

PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS DE *Pycnoporus sanguineus* EN MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO

Pycnoporus sanguineus PIGMENT PRODUCTION ON SOLID MEDIA

Rocío Cruz Muñoz^{1*}, Ana B. Piña-Guzmán¹, Jorge Yáñez-Fernández¹, Gustavo Valencia-Del Toro¹,
Silvia Bautista-Baños², Ramón Villanueva Arce¹

¹Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI), Instituto Politécnico Nacional (IPN). Laboratorio de Biotecnología Alimentaria. 07340. Avenida Acueducto s/n, Barrio La Laguna Ticomán, México. (rocum@hotmail.com) (rarce@ipn.mx). ²Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CeProBi), IPN. Km 8.5 Carretera Yautepec-Jojutla.

RESUMEN

Pycnoporus es un género representativo de los homobasidiomicetos saprófitos y tiene un potencial lignocelulítico. Los metabolitos secundarios de este hongo son importantes en la búsqueda de sustancias antivirales, antioxidantes, antifúngicas, y antibacterianas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el crecimiento y la producción del pigmento de *P. sanguineus* en cuatro medios de cultivo sólido, para lo cual se usaron basidiocarpos de *P. sanguineus* obtenidos de material vegetal en descomposición de árboles de casuarina (H1) y mango (H2). El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos donde los factores y niveles fueron: 1) medio de cultivo (agar papa dextrosa, agar extracto de malta, agar harina integral de trigo, agar extracto de casuarina, y agar extracto de mango); y 2) pH (7.0, 8.0 y 9.0). El estudio duró 30 d y se determinaron las condiciones de crecimiento y producción del pigmento naranja del hongo. Las variables de respuesta fueron diámetro de la colonia (mm), velocidad específica de crecimiento (h^{-1}), concentración del pigmento naranja (mg mL^{-1}) y cantidad de pigmento extraído (mg). Con los datos se realizó una ANDEVA y las medias se compararon mediante contrastes ortogonales ($p \leq 0.05$, 0.01, 0.001). Las condiciones óptimas de crecimiento para el aislamiento H1 fueron: agar extracto de casuarina a pH 7.0 y 9.0; y para H2 fue agar extracto de mango a pH 7.0. La mayor velocidad de crecimiento en ambos casos fue en el medio de cultivo con el extracto de donde fueron aislados. Las mayores concentraciones del pigmento se obtuvieron en agar papa dextrosa y agar extracto de malta con 0.0175 y 0.0168 mg mL^{-1} para

ABSTRACT

Pycnoporus is a representative genus of saprophytic homobasidiomycetes that has lignocellulytic potential. The secondary metabolites of this fungus have gained importance in the search for antiviral, antioxidant, antifungal and antibacterial substances. Therefore, the objective of this study was to evaluate *P. sanguineus* growth and production of pigment in four solid media. Basidiocarps from *P. sanguineus* obtained from decomposing plant material of casuarina (H1) and mango (H2) trees were used. The experimental design was completely randomized with a factorial arrangement of treatments in which the factors and levels were: 1) culture medium (potato dextrose agar, malt extract agar, whole-wheat flour agar, casuarina extract agar and mango extract agar) and 2) pH (7.0, 8.0 and 9.0). The 30-day study determined the fungus growing conditions and production of orange pigment. The response variables were colony diameter (mm), specific growth rate (h^{-1}), concentration of orange pigment (mg mL^{-1}) and quantity of extracted pigment (mg). With the data, an ANOVA was performed and the means were compared by orthogonal contrasts ($p \leq 0.05$, 0.01, 0.001). The optimum conditions for growth of the H1 isolate were casuarina extract agar at pH 7.0 and 9.0, whereas for the H2 isolate, they were mango extract agar at pH 7.0. The fastest growth rate in both cases occurred in the culture mediums of extracts from which they were isolated. The highest concentrations of pigment were obtained in potato dextrose agar and malt extract agar, 0.0175 and 0.0168 mg mL^{-1} for H1 and H2 ($p \leq 0.05$), respectively. The largest quantity of pigment was extracted in potato dextrose agar and mango extract agar pH=7.0, 55.6 and 57.1 mg, for H1 and H2, respectively ($p \leq 0.05$).

*Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2014. Aprobado: abril, 2015.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 49: 347-359. 2015.

Key words: *Pycnoporus sanguineus*, biological activity, *Casuarina equisetifolia*, *Mangifera indica*, biocolorants, phenoxacine.

H1 y H2 ($p \leq 0.05$), respectivamente. La mayor cantidad de pigmento se extrajo en agar papa dextrosa y agar extracto de mango pH=7.0 de 55.6 y 57.1 mg, para H1 y H2, respectivamente ($p \leq 0.05$).

Palabras clave: *Pycnoporus sanguineus*, actividad biológica, *Casuarina equisetifolia*, *Mangifera indica*, biocolorante, fenoxacina.

INTRODUCCIÓN

Los hongos producen una amplia gama de productos derivados del metabolismo secundario (Calvo *et al.*, 2002), como antibióticos, enzimas y colorantes (Villanueva-Arce *et al.*, 2013). Hay casi 75 000 especies de hongos filamentosos conocidas, pero es probable que sean más de cinco millones (Blackwell, 2011). Las especies de hongos pertenecientes al género *Monascus* son productores potenciales de pigmentos naturales (Carvalho *et al.*, 2007; Domínguez-Espinosa *et al.*, 2002). Los hongos basidiomicetos producen pudriciones blancas en la naturaleza y forman un grupo ecológico importante (Lomascolo *et al.*, 2011). De éstos, las especies del género *Trametes* son las más eficientes degradadoras de lignina por su producción de las enzimas lignolíticas (Cilerdzic *et al.*, 2011) lacasa, peroxidasa manganasa, peroxidasa lignina, celobiosa deshidrogenasa y 2-oxidasa piranosa (Nyanhongo *et al.*, 2007).

Algunas especies de hongos de la familia Polyporaceae degradan madera, producen pigmentos, generalmente derivados de ácidos polipóricos y terpenilquinones (Velíšek y Cejpek, 2011). De esta familia, *Pycnoporus* es un género representativo de los homobasidiomicetos saprófitos que tienen un potencial lignocelulítico (Alexopoulos *et al.*, 1996) el cual se vincula con el género *Trametes* por sus caracteres similares, excepto el color rojo brillante característico de *Pycnoporus* (Ryvarden, 1991). Según Lomascolo *et al.* (2011), hay cuatro especies de este género: *P. cinnabarinus*, *P. puniceus*, *P. sanguineus* y *P. coccineus*. Los pigmentos rojos o anaranjados característicos de los cuerpos fructíferos (basidiocarpos) de este hongo son compuestos derivados de la cinabarina (ácido cinabarínico y la tramesanguina) (Eggert *et al.*, 1996).

Las especies del género *Pycnoporus* producen pigmentos y tienen potencial biotecnológico

INTRODUCTION

Fungi produce a wide range of products derived from secondary metabolism (Calvo *et al.*, 2002), such as antibiotics, enzymes and colorants (Villanueva-Arce *et al.*, 2013). There are almost 75 000 known species of filamentous fungi, but it is likely that there are more than five million (Blackwell, 2011). The fungus species belonging to the *Monascus* genus are potential producers of natural pigments (Carvalho *et al.*, 2007; Domínguez-Espinosa *et al.*, 2002). Basidiomycete fungi produce white rot in nature and form an important ecological group (Lomascolo *et al.*, 2011). Of this group, the species of the genus *Trametes* are the most efficient degraders of lignin because they produce the lignolytic enzymes (Cilerdzic *et al.*, 2011) laccase, peroxidase manganase, lignin peroxidase, cellobiose dehydrogenase and pyranose 2-oxidase (Nyanhongo *et al.*, 2007).

Some species of fungi from the Polyporaceae family degrade wood and produce pigments generally derived from polyporic acids and terpenylquinones (Velíšek and Cejpek, 2011). Of this family, *Pycnoporus* is a representative genus of saprophytic homobasidiomycetes that have lignocellulytic potential (Alexopoulos *et al.*, 1996) and it is linked to the genus *Trametes* because they have similar traits, except for the bright red color that is characteristic of *Pycnoporus* (Ryvarden, 1991). According to Lomascolo *et al.* (2011), there are four species of this genus: *P. cinnabarinus*, *P. puniceus*, *P. sanguineus* and *P. coccineus*. The red or orange pigments characteristic of the fruiting bodies (basidiocarps) of this fungus are compounds derived from cinnabarin (cinnabarinic acid and tramesanguine) (Eggert *et al.*, 1996).

The species of the genus *Pycnoporus* produce pigments and have biotechnological potential because of their lignocellulytic capacity and because they produce laccases, tyrosinases, cellobiose dehydrogenases, kinases, invertases, and xylases (Lomascolo *et al.*, 2011). There is a growing search for antiviral, antioxidant, antifungal and antibacterial compounds in the secondary metabolites of this fungus (Hwang *et al.*, 2004). In Brazil, basidiocarps of *P. sanguineus* are used to stop hemorrhaging (Rosa *et al.*, 2003). Laccases reduce the severity of dermatitis and help heal skin lesions caused by poison ivy (Madhavi and Lele, 2009). Smânia *et al.* (2003)

por su poder lignocelulítico y por la producción de lacasas, tirosinasas, celobiosadeshidrogenasas, quinasas, invertasas y xilasas (Lomascolo *et al.*, 2011). Por ello aumenta la búsqueda de compuestos antivirales, antioxidantes, antifúngicos, y antibacterianos en los metabolitos secundarios de este hongo (Hwang *et al.*, 2004). En Brasil se usan los basidiocarpos de *P. sanguineus* como antihemorrágicos (Rosa *et al.*, 2003). Las lacasas reducen el efecto de la dermatitis y ayudan a disminuir lesiones de la piel provocadas por hiedra venenosa (Madhavi y Lele, 2009). Smânia *et al.* (2003) analizaron la actividad antiviral de los extractos crudos de *P. sanguineus* contra el virus de la rabia, y mostraron que no causa lesión sistémica detectable o la muerte en animales. Además, Borderes *et al.* (2011) observaron actividad antioxidante a los metabolitos secundarios de los extractos de *P. sanguineus*. Respecto al control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, los extractos acuosos y metanólicos de *P. sanguineus* se usan como agentes de biocontrol contra hongos de los géneros *Trametes*, *Lentinus*, *Microporus*, *Gloeophyllum* y *Eariella*, los cuales dañan a los árboles de caucho y causan pérdidas económicas en la elaboración de artículos (Teoh *et al.*, 2011).

Los principales compuestos producidos por *P. sanguineus* son poliporin, cinnabarina, ácido cinnabarínico y tramesanguina (Rosa *et al.*, 2003; Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2010). El poliporin afecta bacterias Gram positivas y Gram negativas, sin efectos tóxicos en animales de experimentación (Rosa *et al.*, 2003). La cinnabarina es un pigmento naranja con una estructura básica 3-fenoxazina, con un grupo carbonilo en C-1, un grupo amino en C-2 y un grupo hidroxilo en C-9 (Achenbach *et al.*, 1991 y Gripenberg, 1951). Tiene actividad antibiótica contra *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *S. typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* spp., así como una mayor actividad antibiótica contra bacterias Gram positivas que negativas (Smânia *et al.* 1995, 1997). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el crecimiento y la producción del pigmentos de *P. sanguineus* en cuatro medios de cultivo sólido.

analyzed antiviral activity of the crude extracts of *P. sanguineus* against the rabies virus and showed that the crude extracts do not cause detectable systemic lesion or death in animals. Moreover, Borderes *et al.* (2011) observed antioxidant activity of the secondary metabolites of *P. sanguineus* extracts. From the perspective of controlling diseases caused by phytopathogenic fungi, aqueous and methanol extracts of *P. sanguineus* are used as biological control agents against fungi of the genera *Trametes*, *Lentinus*, *Microporus*, *Gloeophyllum* and *Eariella*, which damage rubber trees and cause economic losses in the manufacture of rubber articles (Teoh *et al.*, 2011).

The principal compounds produced by *P. sanguineus* are polyporin, cinnabarin, cinnabarinic acid and tramesanguine (Rosa *et al.*, 2003; Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2010). Polyporin affects Gram positive and Gram negative bacteria and has not caused toxic effects in animals (Rosa *et al.*, 2003). Cinnabarin is an orange pigment with a basic 3-phenoxazine structure that has a carbonyl group in C-1, an amino group in C-2 and a hydroxyl group in C-9 (Achenbach *et al.*, 1991; Gripenberg, 1951). It acts as an antibiotic against *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *S. typhi*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* spp., and has greater antibiotic activity against Gram positive than Gram negative bacteria (Smânia *et al.* 1995, 1997). The objective of this study, therefore, was to assess the growth and pigment production of *P. sanguineus* in four solid culture media.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

Samples of decomposing plant material exhibiting fruiting bodies (basidiocarps) of saprophytic basidiomycete fungi were collected from January to September of 2010. The basidiocarps of the first isolate (H1) were obtained from casuarina (*Casuarina equisetifolia* L.) trees in the La Finca ejido, Villa Guerrero, Estado de México (18° 53' 07" N, 99° 37' 36" W, 1839 masl). The second isolate (H2) was obtained from mango (*Mangifera indica* L.) trees in Parácuaro, Michoacán (19° 08' 44" N, 102° 13' 09" W, 600 masl). The collected basidiocarps were taken to the Food

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

De enero a septiembre del 2010 se recolectaron muestras de material vegetal en descomposición con presencia de cuerpos fructíferos (basidiocarpos) de hongos basidiomicetos saprófitos. Los basidiocarpos del primer aislamiento (H1) se obtuvieron de árboles de casuarina (*Casuarina equisetifolia* L.) en el Ejido de la Finca, Villa Guerrero, Estado de México (18° 53' 07" N, 99° 37' 36" O, 1839 msnm). El segundo aislamiento (H2), se obtuvo de árboles de mango (*Mangifera indica* L.) en Parácuaro, estado de Michoacán (19° 08' 44" N, 102° 13' 09" O, 600 msnm). Los basidiocarpos recolectados se llevaron al Laboratorio de Inocuidad Alimentaria de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional (México, D. F.).

Aislamiento, purificación e identificación de *Pycnoporus sanguineus*

Del interior de los basidiocarpos se tomó una pequeña muestra de tejido y se trasladó a medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) (BD Bioxon®, México). Las cajas petri inoculadas se incubaron 35 d a 25 ± 3 °C. Una vez desarrollado el hongo, se realizaron resiembras hasta su purificación completa. La identificación y caracterización se realizó a nivel molecular, para lo cual se enviaron dos muestras de colonias puras (punta de hifa) al laboratorio de la Estación Nacional de Epidemiología Cuarentena y Saneamiento Vegetal en Querétaro, Querétaro, para la extracción del ADN ribosomal, y su amplificación, secuenciación y alineación con las bases de datos del banco de genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, EE.UU.).

Producción del pigmento de *Pycnoporus sanguineus* en medio de cultivo sólido

Para determinar las condiciones óptimas de crecimiento y producción del pigmento de *P. sanguineus* en medio de cultivo sólido, se usó un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial de tratamientos donde los factores y niveles evaluados fueron: 1) medio de cultivo [agar papa dextrosa, agar extracto de malta (EMA), agar harina de trigo integral (HTIA), agar extracto de casuarina (ECA), para H1; y 2) agar extracto de mango (EMaA) para H2]; y 2) pH (7.0, 8.0 y 9.0).

En este experimento, discos (5 mm de diámetro) de PDA con micelio de cultivos de 30 d de edad de ambos aislamientos

Safety Laboratory of the Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional (Mexico City).

Isolation, purification and identification of *Pycnoporus sanguineus*

From the interior of the basidiocarps, a small tissue sample was taken and placed in potato dextrose agar (PDA) culture medium (BD Bioxon®, Mexico). The inoculated Petri dishes were incubated at 25 ± 3 °C for 3-5 d. Once the fungus developed, it was reseeded until purification of the fungus was complete. Identification and characterization were done at the molecular level. To this end, two samples of pure colonies (hypha tip) were sent to the laboratory of the Estación Nacional de Epidemiología Cuarentena y Saneamiento Vegetal, Querétaro, for ribosomal DNA extraction, amplification, sequencing and alignment with the databases of the National Center for Biotechnological Information GenBank (NCBI, USA).

Pycnoporus sanguineus pigment production in solid culture medium

To determine the optimal conditions for *P. sanguineus* growth and pigment production in solid culture medium, a completely randomized experimental design was used with a factorial array of treatments in which the factors and levels assessed were: 1) culture medium [potato dextrose agar, malt extract agar (MEA), whole-wheat flour agar (WWFA), and casuarina extract agar (CEA) for H1, and mango extract agar (MaEA) for H2]; and 2) pH (7.0, 8.0 and 9.0).

In this experiment, discs (5 mm diameter) of PDA with 30-day-old culture mycelia from each of the isolates were deposited in the center of Petri dishes (100 mm diameter) with 25 mL culture medium. The inoculated dishes were incubated at room temperature (23 ± 3 °C) for 30 d under continuous white light (850 lm). Each treatment was replicated five times. Response variables were colony diameter (mm), specific growth rate (μ ; calculated as $r = r_0 e^{\mu t}$, r is the radius in mm, t is the time in hours, and μ is the specific growth rate, according to Baumer *et al.* (2008); orange pigment concentration (mg mL^{-1}); and amount of extracted pigment (mg). Growth of the colony was measured daily until day 30, whereas the concentration and amount of pigment were determined at the end of the treatment (30 d).

At the end of the assessment period, the solid medium was dried in a convection oven HCM-A45 (TecniLab Equipment, Mexico) at 35 ± 2 °C for 14 d, and 50 mL of ethyl acetate was poured onto the surface of the dry layer of agar, which was scraped until the pigment produced by the fungus could be obtained. This extract was left for 4 d in darkness, after which a sample of the

fueron depositados en el centro de cajas petri (100 mm de diámetro) con 25 mL de medio de cultivo. Las cajas inoculadas se incubaron 30 d a temperatura ambiente (23 ± 3 °C) con luz blanca continua (850 lm). Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones. Las variables de respuesta fueron: diámetro de colonia (mm); velocidad específica de crecimiento (μ ; calculada como $r = r_0 e^{\mu t}$, r es el radio en mm, t es tiempo en horas y μ es velocidad específica de crecimiento, según Baumer *et al.* (2008); concentración del pigmento naranja (mg mL^{-1}); y cantidad de pigmento extraído (mg). El crecimiento de la colonia se midió cada día hasta los 30 d; y la concentración y cantidad del pigmento se determinaron al finalizar el tratamiento (30 d).

Al finalizar el período de evaluación, el medio sólido se secó en un horno de convección HCM-A45 (TecníLab Equipment, México) a 35 ± 2 °C por 14 d. Después se agregaron 50 mL de acetato de etilo sobre la superficie de la capa seca de agar y se raspó hasta obtener el pigmento producido por el hongo. Este extracto reposó 4 d en oscuridad, se tomó una muestra del pigmento extraído y se midió la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro Lambda XLS (Perkin Elmer, EE.UU.). Para determinar la concentración del pigmento (mg mL^{-1}), se realizó una curva tipo con concentraciones conocidas del colorante químico rojo de metilo (Sigma-Aldrich, MA, EE.UU.) y la concentración de pigmento se calculó con la ecuación de regresión obtenida ($y = 107.19x + 0.0001$). La cantidad de pigmento extraído se determinó por diferencia de masas (mg) de la capa seca de agar antes y después del proceso de extracción. Las muestras secas se colocaron en viales y se almacenaron a temperatura ambiente (23 ± 3 °C) hasta su uso.

Con los extractos en acetato de etilo se realizó una cromatografía de capa fina para comparar los frentes de retención (Rf) del pigmento producido por los aislamientos de *P. sanguineus* con el colorante rojo de metilo. Las muestras se colocaron en una placa cromatográfica 60 F254 (Merck®, Alemania), y tratadas con acetato de etilo-metanol (1:2) como fase móvil. Además, se hizo un barrido espectrofotométrico en una longitud de onda de 200 a 700 nm del pigmento obtenido. Finalmente, se leyó la absorbancia de alícuotas de 400 μL de cada muestra (extractos H1 y H2) diluidas con 400 μL de acetato de etilo en un espectrofotómetro Lambda XLS (Perkin Elmer, EE.UU.).

Análisis estadístico de datos

Los resultados se analizaron mediante ANDEVA y las medias de los tratamientos (efectos principales) se compararon por medio de contrastes ortogonales ($p \leq 0.05$, 0.01, 0.001). Para estos análisis se usó SAS (Versión 9.0 para Windows).

extracted pigment was taken and its absorbance measured at 490 nm in a Lambda XLS spectrophotometer (Perkin Elmer, USA). To determine pigment concentration (mg mL^{-1}), a curve was constructed with known concentrations of methyl red chemical dye (Sigma-Aldrich, MA, USA). Pigment concentration was calculated with the obtained regression equation ($y = 107.19x + 0.0001$). The amount of extracted pigment was determined by the difference in mass (mg) of the dry layer of agar before and after the extraction process. The dry samples were placed in vials and stored at room temperature (23 ± 3 °C) until use.

With the extracts in ethyl acetate, the retardation factor (Rf) of the pigment produced by the *P. sanguineus* isolates was compared with that of the methyl red dye using thin-layer chromatography. The samples were placed on a chromatographic plate 60 F254 (Merck®, Germany) treated with ethyl-methanol acetate (1:2) as the mobile phase. In addition, a spectrophotometric scan was done of the obtained pigment in a wavelength of 200 to 700 nm. Finally, absorbance of aliquots of 400 μL per sample (extracts H1 and H2) diluted with 400 μL ethyl acetate were read in a Lambda XLS spectrophotometer (Perkin Elmer, USA).

Statistical data analysis

The results were analyzed with an ANOVA and the treatment means (principal effects) were compared with orthogonal contrasts ($p \leq 0.05$, 0.01, 0.001). For these analyses, SAS (version 9.0 for Windows) was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation, purification and identification of *Pycnoporus sanguineus*

The *P. sanguineus* isolates (H1 and H2) (Figure 1) showed a variable growth of the colony. In the H1 isolate the fungus covered the entire surface of the culture medium in the Petri dish with white mycelia from days 10-15 ($5.3\text{-}8.0 \text{ mm d}^{-1}$), whereas the H2 isolate did so on days 10-12 ($6.7\text{-}8.0 \text{ mm d}^{-1}$). The morphology of the colonies and of the basidiocarps coincide with the description reported by Papinutti (2013) for the species *P. sanguineus*. This was compared with the results of the molecular characterization (Table 1) of the ITS1 intergenic region of the ribosomal DNA and its alignment with the database of the NCBI GenBank, and it showed 98 % identity and a similarity index of 787 for isolate H1, whereas for H2 identity was 97 % and the similarity index was 822. Both isolates were

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento, purificación e identificación de *Pycnoporus sanguineus*

Los aislamientos (H1 y H2) de *P. sanguineus* aislados (Figura 1) presentaron un crecimiento de la colonia variable. En el aislamiento H1, el hongo cubrió con micelio blanco toda la superficie del medio de cultivo de la caja petri a los 10-15 d ($5.3\text{--}8.0\text{ mm d}^{-1}$), mientras que el aislamiento H2 lo hizo a los 10-12 d ($6.7\text{--}8.0\text{ mm d}^{-1}$). La morfología de las colonias y de los basidiocarpos concuerda con lo reportado por Papinutti (2013) para la especie *P. sanguineus*. Esto se comparó con los resultados de la caracterización molecular (Cuadro 1) de la región intergénica ITS1 del ADN ribosomal y su alineamiento con las bases de datos del Banco de Genes del NCBI, y mostró 98 % de identidad y un índice de similaridad de 787, para el aislamiento H1, y para el aislamiento H2 fue 97 % de identidad y un índice de similaridad de 822. Ambos fueron comparados con el aislamiento 7IV2/2 de *P. sanguineus* con número de acceso GQ982886 (Cuadro 1).

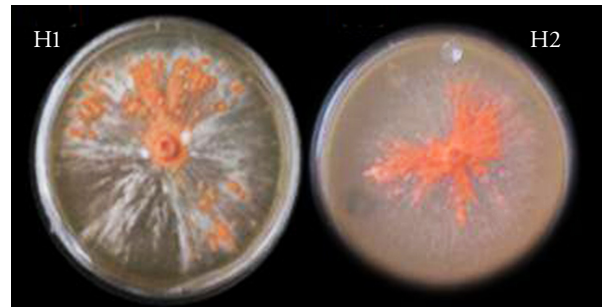


Figura 1. Colonias de *Pycnoporus sanguineus* de 30 d en agar extracto de casuarina (H1) y en agar extracto de mango (H2) aislados en Villa Guerrero, Estado de México, y Parícu, estado de Michoacán.

Figure 1. *Pycnoporus sanguineus* colonies after 30 d in casuarina extract agar (H1) and in mango extract agar (H2) isolated in Villa Guerrero, Estado de México, and Parícu, state of Michoacán.

compared with the *P. sanguineus* isolate 7IV2/2, access number GQ982886 (Table 1).

Pycnoporus sanguineus pigment production in solid culture medium

The H1 and H2 *P. sanguineus* isolates covered the entire Petri dish 13 d after seeding (das). These

Cuadro 1. Secuencia de pares de bases de la región ITS1 del ADNr de *Pycnoporus sanguineus* aislados en Villa Guerrero, Estado de México (H1), y Parícu, estado de Michoacán (H2).

Table 1. Pair sequence of ITS1 base region of rDNA of *Pycnoporus sanguineus* isolated in Villa Guerrero, Estado de México (H1) and Parícu, state of Michoacán (H2).

Secuencia de H1

```
GGTCTTACGAGTTCTGAAAGGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGGGGCATGTGCACACCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTA
CTGTAGGTTTGGCGTGGGCCTCTCGAGGCCTCTCCGGGTCTTGAGGCATTCTGCCGGCCTATGTATCACTACAAACACTTAAAGT
AAAAGAAATGTATTGCGTCTAACGCATCTAAATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGATTCCGAGNAG
CATGCCGTGTTGAGTGTGATGGAATTCACCCACACATCCTTGTGATGCTGCGGNCCTGGATTGGAGGCTTGCTGNNCCTCT
GCGGTGCGCTCCTCTGAATGCATTAGCTTGATTCCGTGCGGATCGNCTCTCAGTA
```

Pycnoporus sanguineus strain 7IV2 (GQ982886.1)

Secuencia de H2

```
CCTGCGGAAGGATCTTAACGAGTTCTGAAAGGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGGGGCATGTGCACACCCTGCTCATCCACTCTACAC
CTGTGCACTTACTGTAGGTTTGGCGTGGGCCTCTCGAGGCCTCTCCGGGTCTTGAGGCATTCTGCCGGCCTATGTATCACTACAA
ACACTTAAAGTAAAGAAATGTATTGCGTCTAACGCATCTAAATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGCT
ATTCCGAGNAGCATGCCGTGTTGAGTGTGATGGAATTCACCCACACATCCTTGTGATGCTGCGGGCTTGATTGGAGGCTT
GCTGGCCCTCTGCGGTGCGCTCCTCTGAATGCATTAGCTTGATTCCGTGCGGATCGGCT
```

Pycnoporus sanguineus strain 7IV2 (GQ982886.1)

Producción de pigmento de *Pycnoporus sanguineus* en medio de cultivo sólido

Los aislamientos H1 y H2 de *P. sanguineus* cubrieron toda la caja petri a los 13 d después de la siembra (dds). Estos datos difieren con lo reportado por Baumer *et al.* (2008) quienes observaron que las cepas MIP 95001, MIP 95002 y MIP 20001 de *P. sanguineus* llenaron las cajas petri 5 ddd pero el diámetro del disco de inóculo inicial fue 14 mm.

Respecto al diámetro de las colonias, el medio de cultivo y pH evaluados tuvieron un efecto significativo en los dos aislamientos y las mejores condiciones para el crecimiento de las colonias fueron: 1) para H1, agar extracto de casuarina con una velocidad de crecimiento radial de 6.1 mm d⁻¹ y pH 7.0 y 9.0 (velocidad de crecimiento de 4.8 mm d⁻¹ y 4.7 mm d⁻¹, respectivamente); 2) para H2, agar extracto de mango, pH 7.0, y una velocidad de crecimiento radial de 6.1 mm d⁻¹, y 4.6 mm d⁻¹, respectivamente (Cuadro 2 y 3). Esto se debe a una afinidad por las fuentes de donde ellos fueron aislados.

Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010) probaron los mismos medios de cultivo, excepto los extractos de casuarina y mango, en el crecimiento de cepas de *P. sanguineus* (HEMIM-52, HEMIM-53 y HEMIM-54) y reportan un crecimiento característico del hongo pero sin diferencia significativa entre los

data differ from those of Baumer *et al.* (2008) who observed that the MIP 95001, MIP 95002 and MIP 20001 *P. sanguineus* strains filled the Petri dishes 5 das, but the diameter of the inoculum disc was 14 mm.

Regarding colony diameter, the evaluated culture media and pH had a significant effect on the two isolates. The best conditions for colony growth were: 1) for H1, casuarina extract agar with a radial growth rate of 6.1 mm d⁻¹, pH 7.0 and 9.0 (growth rate 4.8 mm d⁻¹ and 4.7 mm d⁻¹, respectively; and 2) for H2, mango extract agar, pH 7.0 and a radial growth rate of 6.1 mm d⁻¹ and 4.6 mm d⁻¹, respectively (Tables 2 and 3). This is due to the affinity of the isolates to the source from which they were isolated.

Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010) tested the same culture mediums, except for the casuarina and mango extracts, for growth of *P. sanguineus* strains (HEMIM-52, HEMIM-53 and HEMIM-54). They reported growth characteristic of the fungus, but with no significant differences between the PDA and WWFA media for the production of biomass. Smânia *et al.* (1998) also showed culture conditions for the *P. sanguineus* strain MIP 89007 in potato broth, pH 9.0 and 25 °C under light for 20 d. In our study, although growth of the isolates H1 and H2 (Figure 1) was better in casuarina and mango agar for 30 d, pigmentation was less than that obtained in PDA (Figure 2).

Cuadro 2. Efecto del medio de cultivo y pH en el crecimiento y producción de pigmento de *Pycnoporus sanguineus* aislado en Villa Guerrero, Estado de México (H1).

Table 2. Effect of the culture medium and pH on *Pycnoporus sanguineus* growth and pigment production of the isolate from Villa Guerrero, Estado de México (H1).

Factor	Nivel	Diámetro de colonia (mm)	Velocidad específica de crecimiento μ (h ⁻¹)			Concentración del pigmento (mg mL ⁻¹)	Pigmento extraído (mg)
			Día 3	Día 5	Día 10		
Medio de cultivo	PDA	59.66 ^c	0.0075 ^b	0.0087 ^b	0.0089 ^c	0.0175 ^a	55.60 ^{aa}
	EMA	33.53 ^d	0.0000 ^c	0.0028 ^c	0.0058 ^d	0.0168 ^{aa}	46.30 ^{aa}
	HTIA	69.66 ^b	0.0120 ^a	0.0116 ^a	0.0096 ^b	0.0116 ^{bba}	19.30 ^{bba}
	ECA	79.60 ^a	0.0106 ^a	0.0125 ^a	0.0105 ^a	0.0071 ^{ccb}	37.90 ^{aaa}
pH	7.0	62.55 ^a	0.0089 ^a	0.0092 ^a	0.0090 ^a	0.0140 ^a	37.70 ^a
	8.0	58.20 ^b	0.0064 ^b	0.0085 ^b	0.0085 ^b	0.0123 ^a	40.60 ^a
	9.0	61.10 ^a	0.0072 ^b	0.0092 ^a	0.0086 ^b	0.0136 ^a	41.00 ^a

[†]Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos ($p \leq 0.05$, 0.01, 0.001). [‡]La comparación se realizó entre niveles de cada factor y las diferencias se presentan verticalmente ($n=5$). [†]Different letters indicate statistical differences between treatments ($p \leq 0.05$, 0.01, 0.001). [‡]Comparisons were carried out between levels of each factor and the differences are presented vertically ($n=5$).

Cuadro 3. Efecto del medio de cultivo y pH en el crecimiento y producción de pigmento de *Pycnoporus sanguineus* aislado en Parácuaro, estado de Michoacán (H2).**Table 3. Effect of the culture medium and pH on *Pycnoporus sanguineus* growth and pigment production of the isolate from Parácuaro, state of Michoacán (H2).**

Factor	Nivel	Diámetro de colonia (mm)	Velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1})			Concentración del pigmento (mg mL^{-1})	Pigmento extraído (mg)
			Día 3	Día 5	Día 10		
Medio de cultivo	PDA	55.00 ^c	0.0105 ^b	0.0102 ^b	0.0086 ^b	0.0108 ^a	19.30 ^a
	EMA	24.86 ^d	0.0000 ^d	0.0035 ^d	0.0047 ^c	0.0033 ^c	41.70 ^{ba}
	HTIA	58.00 ^b	0.0089 ^c	0.0092 ^c	0.0087 ^b	0.0071 ^b	23.50 ^{aab}
	EMaA	79.86 ^a	0.0152 ^a	0.0134 ^a	0.0104 ^a	0.0043 ^{cb}	57.10 ^{baa}
pH	7.0	60.25 ^a	0.0092 ^a	0.0101 ^a	0.0085 ^a	0.0076 ^a	37.00 ^a
	8.0	52.10 ^b	0.0084 ^b	0.0085 ^b	0.0078 ^b	0.0050 ^b	39.60 ^a
	9.0	50.95 ^b	0.0083 ^b	0.0089 ^b	0.0081 ^b	0.0065 ^b	29.60 ^a

[†]Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tratamientos ($p \leq 0.05, 0.01, 0.001$). [‡]La comparación se realizó entre niveles de cada factor y las diferencias se presentan verticalmente ($n=5$). [§]Different letters indicate statistical differences between treatments ($p \leq 0.05, 0.01, 0.001$). [¶]Comparisons were carried out between levels of each factor and the differences are presented vertically ($n=5$).

medios PDA y HTIA para la producción de biomasa. Además, Smânia *et al.* (1998) muestran condiciones de cultivo para la cepa MIP 89007 de *P. sanguineus* en caldo papa, pH 9.0 y 25 °C bajo luz por 20 d. En nuestro estudio, el crecimiento de los aislamientos H1 y H2 (Figura 1) en extractos de casuarina y mango agar de 30 d mostraron una pigmentación menor al obtenido en PDA (Figura 2).

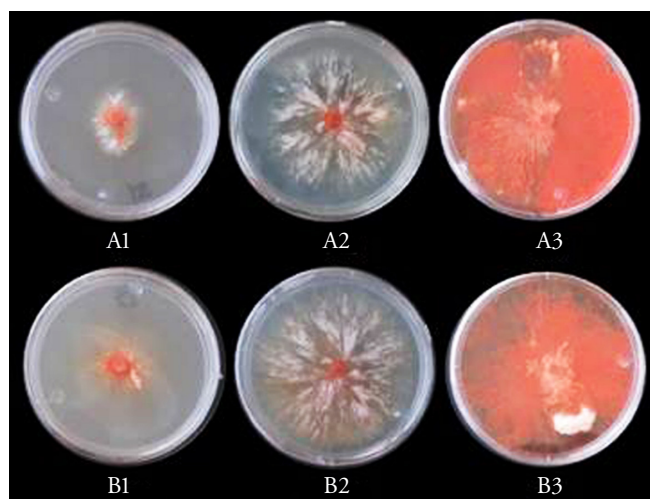
De acuerdo con la afinidad mostrada por los aislamientos del hongo sobre los extractos del material del cual fueron aislados, las mayores velocidades específicas del crecimiento a los 3, 5 y 10 d se presentaron en el ECA para el aislamiento H1, mientras

Because of their affinity to the extracts of the material from which they were isolated, the highest specific growth rates at 3, 5 and 10 d occurred in the CEA for isolate H1, whereas for H2 it occurred in MaEA (Tables 2 and 3). For H1, there were no differences between growth in CEA and WWFA during the first few days. In all cases, H1 and H2 growth rates were lower than those reported by Baumer *et al.* (2008) for the strains MIP 95002 ($\mu=0.0164 \text{ h}^{-1}$) and MIP 95001 and 20001 ($\mu=0.0147$ and 0.0145 h^{-1} , respectively) in PDA.

The highest concentrations and the largest quantity of pigment produced by H1 occurred in

Figura 2. Producción de pigmento anaranjado de *Pycnoporus sanguineus* aislados en Villa Guerrero, Estado de México (H1) y Parácuaro, estado de Michoacán (H2) en PDA a los 3 (A1 y B1), 13 (A2 y B2) y 30 d (A3 y B3) de edad.

Figure 2. Orange pigment production of 3 d (A1 and B1), 13 d (A2 and B2) and 30 d old (A3 and B3) *Pycnoporus sanguineus* isolated in Villa Guerrero, Estado de México (H1) and Parácuaro, state of Michoacán (H2) and grown in PDA.



que para H2 fue EMaA (Cuadro 2 y 3). En H1, durante los primeros días no hubo diferencias entre ECA y HTIA. En todos los casos, las velocidades para H1 y H2 fueron menores a las reportadas por Baumer *et al.* (2008) para las cepas MIP 95002 ($\mu=0.0164\text{ h}^{-1}$) y MIP 95001 y 20001 ($\mu=0.0147$ y 0.0145 h^{-1} , respectivamente) en PDA.

En el aislamiento H1 las mayores concentraciones del pigmento producido así como la cantidad total extraída, se presentaron en el medio de cultivo PDA y EMA sin importar el pH (Cuadro 2), mientras que para el aislamiento H2 lo fue en PDA y pH indistinto (Cuadro 3). Lo anterior muestra que las mayores velocidades de crecimiento del hongo, no de manera necesaria, implican una mayor producción del pigmento naranja. Esto coincide con Baumer *et al.* (2008), quienes mencionan que el crecimiento micelial, no de manera obligatoria, está relacionado con la producción de metabolitos secundarios (cinnabarina). Además, de acuerdo con los datos de concentración y pigmento extraído, no hay correlación entre el colorante químico rojo de metilo con el colorante naranja producido por el hongo, porque las cantidades del pigmento extraído rebasan la cantidad estimada (debería ser 50 veces la concentración estimada). Esto puede significar que la cantidad total extraída contiene otros pigmentos o componentes que fueron arrastrados por el acetato de etilo (Figura 3).

Según Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010), el mejor sustrato para producir cinnabarina en primordios fue pino, seguido por encino y cedro sin importar la cepa utilizada. El contenido promedio del pigmento cinnabarina en primordios del hongo fue 56 mg g^{-1} y no hubo diferencias entre la cinnabarina producida por los cuerpos fructíferos bien desarrollados (basidiocarpos) que fue 68 mg g^{-1} . La ventaja de usar los cuerpos fructíferos es obtener hasta dos o más cosechas, pero se requieren 242 a 356 d.

La producción de la cinnabarina, perteneciente al grupo de las fenoxacinas, puede realizarse *in vitro* en medios sólidos y líquidos, o bien *in vivo* con la producción de basidiocarpos. En nuestro estudio los resultados pueden ser menores que los reportados pero las ventajas principales fueron menor tiempo y facilidad en el manejo. Según Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010), los metabolitos primarios y secundarios producidos por el género *Pycnoporus* son diferentes

the culture media PDA and MEA, regardless of pH (Table 2), whereas those produced by H2 occurred in PDA, regardless of pH (Table 3). This result reveals that high growth rates of the fungus do not necessarily lead to higher production of the orange pigment. This coincides with Baumer *et al.* (2008), who mention that mycelial growth is not always related to production of secondary metabolites (cinnabarin). In addition, according to the data on concentration and extracted pigment, the quantity of methyl red chemical dye does not correlate with that of the orange dye produced by the fungus because the quantities of extracted pigment surpass estimates (the quantity extracted should be 50 times the estimated concentration). This could mean that the total extract may contain other pigments of components that were leached out by the ethyl acetate (Figure 3).

According to Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010), the best substrate for producing cinnabarin in primordia was pine, followed by oak and cedar, regardless of the strain used. The average content of the cinnabarin pigment in fungus primordia was 56 mg g^{-1} and there were no differences in the cinnabarin produced by well developed fruiting bodies (basidiocarps), which was 68 mg g^{-1} . The advantage to using fruiting bodies is that two or more harvests can be obtained, but 242 to 356 d are required.

Cinnabarin, which belongs to the phenoxazine group, can be produced *in vitro* in solid or liquid media, or *in vivo* with the production of basidiocarps. In our study, the results may be lower than those reported in the literature, but the main advantages were shorter time and ease of management. According to Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010), the primary and secondary metabolites produced by the genus *Pycnoporus* are different and depend on the species and culture conditions. The orange pigment produced by *P. sanguineus* may have important applications in the food, pharmaceutical or biotechnological industry because of its antiviral, antioxidant, antifungal, and antibacterial biological activity, as well as in the industry of dyes from biological sources. Natural dyes have increased in availability and use due to consumer preferences for natural over synthetic dyes, which can give off undesirable flavors and are harmful to health. In addition, legislation has excluded artificial dyes (Rymbai *et al.*, 2011).

The retardation factor (Rf) obtained by fine-layer chromatography with the *P. sanguineus* extracts,

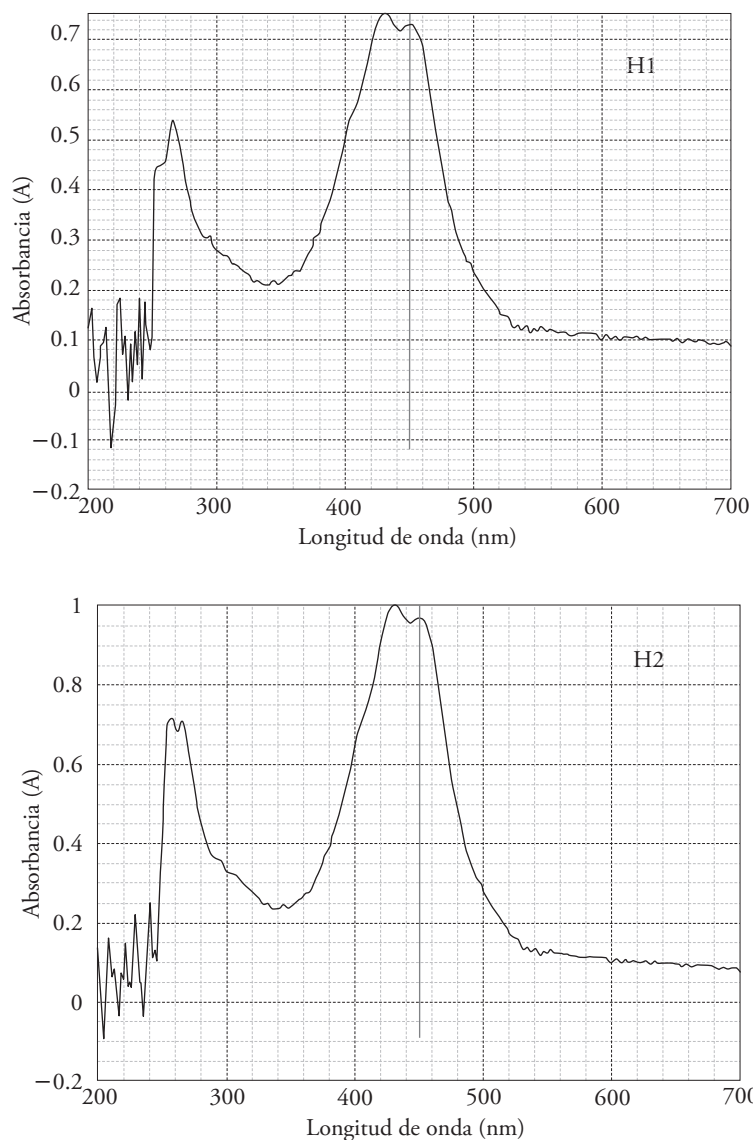


Figura 3. Espectrogramas del pigmento extraído con acetato de etilo del aislamiento de árbol de casuarina (H1) y árbol de mango (H2) de *Pycnopus sanguineus*.

Figure 3. Spectrograms of pigment extracted with ethyl acetate from *Pycnopus sanguineus* isolated from casuarina (H1) and mango (H2) trees.

y dependen de la especie y condiciones de cultivo. El pigmento anaranjado producido por *P. sanguineus* puede tener aplicaciones importantes dentro de las industrias alimentaria, farmacéutica o biotecnológica por su actividad biológica: antiviral, antioxidante, antifúngica, y antibacteriana; además de la importancia en la industria de los biocolorantes obtenidos de fuentes biológicas. La disponibilidad y el uso de colorantes naturales han aumentado debido a las preferencias de los consumidores por colorantes

relative to the methyl red, was 0.83 (Figure 4). Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010) report a type curve with cinnabarin at 265 nm ($y=0.235x+0.398$) with concentrations of 2 to 10 mg mL⁻¹ of aqueous *P. sanguineus* extract; besides cinnabarin, they also detected cinnabarinic acid. Fine-layer chromatography of H1 and H2 was performed with the eluents hexane:acetate, 2:1, and the results were, for H1, $R_f=0.77$ and, for H2, 0.33, 0.77 and 0.88 (Figure 4). Smânia *et al.* (1995), who made four

de origen natural con respecto a los sintéticos que imparten sabores indeseables y son perjudiciales a la salud; además, la acción legislativa ha excluido a los colorantes artificiales (Rymbai *et al.*, 2011).

El frente de retención (Rf) obtenido por cromatografía de capa fina con los extractos de *P. sanguineus* con respecto al rojo de metilo fue 0.83 (Figura 4). Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010) reportan una curva tipo con cinnabarina a 265 nm ($y=0.235x+0.398$) con concentraciones de 2 a 10 mg mL⁻¹ del extracto acuoso de *P. sanguineus*; y además de la cinnabarina detectaron el ácido cinabarínico. La cromatografía de capa fina de H1 y H2 se efectuó con los eluyentes hexano:acetato 2:1, y los resultados fueron para H1 Rf=0.77, y para H2 0.33, 0.77 y 0.88 (Figura 4). Smânia *et al.* (1995) realizaron cuatro fraccionamientos de los extractos de este hongo y reportan valores de Rf_{FA}=0.78, Rf_{FB}=0.54, Rf_{FC}=0.48 y Rf_{FD}=0.78; la fracción FB contenía 3-1 fenoxacina como componente principal detectado a 264 nm. El barrido de los extractos de los aislamientos de *P. sanguineus* se hizo con acetato de etilo de 200 a 700 nm. Este intervalo se usó porque hay compuestos como la cinnabarina y 3-1 fenoxacina con una absorbancia de 265 y 264 nm, según Restrepo (2007), y mostró una relación de las longitudes de onda y los colores percibidos: amarillo (565-590nm), naranja (590-625 nm) y rojo (625-740 nm). Los extractos de H1 y H2 se perciben a simple vista en

fracciones de los extractos de este fungus, reported values of Rf_{FA}=0.78, Rf_{FB}=0.54, Rf_{FC}=0.48 and Rf_{FD}=0.78. Of these fractions, FB contained 3-1 phenoxazine as the principal component detected at 264 nm. Scanning of the extracts from *P. sanguineus* isolates was done with ethyl acetate from 200 to 700 nm. This range was used because there are compounds, such as cinnabarin and 3-1 phenoxazine, with absorbance of 265 and 264 nm, according to Restrepo (2007), and because there was a relationship between wavelengths and perceived colors: yellow (565-590 nm), orange (590-625 nm) and red (625-740 nm). The extracts from H1 and H2 were perceived by the naked eye in this range of colors. For H1, there were peaks at 214, 266, 431 and 450 nm, and for H2 at 228, 257, 431 and 451 nm (Figure 3) This coincides with Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010), who found a band characteristic of cinnabarin at 265 nm and the scan with ethyl acetate showed other pigments at 290, 400, 440 and 450 nm.

The above suggests that the extracts obtained in this study are made up of several orange pigments, results that are similar to those of Méndez-Zavala *et al.* (2007), who reported two peaks at 505 and 425 nm in the 400 to 600 nm scan of the red pigment produced by *Penicillium purpurogenum*. According to Domínguez-Espinosa *et al.* (2002), there are combinations of two or more pigments

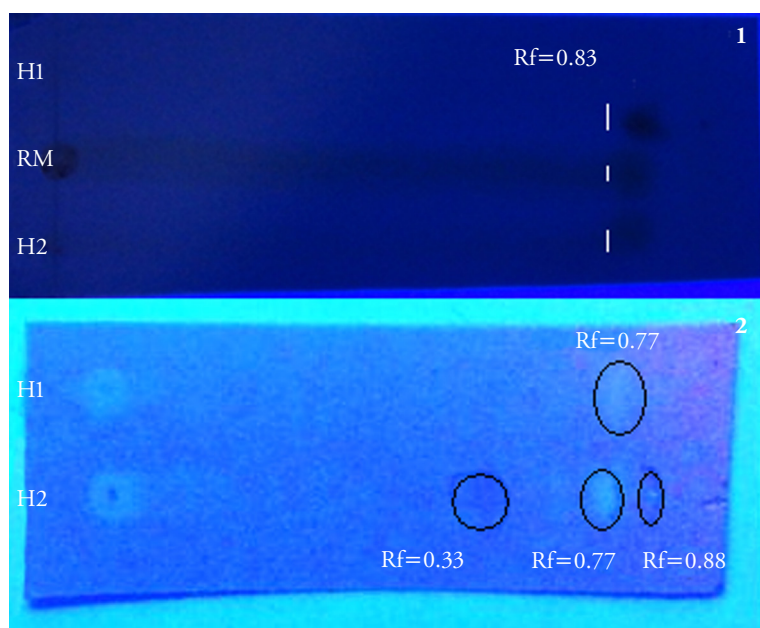


Figura 4. Cromatografía en capa fina mostrando en 1 el Rf de 0.83 de los extractos obtenidos de H1, H2 y rojo de metilo (RM), y en 2 la separación de los compuestos en H1 y H2.

Figure 4. Fine-layer chromatography showing, in 1, Rf of 0.83 of the extracts obtained from H1, H2 and methyl red (RM) and, in 2, separation of the compounds in H1 and H2.

este rango de colores. Para H1 hubo picos a 214, 266, 431 y 450 nm; y 228, 257, 431 y 451 nm para H2 (Figura 3). Esto coincide con lo reportado por Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010), quienes encontraron una banda característica de cinnabarina a 265 nm y el barrido con acetato de etilo mostró otros pigmentos a 290, 400, 440 y 450 nm.

Lo anterior implica que los extractos obtenidos en nuestro estudio están conformados por varios pigmentos anaranjados, resultados similares a los de Méndez-Zavala *et al.* (2007) quienes reportan dos picos a 505 y 425 nm en el barrido de 400 a 600 nm del pigmento rojo producido por *Penicillium purpurogenum*. Según Domínguez-Espinosa *et al.* (2002), hay una combinación de dos o más pigmentos que van del amarillo al naranja (405 nm) y de pigmentos rojos (495 nm) en los pigmentos de *Monascus*. Esto concuerda con Carvalho *et al.* (2007) quienes mencionan que al avanzar la fermentación de *Monascus*, se producen pigmentos rojos-amarillos, pero los pigmentos rojos también absorben luz a 400 nm. Como ya se indicó, es posible que los extractos obtenidos en nuestra investigación estén conformados por una mezcla de varios pigmentos que están en la misma longitud de onda (264 y 265 nm), y también hay otros que van de rojo a naranja y son generados por el grupo fenoxacina.

CONCLUSIONES

La producción de pigmentos y crecimiento *in vitro* de *Pycnoporus sanguineus* en medios de cultivo con agar fue viable porque hubo extracción mayor de los pigmentos. En los pigmentos obtenidos por el aislamiento H1 de *P. sanguineus*, la mayor producción fue en agar papa dextrosa, mientras que para H2 fue en agar extracto de mango. El crecimiento de *P. sanguineus* y la extracción de los pigmentos anaranjados en estos medios de cultivo tiene ventajas, como la reducción de la cantidad de medio utilizada (25 mL), además de la facilidad de manejo y almacenamiento de las muestras.

AGRADECIMIENTOS

Cruz-Muñoz agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de sus estudios de posgrado. Además, se agradece a la

ranging from yellow to orange (405 nm) and of red pigments (495 nm) in the *Monascus* pigments. This is in agreement with Carvalho *et al.* (2007), who state that as fermentation of monascus advances, red-yellow pigments are produced, but the red pigments also absorb light at 400 nm. As indicated above, it is possible that the extracts obtained in this study are formed by a mixture of several pigments that are in the same wavelength (264 and 265 nm) and there are also pigments that range from red to orange and are generated by the phenoxazine group.

CONCLUSIONS

In vitro growth and pigment production of *Pycnoporus sanguineus* in solid culture mediums with agar was viable because these was better pigment extraction. The *P. sanguineus* H1 isolate produced the highest amount of pigment in potato dextrose agar, whereas H2 did so in the mango extract agar. Growth of *P. sanguineus* and extraction of the orange pigments in these culture mediums has advantages, such as the reduction in the amount of medium used (25 mL) and the ease of handling and storing samples.

—End of the English version—



Subdirección de Investigación y Posgrado (proyectos 20113692, 20120572, 20131830), y a la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN-COFAA) por el apoyo económico otorgado para la realización de este estudio.

LITERATURA CITADA

- Achenbach, H., and E. Blümm. 1991. Investigation of the pigments of *Pycnoporus sanguineus* -picnosanguin and new phenoxazin-3-ones. Arch. Pharm. 324: 3-6.
- Acosta-Urdapilleta, L., G. A. Alonso-Paz, A. Rodríguez, M. Adame, D. Salgado, M. Montiel-Peña, F. Medrano-Vega, y E. C. Villegas-Villarreal. 2010. *Pycnoporus sanguineus*, un hongo con potencial biotecnológico. In: Martínez-Carrera, D., N. Cuvette, M. Sobal, P. Morales, y V. M. Mora (eds). Hacia un Desarrollo sustentable de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el siglo XXI. Puebla. 2010. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales. COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP. pp: 531-562.

- Alexopoulos C. J., C. W. Mims, and M. Blackwell. 1996. Phylum Basidiomycota order Aphyllophorales, polypores, Chantharellas, tooth fungi, coral fungi and corticioids. In: Harris, D. (ed). *Introductory Mycology* 4th Ed. New York, U. S. A. Wiley and Sons Inc. pp: 563-597.
- Baumer, J. D., S. M. Mas Diego, S. M. V. Pacheco, A. F. M. Morgado, and A. F. Jr. Furigo. 2008. Comparative study of mycelial growth and production of cinnabarin by different strains of *Pycnoporus sanguineus*. *Biofar Rev. Biol. Farm.* 2:1-5.
- Blackwell, M. 2011. The fungi: 1, 2, 3...5.1 million species? *Am. J. Bot.* 98: 426-438.
- Borderes, J., A. Costa, A. Guedes, and T. L. B. Ballod. 2011. Antioxidant activity of the extracts from *Pycnoporus sanguineus* mycelium. *Braz. Arch. Biol. Technol. Int. J.* 54: 1167-1174.
- Calvo, A. M., R. A. Wilson, J. Woo-Bok, and N. P. Keller. 2002. Relationship between secondary Metabolism and fungal development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 447-459.
- Carvalho, J. C., B. O. Oishi, A.L. Woiciechowski, A. Pandey, S. Babitha, and C. R. Soccol. 2007. Effect of substrates on the production of *Monascus* biopigments by solid-state fermentation and pigment extraction using different solvents. *Indian J. Biotechnol.* 6: 194-199.
- Cilerdzic, J., M. Stajic, J. Vukojevic, S. Duletic-Lausevic, and A. Knezevic. 2011. Potential of *Trametes hirsuta* to produce ligninolytic enzymes during degradation of agricultural residues. *BioRes.* 6: 2885-2895.
- Domínguez-Espinosa, R. M., R. Wang, y J. D. Pacho-Carrillo. 2002. Residuos agroindustriales como materia prima para la producción de compuestos químicos finos. *Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ)* 17: 77-83.
- Eggert, C., U. Temp, and K. E. L. Eriksson. 1996. The lignolytic system of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1151-1158.
- Gripenberg, J. 1951. Fungus pigment. I. Cinnabarin, a colouring matter from *Trametes cinnabarina* Jacq. *Acta Chem. Scand.* 12: 590-59.
- Hwang, H. J., S. W. Kim, C. P. Xu, J. W. Choi, and J. W. Yun. 2004. Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96: 1296-1305.
- Lomascolo, A., E. Uzan-Boukhris, I. Herpoël-Gimbert, J. C. Sigoillot, and L. Lesage-Meessen. 2011. Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92: 1129-1149.
- Madhavi, V., and S. S. Lele. 2009. Laccase properties use. *BioRes.* 4:1694-1717.
- Méndez-Zavala, A., J. C. Contreras-Esquivel, F. Lara-Victoriano, R. Rodríguez-Herrera, y C. N. Aguilar. 2007. Producción fúngica de un pigmento rojo empleando la cepa xerofílica *Penicillium purpurogenum* GH-2. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 6: 267-273.
- Nyanhongo, G. S., G. Gübitz, P. Sukyai, C. Leitner, D. Haltrich, and R. Ludwig. 2007. Oxidoreductases from *Trametes* spp. in Biotechnology: a wealth of catalytic activity. *Food Technol. Biotechnol.* 45: 250-268.
- Papinutti, L. 2013. *Pycnoporus sanguineus*. Fichas Micológicas. *Rev. Boletín Biol.* 7: 31-32.
- Restrepo G.M. 2007. Sustitución de colorantes en alimentos. *Rev. Lasallista Investig.* 4: 35-39.
- Rosa, L. E., M. K. M. Gomes, J. C. Cristina, M. Capelari, R. C. Augusto, and Z. C. Leomar. 2003. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98: 967-974.
- Rymbai, H., R. R. Sharma, and Manish Srivastav. 2011. Biocolorants and its implications in health and food industry- A review. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 3: 2228-2244.
- Ryvarden, L. 1991. Genera of polypores, nomenclature and taxonomy. *Syn. Fungorum.* 5: 1-373.
- Smânia, A. Jr., C. J. S. Marques, E. F. A. Smânia, C. R. Zanetti, S. G. Carobrez, R. Tramonte, and C. Loguercio-Leite. 2003. Toxicity and antiviral activity of cinnabarin obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Phytother Res.* 17: 1069-1072.
- Smânia, A. Jr., F. Delle -Monache, E. F. A. Smânia, M. L. Gil, L. C. Benchetrit, and F. S. Cruz. 1995. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *J. Ethnopharmacol.* 45: 177-181.
- Smânia, E. F. A., A. Jr. Smânia, C. Loguercio-Leite, and M. L. Gil. 1997. Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. *J. Chem. Biotechnol.* 70: 57-59.
- Smânia, E. F. A., A. Jr. Smânia, and L.C. Loguercio. 1998. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. *Rev. Microbiol.* 29: 129-136.
- Statistical Analysis System, Version 9.0 for Windows. 2002. SAS User's Guide: Statistics. Release 6.1 Copyright© 1995-2002 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Teoh, Y. P., M.M. Don, and S. Ujang. 2011. Media selection for mycelia growth, antifungal activity against wood-degrading fungi, and Gc-Ms study by *Pycnoporus sanguineus*. *BioRes.* 6: 2719-2731.
- Velísk, J., K. Cejpek. 2011. Pigments of higher fungi: A review. *Czech J. Food Sci.* 29: 87-102.
- Villanueva-Arce, R., C. A. Aguilar-Pompa, Y de las M. Gómez y Gómez, G. Valencia del Toro, A. B. Piña-Guzmán, y S. Bautista-Baños. 2013. Control de las bacterias patógenas y hongos de postcosecha con extractos del pigmento de *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). *Agrociencia* 47: 691-705.