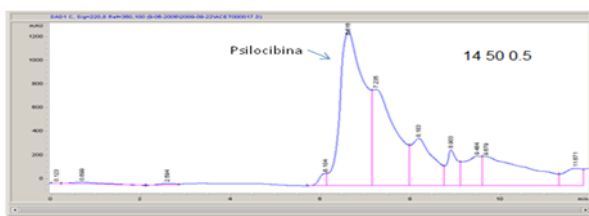
(a)

(b)

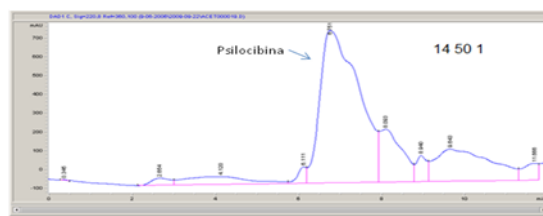
Gráfico 35. Cromatogramas del día 14 para el *P. cubensis* cultivado en medio sumergido Fang-Zhong con dos diferentes tipos de sustratos (a) 70 g/L glucosa (b) 70 g/L sacarosa

Tabla 42. Áreas obtenidas de los cromatogramas para el *P. cubensis* en medio Fang-Zhong en el día 13 para concentraciones de 50g/L glucosa y 50g/L sacarosa

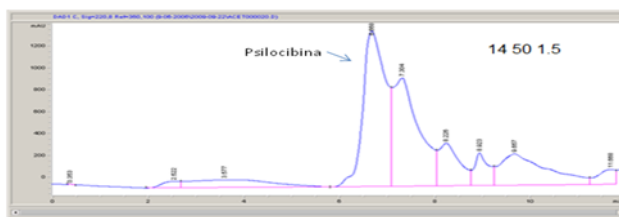
Sustrato	Concentración (g/L)	Tiempo (s)	Área
Glucosa 50	0.5	0.123	17.3
Glucosa 50	0.5	0.699	758.4
Glucosa 50	0.5	2.594	2742
Glucosa 50	0.5	6.104	1166.3
Glucosa 50	0.5	6.616	48784.8
Glucosa 50	0.5	7.235	28791.8
Glucosa 50	0.5	8.183	13579.3
Glucosa 50	0.5	8.903	5143
Glucosa 50	0.5	9.484	6681.7
Glucosa 50	0.5	9.679	16885.5
Glucosa 50	0.5	11.671	4216
Glucosa 50	1	0.345	29.5
Glucosa 50	1	2.654	1198.1
Glucosa 50	1	4.12	4530.1
Glucosa 50	1	6.111	1262.6
Glucosa 50	1	6.757	52665.5
Glucosa 50	1	8.093	10427.7
Glucosa 50	1	8.94	2525.1
Glucosa 50	1	9.643	15868.5
Glucosa 50	1	11.666	2277.9
Glucosa 50	1.5	0.353	28.3
Glucosa 50	1.5	2.522	1527.2
Glucosa 50	1.5	3.577	8396.3
Glucosa 50	1.5	6.668	47137
Glucosa 50	1.5	7.304	37144.2
Glucosa 50	1.5	8.226	11761.1
Glucosa 50	1.5	8.923	6194.9
Glucosa 50	1.5	9.657	19618
Glucosa 50	1.5	11.668	3560.6



(a)



(b)



(c)

Gráfico 36. Cromatogramas del día 12 para el *P. cubensis* cultivado en medio sumergido Fang-Zhong con fuente de carbono glucosa y adición de fenilalanina en tres concentraciones. (a) 0.5 g/L F.A (b) 1 g/L F.A (c) 1.5g/L F.A (a) 0.5 g/L F.A (b) 1 g/L F.A (c) 1.5g/L F.A

BIBLIOGRAFÍA

- ARORA, D. (1986). Mushroom Demystified, 15: 57-65.
- BAS, C. (1998). Orders and families in agarics and boleti. Flora agaricina neerlandica, 1: 40–49.
- BAILEY, J.E; OLLIS, D.F. (1986). Biochemical engineering fundamentals. 2: 404.
- BEUG, M.W.; BIGWOOD, J. (1981). Quantitative analysis of psilocybin and psilocin in *Psilocybe baeocystis* (Singer and Smith) by high-performance liquid chromatographic. Journal of chromatography, 207: 379-385.
- BIGWOOD, J. M.; BEUG, W. (1982). Ethnopharmacol, 5: 287– 291.
- BORNER, S.; BRENNEISEN, R. (1987). Determination of tryptamine derivatives in hallucinogenic mushrooms using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. Journal of chromatography, 408: 402-408.
- BROWN, J.K.; SHAPAZIAN, L.; GRIFFIN, G.D. (1972). A rapid procedure for some 'street drugs' by thin-layer chromatography. Journal chromatography, 408: 402-408.
- BRUNETON, J. (1987). Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie. Technique et Documentation, 3: 321-327.
- CHRISTIANSEN, K.; RASMUSSEN, E; TONNESEN, F. (1981). Determination of psilocybin in *Psilocybe semilanceata* usin gigh-

performance liquid chromatography on a silica column. Journal of chromatography, 210: 13-167.

- DOMÍNGUEZ, R.M. y WEBB, C. (2003). Submerged fermentation in wheat substrates for production of *Monascus* pigments. World Journal of microbiology and biotechnology, 19(3): 329-336.
- FANG, Q.H. y ZHONG, J.J. (2002). Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites -ganoderic acid and polysaccharide. Biochemical Engineering Journal, 10: 61-65.
- FAYOD, V. (1989). Prodrôme d'une histoire naturelle des Agaricinées. Annls Sci Nat Bot Sér, 7(9): 181–411.
- FRIES, E. (1874) Monographia hymenomycetum sueciae. Uppsala: C.A. Leffler, 1: 1857–63.
- FRIES, E. (1874). Systema mycologicum, sistens fungorum ordines, genera et species hucusque cognitae. Gryphiswaldiae, 12: 1821–1832.
- FURST, P. (1994) Alucinógenos y Cultura. Fondo de Cultura Económica, 8: 30-35
- GARCÍA, V. (1995). Introducción a la microbiología, 1:97–99.
- HIBBETT, D.S. y THORN, R.G. (2001). Basidiomycota: Homobasidiomycetes. The Mycota. Systematics and Evolution. Berlin: Springer-Verlag, 2: 121–168.
- HIBBETT, D.S.; PINE, E.M.; LANGER, E.; LANGER, G.; DONOGHUE, M.J. (1997). Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. Proceedings of the national academy of sciences, 33: 12002–12006.

- HWANG, H.; KIM, S.W.; CHOI, J.W. (2004). Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. *Journal of applied microbiology*, 20: 1296-1305.
- JÜLICH, W. (1981). Higher taxa of basidiomycetes. *Bibliothec Mycol*, 85: 5–485.
- KIMIE, S.; TOSHIMASA, T.; MASARU, K.; TAKESHI, F.; OSAMU, S.; YUKIHIRO, G. (2005). Determination of psilocybin in hallucinogenic mushrooms by reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection. *School of Pharmaceutical Sciences*, 66: 562-568.
- KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; DAVID, J.C. (2001) *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. CAB International, 9: 20-23.
- KÜHNER, R. (1980) *Les Hyménomycètes agaricoïdes*. Société linnéenne de Lyon, 49: 1027.
- KUO, M. (2007) Key to major groups of mushrooms. Retrieved from theMushroomExpert.Com Website: http://www.mushroomexpert.com/major_groups.html.
- LEE, B.C.; BAE, J.T.; PYO, H.B.; CHOE, T.B.; KIM, S.W.; HWANG, H.J.; YUN, J.W. (2004). Submerged cultural conditions for the production of micelial biomass and exopolysaccharides. The edible *Basidiomycete Grifola frondosa* *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 369–376.
- LINDEQUIST, U y NIEDERMEYER, J. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *Oxford journal*, 2(3): 285-299.
- MANDRILE, E.; BONGIORNO, G.; NÁJERA, M. (1984) Principios activos naturales con acción alucinógena: *Psilocina* y *Psilocibina*. Su presencia en ciertos géneros de *Basidiomicetes*. *Cátedras de botánica y farmacognosia*, 2(2): 105-117.

- MERCANO, D.; HASEGAWA, M. (1991). Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela, 2: 67-72.
- MILES, P.G. y CHANG, S.T. (1999). "Biología de las setas". 1: 65-82.
- MILLER, G.L. (1959). Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analitical Chemistry*, 31(3): 426-428.
- MUSSHOFF, F.; MADEA, B.; BEIKE, J. (2000). Hallucinogenic mushroomson the German market—simple instructions for examination and identification. *Forensic science international*, 113: 389-395.
- NAVARRO, G.; MÁRQUEZ, G.K.; ROCHA, F.J.; SÁNCHEZ, J.E. (1998). Producción de biomasa y enzimas ligninolótocas por *Pleurotus ostreatis* en cultivo sumergido. *Revista iberoamericana de micología*, 15: 302-306.
- PARIS, M. y HURABIELLE, M. (1981). *Abrégé de Matière Médicale – Pharmacognosie*. Masson, 2: 128-154.
- PERKAL, M.; BLACKMAN, G.L.; OTTREY, A.L.; TURNER, L.K. (1980). Determination of hallucinogenic components of *Psilocybe* mushrooms using high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*, 196: 180-184.
- SEIGLER, D.S. (1981). Recent development in the chemistry and biology of cyanogenic glycosides and lipids. *Revista latinoamericana de química*, 12: 36-48.
- SINGER, R. (1986). *The Agaricales in modern taxonomy*. Koeltz Scientific Books, 4: 981-88.
- SOTTOLANO, S.M.; LURIE, I.S. (1983). The quantitation of psilocybin in hallucinogenic mushrooms usin high performance liquid chromatography. *Journal chromatography*, 28: 929-935.

- TANIMUKAI, H. (1967). Modification of paper and thin layer chromatographic methods to increase sensitivity for detecting N-methylated indoleamines in urine. *Journal of chromatography*, 30: 155-163.
- THOMSON, B. M. (1980). Analysis of psilocybin and psilocin in mushroom extracts by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal forensic science*, 25: 779-785.
- TSUJIKAWA, K.; KANAMORI, T.; IWATA, Y.; OHMAE, Y.; SUGITA, K.; INOUE, H.; KISHI, T. (2003). Morphological and chemical analysis of magic mushrooms in Japan. *Forensic science international*, 138(1): 85-90.
- VANHAELEN-FAESTRÉ, R. y VANHAELEN, M. (1984). Qualitative and quantitative determination of hallucinogenic components of *Psilocybe* mushrooms by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*, 312:467-472.
- WHITE, P.C. (1979). Analysis of extracts from *Psilocybe semilanceata* mushrooms by high-pressure liquid chromatography. *Journal chromatography*, 169:453-456.
- WURST, M.; SEMERDZIEVA, M.; VOKOUN, J. (1984). Analysis of psychotropic compounds in fungi of the genus *Psilocybe* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*, 286: 229-235.