



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS



Efecto de diferentes sustratos y cepas sobre las características físico-químicas y compuestos con actividad antioxidante en carpóforos de shiitake (*Lentinula edodes*)

Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Alimentarias

Presenta:

Q.F.B. Marco Antonio Barradas Zavaleta

Directores:

Dra. Elia Nora Aquino Bolaños, ICB-UV

Dr. Rigoberto Gaitán Hernández, INECOL, A.C.

Xalapa, Veracruz

Octubre, 2015

DEDICATORIAS

A **Dios**, por permitirme realizar con éxito un objetivo más en mi vida.

A **mi madre**, quien me apoya en todo y confía siempre en mí.

A **mis hermanas y sobrinos**, por animarme con su alegría.

A **Yatzil** por comprenderme, ayudarme y ser mi mayor motivación.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca proporcionada.

Al **Instituto de Ciencias Básicas de la Universidad Veracruzana**, por permitir realizar mis estudios de maestría.

Al **Instituto de Ecología, A.C.** por el aprendizaje y apoyo en la realización de este trabajo.

A mis directores de Tesis: **Dra. Elia Nora Aquino Bolaños** y **Dr. Rigoberto Gaitán Hernández**, por su apoyo y esfuerzo en obtener excelentes resultados de nuestro proyecto y de mi formación académica.

A mi honorable jurado, por sus valiosas aportaciones en este trabajo: **Dr. Iñigo Verdalet Guzmán**, **Dr. Armando Jesús Martínez Chacón**, **Dr. Enrique Alarcón Gutiérrez**.

A mis profesores: **Dr. Oscar García Barradas**, **Dr. Micloth López del Castillo Lozano** y **Dr. Rafael Díaz Sobac**, por compartir parte de sus conocimientos y por el apoyo recibido.

A mis amistades MCA **Diana**, **Bety**, **Amy**, **Pablo**, **Sergio** y **Gabriel**, por los buenos momentos y a los chicos de residencia del **ITSX**.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Alimentos del Instituto de Ciencias Básicas de la Universidad Veracruzana y en la Red de Manejo Biotecnológico de Recursos del Instituto de Ecología, A.C.

ÍNDICE GENERAL

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO DE REFERENCIA	3
2.1 Producción de hongos comestibles	3
2.2 Cultivo de hongos en México.....	3
2.3 Historia del cultivo de shiitake	4
2.4 Taxonomía y características morfológicas del shiitake	5
2.5 Hábitat y distribución	7
2.6 Sustratos alternativos para el cultivo de shiitake	8
2.7 Composición nutrimental de shiitake	9
2.8 Propiedades funcionales de shiitake	10
2.9 Radicales libres y antioxidantes	12
2.10 Compuestos fenólicos	13
2.11 Estudios en shiitake con distintos sustratos y cepas en relación a su calidad	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
4. OBJETIVO GENERAL.....	16
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
6. HIPÓTESIS	17
7. MATERIAL Y MÉTODOS	18
7.1 Esquema general de trabajo.....	18
7.2 Cepas.....	18
7.3 Cultivo de <i>Lentinula edodes</i>	19
7.3.1 Resiembra de cepas	19
7.3.2 Elaboración del inóculo	19
7.3.3 Preparación del sustrato	19
7.3.4 Incubación	20
7.3.5 Producción.....	20
7.4 Parámetros de productividad.....	21
7.5 Análisis físico-químicos y compuestos con actividad antioxidante	21
7.5.1 Preparación de los extractos.....	21

7.5.2 Azúcares totales	22
7.5.3 Sólidos solubles totales (SST)	22
7.5.4 Acidez titulable y pH	22
7.5.5 Humedad	23
7.5.6 Parámetros de color.....	23
7.5.7 Polifenoles totales.....	24
7.5.8 Flavonoides	25
7.5.9 Ácido ascórbico.....	25
7.5.10 Actividad antioxidante	25
7.6. Análisis estadístico.....	26
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
8.1 Producción de carpóforos.....	27
8.2 Parámetros físico-químicos	32
8.2.1 Azúcares totales	32
8.2.2 Sólidos solubles totales.....	35
8.2.3 pH y acidez titulable.....	36
8.2.4 Humedad.....	37
8.2.5 Color.....	38
8.3 Compuestos con actividad antioxidante	42
8.3.1 Polifenoles totales.....	42
8.3.2 Flavonoides	44
8.3.3 Ácido ascórbico.....	45
8.3.4 Actividad antioxidante	47
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
10. BIBLIOGRAFÍA.....	49
11. APÉNDICE	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del shiitake (<i>L. edodes</i>).....	5
Cuadro 2. Compuestos aislados de <i>L. edodes</i>	11
Cuadro 3. Producción de carpóforos frescos de <i>L. edodes</i> en madera de encino (ME), rastrajo de sorgo (RS) y bagazo de caña (BC).....	28
Cuadro 4. Número de hongos y peso de carpóforos de <i>L. edodes</i> cosechados de diferentes sustratos evaluados.	29
Cuadro 5. Productividad de cepas de <i>L. edodes</i> en cada uno de los sustratos evaluados.	30
Cuadro 6. Productividad de <i>Lentinula edodes</i> por cepa evaluada.....	30
Cuadro 7. Productividad de <i>Lentinula edodes</i> por sustrato evaluado.....	30
Cuadro 8. Parámetros fisicoquímicos en carpóforos de <i>Lentinula edodes</i> por cepa evaluada	34
Cuadro 9. Parámetros fisicoquímicos en carpóforos de <i>Lentinula edodes</i> por sustrato evaluado	34
Cuadro 10. pH en carpóforos de dos cepas de <i>L. edodes</i> cultivadas en tres sustratos....	36
Cuadro 11. Parámetros de color L*, a* y b* de los carpóforos de las dos cepas cultivadas en los tres sustratos evaluados.....	40
Cuadro 12. Parámetros de color C*, h° y IW de las dos cepas cultivadas en los tres sustratos evaluados.....	40
Cuadro 13. Compuestos con actividad antioxidante en carpóforos de <i>Lentinula edodes</i> por cepa evaluada.	43
Cuadro 14. Compuestos con actividad antioxidante en carpóforos de <i>Lentinula edodes</i> por sustrato evaluado	43
Cuadro 15. Contenido de ácido ascórbico en carpóforos de <i>L. edodes</i> cosechados de los sustratos evaluados.....	46
Cuadro 1A. Valores de F, p de cada parámetro medido en carpóforos de <i>L. edodes</i> cosechados de ME, RS y BC.....	67
Cuadro 2A. Contenido total de azúcares en carpóforos de dos cepas de <i>L. edodes</i> cultivadas en tres sustratos.....	67
Cuadro 3A. Contenido de Sólidos solubles totales en carpóforos de dos cepas de <i>L.</i> <i>edodes</i> cultivadas en tres sustratos.	68
Cuadro 4A. Contenido de ácido málico en carpóforos de dos cepas de <i>L. edodes</i> cultivadas en tres sustratos.....	68

Cuadro 5A. % de humedad en carpóforos de dos cepas de <i>L. edodes</i> cultivadas en tres sustratos.....	69
Cuadro 6A. Contenido de polifenoles en carpóforos de dos cepas de <i>L. edodes</i> cultivadas en tres sustratos.	69
Cuadro 7A. Contenido de Flavonoides en carpóforos de dos cepas de <i>L. edodes</i> cultivadas en tres sustratos.....	70
Cuadro 8A. Actividad antioxidante en carpóforos de dos cepas de <i>L. edodes</i> cultivadas en tres sustratos.	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Carpóforo de shiitake	6
Figura 2. Ciclo de vida de shiitake.....	8
Figura 3. Eritadenina.....	11
Figura 4. Esquema de trabajo	18
Figura 5. Contenido total de azúcares en carpóforos de dos cepas de <i>L. edodes</i> cultivadas en tres sustratos.....	33
Figura 6. Contenido de sólidos solubles totales en carpóforos de dos cepas de <i>L. edodes</i> cultivadas en tres sustratos.....	35
Figura 7. Contenido de ácido málico en carpóforos de dos cepas de <i>L. edodes</i> cultivadas en tres sustratos	37
Figura 8. Porcentaje de humedad en carpóforos de dos cepas de <i>L. edodes</i> cultivadas en tres sustratos	38
Figura 9. Carpóforos de dos cepas de <i>L. edodes</i> cultivadas en tres sustratos. Tratamientos: IE-245 ME (a), IE-256 ME (b), IE-245 RS (c), IE-256 RS (d), IE-245 BC (e), IE-256 BC (f).....	39
Figura 10. Valor de L* en carpóforos de dos cepas de <i>L. edodes</i> cultivadas en tres sustratos	41
Figura 11. Contenido de polifenoles en carpóforos de dos cepas de <i>L. edodes</i> cultivadas en tres sustratos	42
Figura 12. Contenido de flavonoides en carpóforos de dos cepas de <i>L. edodes</i> cultivadas en tres sustratos	45

Figura 13. Actividad antioxidante en carpóforos de dos cepas de <i>L. edodes</i> cultivadas en tres sustratos	47
Figura A1. Curva estándar para la cuantificación de azúcares totales por el método fenol-sulfúrico	64
Figura A2. Curva estándar para la cuantificación de polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu.....	64
Figura A3. Curva estándar para la cuantificación de flavonoides por el método de $AlCl_3$	65
Figura A4. Curva estándar para la cuantificación de ácido ascórbico por el método de titulación con DPIP.....	65
Figura A5. Curva estándar para la determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH.....	66

RESUMEN

Lentinula edodes (shiitake) se caracteriza por ser una rica fuente de metabolitos entre los que se incluyen polisacáridos, aminoácidos, vitaminas, minerales y compuestos fenólicos. Diversos estudios han demostrado propiedades funcionales de este hongo como la actividad antitumoral, actividad reductora del colesterol y actividad antioxidante. Actualmente, la producción de *L. edodes* se lleva a cabo utilizando diversos sustratos lignocelulósicos como maderas, residuos de cosechas, residuos industriales, obteniendo información acerca de los parámetros de productividad; sin embargo, es escasa la información acerca de los efectos sobre la calidad de los carpóforos producidos sobre sustratos alternativos y con distintas cepas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes sustratos y cepas sobre los parámetros de productividad, las características fisicoquímicas, y los compuestos con actividad antioxidante en carpóforos de shiitake. Se utilizaron dos cepas: IE-245 e IE-256 y tres sustratos: viruta de madera de encino (ME), rastrojo de sorgo (RS) y bagazo de caña (BC). Los parámetros de productividad evaluados fueron eficiencia biológica (EB), tasa de producción (TP) y rendimiento (R). En los carpóforos cosechados se midió el contenido de azúcares totales, sólidos solubles totales, pH, acidez titulable, humedad, parámetros de color, polifenoles totales, flavonoides, ácido ascórbico y actividad antioxidante. Los valores de EB, TP y R fueron mayores en el tratamiento IE-256/RS, con 103.71 % de EB, 1.32 % de TP y 34.57 % de R. El contenido de azúcares totales fue mayor también en los hongos del tratamiento IE-256/RS (17.61 mg glucosa g⁻¹ bs). La humedad de los carpóforos de todos los tratamientos fluctuó de 88.35 a 93.80 %. Se observó variación en el color de carpóforos. Los hongos con el menor valor de L* (color más oscuro) fueron los del tratamiento IE-256/ME (L*=30.45) y los de IE-245/BC fueron los más claros (L*=57.00). El mayor contenido de polifenoles se registró en los tratamientos IE-256/ME (6.50 mg EAG g⁻¹ bs) e IE-256/RS (5.85 mg EAG g⁻¹ bs). La actividad antioxidante fue notable con la cepa IE-256, con 0.80, 0.65 y 0.59 µM Trolox g⁻¹ bs

en ME BC y RS, respectivamente. El tratamiento IE-256/RS resultó una alternativa con ventajas en cuanto a EB, TP y R. El tipo de sustrato y la cepa así como también la interacción cepa x sustrato influyeron en las características fisicoquímicas de los carpóforos de shiitake, así como en el contenido de compuestos con actividad antioxidante

Palabras clave: *Lentinula edodes*, sustratos alternativos, productividad, actividad antioxidante.

SUMMARY

Lentinula edodes (shiitake) is characterized as a rich source of metabolites between the ones that include polysaccharides, amino acids, vitamins, minerals and phenolic compounds. Several studies have shown functional properties of this mushroom as antitumor activity, cholesterol- lowering activity and antioxidant activity. Nowadays, the *L. edodes* production is carried out by different lignocellulosics substrates as woods, crop residues, industrial waste, obtaining information about the productivity parameters, however is limited the information about the effects of quality of carpophores produced on alternative substrates and different strains. The objective of this study was to evaluate the effect of different substrates and strains on the productivity parameters, the physiochemical characteristics, and the compounds with antioxidant activity in the shiitake carpophores. Two strains were used: IE-245 and IE-256 and three substrates: oak wood chips (OWC), sorghum stover (SS) and sugar bagasse (SB). The productivity parameters assessed were biological efficiency (BE), production rate (PR) and yield (Y). In the produced carpophores were measured the total sugars, total soluble solids, pH, titratable acidity, moisture, color parameters, total polyphenols, flavonoids, ascorbic acid and antioxidant activity. The values of BE, PR and Y were higher in the treatment IE-256 /SS, with 103.71% BE, 1.32 % of PR and 34.57% of Y. The total sugar content was higher in the mushroom with treatment IE-256/SS (17.61 mg glucose g⁻¹ dw). The moisture of carpophores in all treatments fluctuated from 88.35 to 93.80 %. It was observed variation in the carpophores color. The mushrooms with the lowest value of L*(darkest color) were the treatment IE-256/OWC (L*=30.45) and IE-245/SB were the clearest (L*=57.00). The highest polyphenol content was recorded in the treatments IE-256/OWC (6.50mg GAE g⁻¹ dw) and IE-256/SS (5.85mg GAE g⁻¹ dw). The antioxidant activity was significant in strain IE-256, with 0.80, 0.65 and 0.59 μM Trolox g⁻¹ dw in OWC, SB, SS respectively. The treatment IE-256/SS became an alternative with advantages in BE, PR and Y. The type of substrate and the strain as well as the strain interaction

x substrate influenced the physiochemical characteristics of the shiitakes carpophores, as well as the content of antioxidant activity compounds.

Key words: *Lentinula edodes*, alternative substrates, productivity, antioxidant activity.

1. INTRODUCCIÓN

Los radicales libres producidos por la radiación y reacciones químicas de diversos compuestos pueden contribuir a la oxidación de proteínas y lípidos, y daño del ADN, lo cual ocasiona efectos negativos en la salud humana. Algunos estudios indican que el aumento en el consumo de alimentos como frutas y hortalizas, se asocia con un menor riesgo de padecer enfermedades crónicas. Esta asociación se ha atribuido a los antioxidantes que contienen los alimentos como la vitamina C, los carotenoides, los compuestos polifenólicos y los flavonoides, que previenen el daño por radicales libres. Un claro ejemplo de alimentos con estas características son algunos hongos comestibles. Éstos son ricos en fibra dietética, minerales, vitaminas y tienen bajo contenido de grasa. Además de que contienen diversos compuestos polifenólicos reconocidos como excelentes antioxidantes (Choi *et al.*, 2006; Mujic *et al.*, 2010; Wang y Xu, 2014).

Los hongos pertenecen al reino fungi, son organismos comunes en la naturaleza que incluyen desde formas microscópicas, como los mohos, hasta macroscópicas, bastante voluminosas llamados hongos de repisa que crecen en los troncos de los árboles. Estos, están ampliamente distribuidos por todo el planeta y prosperan en casi todos los climas tropicales, subtropicales, templados y fríos, en temperaturas entre 4 y 60 °C, donde existan los sustratos para su existencia. Son organismos a partir de los cuales la sociedad obtiene un gran número de beneficios y productos por lo cual representan un valioso recurso natural (Boa, 2005; Martínez-Carrera *et al.*, 2010).

Hoy en día, gran parte de la investigación realizada sobre los hongos que tienen un valor nutricional o farmacológico se centra en el desarrollo de estrategias de cultivo que facilitan la obtención de los compuestos de interés (Gaitán-Hernández *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado que algunas moléculas

bioactivas tienen propiedades funcionales sin efectos secundarios y que pueden incluso modificarse químicamente para mejorarlas. Un ejemplo de medicamento patentado y avalado por la FDA (Food and Drug Administration) para combatir y/o tratar el cáncer, así como potenciar el sistema inmunológico humano es el lentinan, aislado de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (shiitake) (Martínez-Carrera *et al.*, 2012; Kalac, 2013).

Respecto a los hongos comestibles, el shiitake es el segundo más popular y el tercer hongo comestible cultivado en el mundo (Chang, 1996; Kitzberger *et al.*, 2007, Royse, 2014). Varios compuestos importantes, incluyendo polisacáridos bioactivos, fibra dietética, ergosterol, vitamina B1, B2 y C, y minerales han sido aislados de los carpóforos, micelios, y del medio de cultivo de este hongo. Numerosos estudios han demostrado sus atributos medicinales incluyendo actividad antitumoral, mejorando la función hepática y actividad reductora de colesterol (Choi *et al.*, 2006; Guillamón *et al.*, 2010; Mujic *et al.*, 2010).

El cultivo tradicional de shiitake se realiza sobre troncos de encino (*Quercus* spp.) al intemperie (Przybylowicz y Donoghue, 1990; Lin *et al.*, 2000). No obstante la mayor parte de la producción mundial se obtiene utilizando formulaciones sintéticas con base en viruta de encino suplementada (Royse, 1996; Stamets, 2000). Actualmente, se evalúa el uso de distintos sustratos alternativos (Philippoussis *et al.*, 2007; Ashrafuzzaman *et al.*, 2009; Gaitán-Hernández *et al.*, 2014; Mata *et al.*, 2014), como pajas de diversos cereales y residuos de la poda de vid, entre otros (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006a). El uso de estos residuos para el cultivo de shiitake ha motivado a realizar investigaciones encaminadas a determinar si el tipo de sustrato utilizado influye en la calidad del hongo obtenido (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006a; Barros *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Zweigle, 2010; Gaitán-Hernández *et al.*, 2011; Vitrac *et al.*, 2011).

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 Producción de hongos comestibles

El número de especies de hongos en la tierra se estima en 140 000, de las cuales el 10 % son conocidas y de ellas aproximadamente el 50 % se considera que poseen diversos grados de comestibilidad, alrededor de 700 especies son reconocidas por poseer importancia farmacológica (Lull *et al.*, 2005).

A nivel mundial, la producción de hongos comestibles sitúa a China en el primer lugar, ubicando a México en la décima tercera posición, siendo el primer lugar en producción en América latina con el 80.8 % (FAOSTAT, 2009; Martínez-Carrera *et al.*, 2010). Dentro de los cinco géneros de mayor producción en el mundo se encuentran *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach con un 30 % del total de cultivo, *Pleurotus* spp., con una producción de 27 %, mientras que *Lentinula edodes* contribuye con 17 %. *Auricularia* spp. y *Flammulina* spp. aportan el 6 y 5%, respectivamente y un porcentaje mínimo de otros hongos (Royse, 2014).

En el año 2000 la producción de shiitake a nivel mundial alcanzó una cifra de 7.5 millones de toneladas, con China como el principal productor (Chen, 2005; Kitzberger *et al.*, 2007).

2.2 Cultivo de hongos en México

México por sus raíces indígenas es un pueblo micófago, es decir, que consumen hongos (Guzmán *et al.*, 1993). En México muchas especies de hongos han sido reportadas como comestibles y algunas de ellas se consumen desde tiempos prehispánicos (Guzmán, 2008b).

En México se conocen alrededor de 70 especies de hongos que han sido utilizadas en prácticas de medicina tradicional para el tratamiento de 40 tipos de problemas de salud humana. En el territorio mexicano existen bosques templados de gimnospermas y angiospermas, los cuales favorecen el desarrollo de alrededor de 200 000 especies de hongos. Se ha estimado que en México existen más de 300 especies de hongos silvestres comestibles (Guzmán, 2008a).

México es pionero en el cultivo de *Pleurotus* spp. (setas) en América Latina ya que dicha actividad inició en los años 70, desde entonces el interés por su propagación y consumo ha ido en aumento. Actualmente nuestro país produce cerca de 7 mil toneladas de setas frescas al año, lo que equivale aproximadamente al 60 por ciento de la producción total de América Latina (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006b).

El shiitake, fue cultivado por primera vez en México en 1984, por la empresa "Hongos Leben, S. de R. L. de C. V." en Guadalupe Victoria, Estado de México. El cultivo se llevó a cabo usando como sustrato aserrín de encino, almidón, levadura deshidratada y sulfato de calcio, empleando una modificación de la técnica descrita por la patente de la compañía Kiniko (E.U.A.) (Sierra, 1997).

En el periodo de 1994 a 2002 en México, la producción de shiitake fue de 30 ton/año, sin embargo para el 2009, esta producción disminuyó a 18.2 ton debido a diversos factores como la crisis económica, la cual influyó a que la producción se reorientara al cultivo de champiñón principalmente (Martínez-Carrera y López-Martínez de Alva, 2010).

2.3 Historia del cultivo de shiitake

La producción de hongos comestibles inició como una auténtica biotecnología tradicional, basada en técnicas sencillas de propagación hace aproximadamente 1,000-1,400 años en China, con el cultivo empírico de las

“orejas de ratón” (*Auricularia* spp.) y del “shiitake” (*L. edodes*). De la misma forma, aunque como proceso independiente, también comenzó en Francia hace más o menos 350 años con el cultivo del champiñón (*Agaricus* spp.) (Sierra, 1997).

Lentinula edodes es un hongo nativo del este de Asia. En China es también llamado “Xiang-gu” o “Shiang-gu” (el hongo con fragancia) (Chen, 2005) y se produce actualmente a gran escala en muchas partes del mundo como Estados Unidos, Europa, América Central y el Caribe. También se cultiva en diferentes regiones de México (Martínez-Flores *et al.*, 2009).

Tradicionalmente el shiitake es cultivado en troncos de árboles principalmente de encino (*Quercus* sp.), aunque para su producción en México son usados diversos materiales lignocelulosicos enriquecidos con virutas (Gaitán-Hernández, 2001).

2.4 Taxonomía y características morfológicas del shiitake

De acuerdo con Pegler (1983) la clasificación taxonómica de shiitake es la siguiente:

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del shiitake (*L. edodes*)

Reino:	Fungi
División:	Eumycotina
Subdivisión:	Basidiomycotina
Clase:	Holobasidiomycetes
Subclase:	Hymenomycetidae
Orden:	Agaricales
Familia:	Tricholomataceae
Género:	<i>Lentinula</i>
Especie:	<i>edodes</i>

Cada hongo está formado por una serie de finos filamentos llamados hifas, que en conjunto forman lo que se denomina micelio. En la naturaleza y bajo condiciones favorables de humedad y temperatura, este micelio extendido sobre un sustrato adecuado, se transforma en pequeños grumos que van aumentando de tamaño (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006b).

El hongo formado con su píleo (sombrero) y su estípite (pie), tiene la función de producir las estructuras de reproducción llamadas. Estas esporas se forman en la cara inferior del sombrero, en laminillas verticales que se extienden desde la parte superior del pie hasta el borde del sombrero. Un hongo o cuerpo fructífero representa para el micelio lo que un fruto para un árbol (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006b).

L. edodes tiene el píleo de color café claro u oscuro con el centro aún más oscuro, y más pálido en las orillas, en especímenes jóvenes o secos, de curvado a aplanado. El estípite es de color café rojizo a café blanquecino, excéntrico pero algunas veces central (Singer y Harris, 1987). La forma y coloración de los carpóforos (cuerpos fructíferos) se observan en la Figura 1.



Figura 1. Carpóforo de shiitake

Foto: R. Gaitán-Hernández

2.5 Hábitat y distribución

Respecto a su alimentación, los hongos dependen de materiales vivos y muertos para su crecimiento. Obtienen su nutrimento en tres formas básicas: saprófita (crecimiento en materia orgánica muerta), simbiótica (crecimiento en asociación con otros organismos) y patógena o parasítica (crecimiento con daño a otros organismos). Los hongos saprófitos colonizan la madera en putrefacción y las sustancias presentes en el suelo (Boa, 2005).

Lentinula edodes crece sobre madera muerta en una amplia gama de árboles hospederos, especialmente especies de los géneros *Quercus*, *Lithocarpus*, *Castanea*, *Elaeocarpus*, *Magnolia*, *Pinus* y *Picea*. Se distribuye en Asia oriental, especialmente Japón y China, pero no se extiende hacia zonas más fría y/o tropicales, prefiriendo una temperatura óptima alrededor de 24 °C (Pegler, 1983).

El ciclo de vida de *L. edodes* consta de dos fases, la vegetativa y la reproductiva (Philippoussis *et al.*, 2011). De manera general, las esporas del hongo germinan en condiciones ambientales apropiadas y forman un micelio que no se expresa morfológicamente. Posteriormente, aparecen protuberancias denominadas primordios, que más tarde serán los carpóforos con su himenio en donde se encuentran los basidios (células germinales especializadas). Finalmente, el material se recombina y segrega dando origen a esporas que al germinar darán inicio a un nuevo ciclo (Chang y Hayes, 1978; Guzmán *et al.*, 1993).

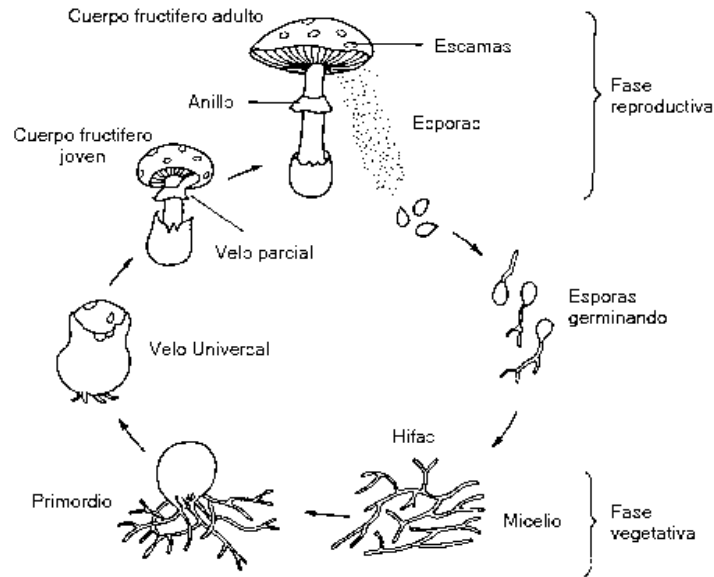


Figura 2. Ciclo de vida de shiitake

Fuente: inbio.ac.cr/papers/hongos/ciclo.htm

2.6 Sustratos alternativos para el cultivo de shiitake

Shiitake puede cultivarse de dos maneras: al aire libre en troncos de madera natural o en un ambiente controlado en bloques o troncos sintéticos, el aserrín de maderas es el ingrediente principal comúnmente utilizado. La ventaja de la producción al aire libre es que la inversión de capital es mínima. Las desventajas respecto al cultivo en bloques de aserrín son la producción estacional, y los rendimientos más bajos (Royse, 1996; Gold *et al.*, 2008).

Dentro de las principales ventajas de la producción de shiitake utilizando aserrín es que aumentan los rendimientos, y los ciclos de producción son más cortos. Las desventajas incluyen mayores costos iniciales de inversión y un proceso de especialización de la producción (Gold *et al.*, 2008).

En las últimas décadas se han evaluado sustratos alternativos para el cultivo de hongos que generen rendimientos altos y productos de buena calidad (Morais *et al.*, 2000; Philippoussis *et al.*, 2007). Algunos sustratos alternativos que

podrían ser utilizados para el cultivo de shiitake son los residuos de cosecha llamados rastrojos, la producción mundial de estos se estima alrededor de 4 billones de toneladas por año. En México, en el periodo de 2008 a 2011 los principales rastrojos producidos fueron de maíz (68%), sorgo (19%), trigo (11%) y cebada (2%) haciendo un total de 37.5 millones de toneladas (Philippoussis, 2009; Reyes-Muro *et al.*, 2013).

Adicionalmente, el bagazo de caña (*Saccharum officinarum* L.) es un residuo industrial que se ha utilizado para el cultivo de *L. edodes* (Salmones *et al.*, 1999), este material es el principal subproducto de la industria de la caña de azúcar y forma parte de las 120 toneladas anuales a nivel mundial de residuos basados en procesamiento industrial (Parameswaran, 2009; Philippoussis, 2009).

Los residuos agro-industriales son fáciles de obtener y pueden ser muy baratos o no tener costo. La importancia en el uso de estos residuos radica en que es muy elevada su producción y podrían no solo ser desechos, sino una materia prima de la cual obtener beneficios, como lo es el cultivo de hongos. Cuando se considera el uso de un sustrato alternativo para sembrar hongos, se debe tomar en cuenta las características del mismo, además de conocer las propiedades de la cepa que se inoculará (MushWorld, 2005).

2.7 Composición nutrimental de shiitake

Lentinula edodes, es un hongo considerado una exquisitez y elixir de la vida en países como China y Japón. Es reconocido por su aporte nutrimental, ya que contiene 58-60% de carbohidratos, 3-4% de lípidos y 20-23% de proteínas con una digestibilidad de 80-87% (Wasser, 2005), compuestas por 18 distintos aminoácidos incluyendo los esenciales (Turlo *et al.*, 2011). Shiitake contiene vitaminas B1, B2, B3, B12, C, ácido fólico y vitamina D; y cuenta con minerales como el Fe, Mn, K, Ca, Mg, Cd, Na, Cu, P, y Zn (Caglarirmak, 2007). Su contenido

de fibra está en un intervalo de 6-15% (Stamets, 2000), con polisacáridos como la quitina y glucanos como principales constituyentes de la pared celular.

La cantidad de agua de los carpóforos es muy elevada y también varía afectando a la concentración de sus nutrientes, cuando los resultados son calculados con base al peso fresco (pf). Este contenido en humedad varía según factores ambientales como la temperatura y la humedad relativa del aire durante su crecimiento y almacenamiento, y también por la cantidad relativa de agua metabólica que puede producirse. En la mayoría de los hongos se pueden encontrar valores del contenido en humedad desde 67.2 a 93.77 g/100 g pf (Kalac, 2009).

2.8 Propiedades funcionales de shiitake

Además del perfil nutrimental el hongo posee efectos sinérgicos y aditivos en beneficio a la salud humana por la presencia de compuestos bioactivos que contiene (Valverde *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015), los principales son los polisacáridos, la fibra dietética, el ergosterol, las vitaminas B1, B2 y C, los folatos, la niacina y los minerales; además, contiene diversos compuestos polifenólicos reconocidos como excelentes antioxidantes (Jiang *et al.*, 2010; Yildiz *et al.*, 2015).

Otras propiedades del shiitake son la actividad anticancerígena, antiviral, inmunomoduladora, antibacteriana y antifúngica (Chang y Miles, 2004; Vitrac *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2012). Además, *L. edodes* contiene lentinan, un polisacárido que se encuentra en estudio por su capacidad para mejorar el sistema inmunológico, reducir el potencial de tumores y disminuir la presión arterial (Gold *et al.*, 2008).

Hearst *et al.* (2009), mostraron efectos antimicrobianos importantes de extractos acuosos de shiitake contra el 85 % de los organismos que utilizaron en su prueba, comparándose favorable con los resultados de ciprofloxacina como control positivo.

Diversos compuestos se han aislado de *L. edodes* (Cuadro 2), como la Eritadenina (Figura 3) la cual entre sus propiedades posee actividad antiviral y capacidad reductora del colesterol (Przybylowicz y Donoghue, 1990; Guillamón *et al.*, 2010).

Cuadro 2. Compuestos aislados de *Lentinula edodes*

Componente	Efectos	Tipo de componente	Actividad
Eritadenina	Disminuye colesterol Antiviral	Derivado de adenina	Acelera el metabolismo y excreción del colesterol
Ac2P	Antiviral	Polisacárido	Inhibe la replicación viral
KS-2	Antitumoral	Polisacárido	Induce producción de interferón
LAP1	Antitumoral	Polisacárido	Modulador del sistema inmune

Fuente: Przybylowicz y Donoghue, 1990

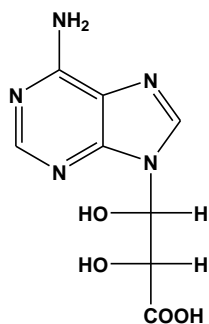


Figura 3. Eritadenina

2.9 Radicales libres y antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhibiendo la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres. Estos compuestos se dividen en dos categorías principalmente: sintéticos y naturales. En general los antioxidantes sintéticos son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica, mientras que los antioxidantes naturales pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas), carotenoides así como el ácido ascórbico (Soto, 2007).

En algunos antioxidantes sintéticos como el BHA y BHT (Butil hidroxianisol y Butil hidroxitolueno) su uso ha sido restringido debido a su carcinogenicidad, por lo cual el interés por los antioxidantes naturales se ha incrementado además de que su potente actividad antioxidante se ha demostrado en el laboratorio y mencionado en la literatura (Branen, 1975; Velioglu *et al.*, 1998). Algunos antioxidantes naturales muestran propiedades biológicas incluyendo funciones antibacteriales, antivirales y antiinflamatorias. Una terapia antioxidante provee una alternativa accesible para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Velioglu *et al.*, 1998).

Un método comúnmente utilizado para medir la capacidad antioxidante de una especie o sustancia, se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de 520 nm. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical, se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida del

color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia (Brand-Williams *et al.*,1995; Quintana y Calderón, 2009).

En el caso de *L. edodes* los compuestos antioxidantes que se encuentran comúnmente son compuestos fenólicos como el ácido trans-cinámico, ácido protocatéquico y ácido gálico, ácido ascórbico, flavonoides como catequina y esteroides (Yang *et al.*, 2002; Dubost *et al.*, 2007; Elmastas *et al.*, 2007).

2.10 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (también llamados polifenólicos) forman un conjunto amplio de sustancias, que se caracterizan por la presencia de al menos un anillo bencénico, el cual está directamente unido al menos un grupo hidroxilo, libre o ligado con otra función. En los animales, plantas y hongos, estos compuestos protegen contra los daños oxidativos (Bravo, 1998). Con base a su estructura, a los compuestos polifenólicos se les clasifica en fenoles simples o ácidos fenólicos, ácidos benzoicos y relacionados, acetofenonas y ácidos fenil acéticos, derivados de ácidos hidroxicinámicos, flavonoides, entre otros (Hassing *et al.*, 1999).

Las rutas metabólicas responsables de la biosíntesis de compuestos fenólicos son la del shiquimato y acetato. Algunos compuestos fenólicos son biosintetizados por cada una de estas vías por sí sola, sin embargo, la clase más grande de compuestos fenólicos, los flavonoides, son productos de origen biosintético mixto que incorporan en sus estructuras subunidades de ambas rutas metabólicas (Mann, 1987; Dewick, 2002).

Los polifenoles son potentes antioxidantes que se suman a las funciones de vitaminas y enzimas en la acción contra el estrés oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno (Tsao, 2010). Entre los polifenoles con capacidad antioxidante reconocida destacan los flavonoides, ácidos fenólicos

(hidroxicinámico, hidroxibenzóicos, cafeico, clorogénico, gálico), taninos, chalconas y cumarinas, los cuales constituyen la fracción polifenólica de varios alimentos (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

2.11 Estudios en shiitake con distintos sustratos y cepas en relación a su calidad

En la literatura se encuentran diversas investigaciones sobre el crecimiento de micelio de shiitake en distintos sustratos, un ejemplo es lo reportado por Gomes-da-Costa *et al.* (2008), quienes utilizaron cepas de *L. edodes* para evaluar el crecimiento del micelio en sustratos de aserrín de eucalipto (*Eucalyptus* sp.), roble australiano (*Grevillea robusta*) y árbol santo (*Melia azedarach*), utilizando suplementos como harina de soja y arroz. Los sustratos de eucalipto y roble australiano fueron los mejores para el crecimiento de *L. edodes*.

Recientemente Gaitán-Hernández *et al.* (2014) utilizaron paja de trigo como sustrato en la siembra de varias cepas de *L. edodes* reportando un intervalo de eficiencia biológica (EB) de 66.0 a 320.1%. El resultado fue dependiente de las características de las cepas y de los factores ambientales.

Por otro lado, para evaluar el contenido y propiedad antioxidante del shiitake, Kim *et al.* (2008) determinaron el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de hongos comestibles y medicinales, encontrando correlación significativa entre actividad DPPH y polifenoles para *Lentinula edodes*.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Lentinula edodes se caracteriza por ser una fuente rica de polisacáridos, aminoácidos, vitaminas, minerales y compuestos fenólicos. Diversos estudios han demostrado propiedades funcionales proporcionadas por estos compuestos como la actividad antitumoral, actividad reductora del colesterol, actividad antiviral, actividad antifúngica y actividad antioxidante. No obstante, estas características de los carpóforos de shiitake están fuertemente influenciadas por el sustrato de crecimiento, cepa utilizada y parámetros medioambientales, entre otros.

Actualmente la producción de *L. edodes* a nivel mundial se realiza utilizando diversos sustratos lignocelulosicos principalmente maderas, y se ha probado el uso de residuos agrícolas y residuos agro-industriales. Son pocas las cepas de shiitake que se adaptan a estos sustratos alternativos por lo que es necesario evaluar su producción y determinar el efecto de estos sustratos en las características físico-químicas y de actividad antioxidante en los carpóforos obtenidos.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del uso de diferentes sustratos y cepas sobre las características fisicoquímicas y compuestos con actividad antioxidante en carpóforos de shiitake.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la productividad en el cultivo de *L. edodes* utilizando diferentes sustratos y cepas.

Determinar el efecto de diferentes sustratos y cepas sobre las características fisicoquímicas del shiitake obtenido.

Analizar los compuestos con actividad antioxidante en carpóforos obtenidos en diferentes sustratos y utilizando distintas cepas.

6. HIPÓTESIS

La productividad de *Lentinula edodes*, las características fisicoquímicas y compuestos con actividad antioxidante de los carpóforos obtenidos serán diferentes, dependiendo de la cepa y sustratos utilizados.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Esquema general de trabajo

La parte experimental inició con el cultivo de dos cepas de *L. edodes* en tres sustratos lignocelulósicos. Posteriormente, se realizó la cosecha de carpóforos para la medición de los parámetros de productividad, físico-químicos y compuestos con actividad antioxidante (Figura 4).

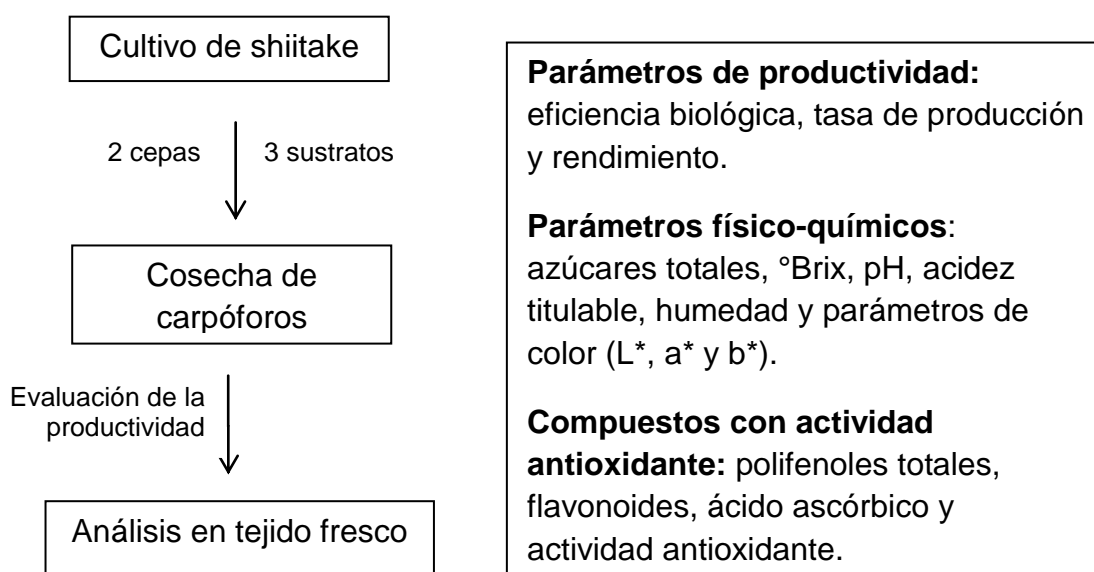


Figura 4. Esquema de trabajo

7.2 Cepas

Para realizar el presente estudio se emplearon dos cepas de *Lentinula edodes* las cuales se encuentran depositadas en el Cepario de Hongos del Instituto de Ecología A.C., en Xalapa, Veracruz, México y registradas como IE-245 e IE-256. Las cepas fueron donadas por la Station de Recherches sur les Champignons (INRA) de Francia, con el registro original V084 Y S610 respectivamente. Las cepas se mantuvieron en el medio de cultivo papa, dextrosa y agar (PDA) (BIOXON, E.U.A.) a 25 °C.

7.3 Cultivo de *Lentinula edodes*

7.3.1 Resiembra de cepas

Las cepas objeto de estudio de *L. edodes*, se resembraron en el medio PDA (papa, dextrosa y agar) el cual se preparó según las indicaciones del fabricante y después se esterilizó por 20 min a 121 °C. Una vez solidificado el agar en cajas Petri, se colocó en el centro de las mismas un fragmento del micelio del hongo, utilizando una campana de flujo laminar de seguridad biológica con flujo continuo. Posteriormente, se incubaron a 25 °C por 20 días en completa oscuridad.

7.3.2 Elaboración del inóculo

Para la elaboración del “inóculo o semilla” se utilizó semilla de mijo, la cual se lavó e hidrató por inmersión con agua corriente por 24 h a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo, se lavaron nuevamente y se escurrió el exceso de agua. Las semillas de mijo (*Panicum miliaceum* L.) se mezclaron con polvo de madera de encino, CaSO₄ y peat moss (*Sphagnum*) con la siguiente proporción en base seca: 88.5%, 8.8%, 1.3% y 1.3%. Se colocaron 60 g (peso fresco) de esta mezcla en bolsas de plástico y se esterilizaron por 1.5 h a 121 °C. La mezcla estéril se inoculó con 1.0 cm² de micelio de cada cepa y se incubó en total oscuridad durante 25 días a 25 ± 1 °C.

7.3.3 Preparación del sustrato

Shiitake fue producido sobre rastrojo de sorgo (*Sorghum* spp.) (RS), bagazo de caña (*Saccharum officinarum* L.) (BC) y como control viruta de madera de encino (*Quercus xalapensis* Humb y Bonpl.) (ME). Los sustratos fueron secados por exposición directa al sol, posteriormente se hidrataron durante 12 h por inmersión en agua, para obtener humedad del 70%, 83.5% y 48% para RS, BC, y ME respectivamente. La fórmula del sustrato con los demás ingredientes y

suplemento mezclados fue la siguiente: sustrato base (89.5%), salvado de trigo (10%), cal (0.25%) y yeso (0.25%).

Posteriormente, se colocaron 1.2 kg (peso húmedo) de cada sustrato (6 réplicas por tratamiento) en bolsas de polipropileno de 19.5 x 40 cm con filtro microporo (Unicorn Import and Manufacturing, Commerce, TX) y se esterilizaron durante 1.5 h a 121 °C. Las bolsas se enfriaron y se inocularon en condiciones de asepsia, con 5 % (w/w) de inóculo previamente preparado de cada una de las cepas. Las bolsas inoculadas se etiquetaron con fecha, número de cepa y formulación. Se determinó porcentaje de humedad y pH de cada sustrato, después de su esterilización.

7.3.4 Incubación

Las bolsas inoculadas y debidamente cerradas se colocaron sobre estantes metálicos en un cuarto acondicionado para tal efecto. En esta etapa el control de la temperatura fue esencial. La incubación se llevó a cabo en condiciones de total oscuridad a una temperatura óptima de crecimiento micelial controlada de 25 a 28 °C por 50 días, evitando cambios bruscos en la misma. En esta etapa se registró la aparición de exudado, cobertura del micelio en el sustrato, aparición de costra (pseudoesclerocio), temperatura y humedad relativa. A los 40 días de incubación, las muestras con ME se trasladaron al área de producción, a los 45 días los de RS y a los 50 los de (BC).

7.3.5 Producción

Las condiciones de producción fueron: temperatura de 18 °C, humedad del 75-90 %, periodos de 12 h oscuridad / 12 h luz y circulación de aire forzado para mantener niveles bajos de CO₂. La bolsa plástica de cada muestra se retiró 5 días después bajo estas condiciones. La cosecha de los carpóforos frescos se realizó

entre los 10 y 15 días de crecimiento. Las muestras se revisaron periódicamente para dar seguimiento al desarrollo de los hongos.

7.4 Parámetros de productividad

La productividad de los hongos se determinó con base en los parámetros de eficiencia biológica (EB), tasa de producción (TP) y rendimiento (R), los cuales se calcularon con las siguientes ecuaciones:

$$EB (\%) = \text{peso fresco de hongos} / \text{peso seco de sustrato} \dots\dots\dots (\text{Ecuación 1})$$

$$TP (\%) = EB / \text{tiempo de incubación y producción} \dots\dots\dots (\text{Ecuación 2})$$

$$R (\%) = \text{peso fresco de hongos} / \text{peso fresco de sustrato} \dots\dots\dots (\text{Ecuación 3})$$

Además se pesó y midió cada carpóforo por paquete y por tratamiento de acuerdo al diámetro del píleo: G1 < 5 cm, G2 5-9.9 cm, G3 10-14.9 cm y G4 mayores de 15 cm.

7.5 Análisis físico-químicos y compuestos con actividad antioxidante

7.5.1 Preparación de los extractos

Se utilizaron carpóforos frescos de la primera cosecha en su estado adulto, de entre 10 y 15 días de crecimiento. Cada carpóforo de la misma condición (cepa/sustrato), se cortó en pequeños cuadros de aproximadamente 5 mm de largo; posteriormente se homogenizaron (Nutribullet, NBR-12XX, LA, E.U.A.) a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 s con el solvente apropiado para obtener tres extractos: metanólico (20 g de tejido fresco con 80 mL de

disolvente), etanólico (1 g de tejido con 30 mL de disolvente) y acuoso (20 g de tejido con 80 mL de disolvente).

Los extractos metanólico y acuosos se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min a 10 °C (Hettich zentrifuge, Universal 32R, Tuttlingen, Alemania). El extracto etanólico se conservó en congelación durante 24 h antes de centrifugar bajo las mismas condiciones.

7.5.2 Azúcares totales

El contenido de azúcares se determinó con el método fenol sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Se mezclaron 100 µL de sobrenadante del extracto etanólico y 900 µL de agua destilada. Se adicionaron 100 µL de fenol al 80% (v/v) y 5 mL de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se incubó a 30 °C durante 20 min antes de leer la absorbancia a 490 nm. La cuantificación se realizó utilizando una curva estándar de glucosa (0.006 a 0.12 mg mL⁻¹) (Figura A1).

7.5.3 Sólidos solubles totales (SST)

Para los SST el extracto acuoso se leyó directamente en un refractómetro digital (ATAGO, PR-32, Tokyo, Japan) previamente calibrado con agua destilada y los resultados se expresaron como °Brix (Aquino-Bolaños *et al.*, 2013).

7.5.4 Acidez titulable y pH

Se analizaron con métodos estándar (AOAC, 1999). En el sobrenadante del extracto acuoso se midió directamente el pH con un potenciómetro (OAKTON, 510, Vernon hills, E.U.A.) calibrado con soluciones amortiguadoras pH 4 y 7. Para medir la acidez, se colocaron 10 mL del extracto en un matraz Erlenmeyer, adicionando 3 gotas de fenolftaleína y se tituló con una solución de NaOH 0.01 N

hasta un vire de transparente a rosa. Se anotó el volumen de NaOH requerido para la neutralización. Para la cuantificación se empleó la Ecuación 4, y el resultado se expresó como g de ácido málico por cada 100 g de muestra.

$$\text{g ác. málico} = [(\text{mL NaOH}) (0.01 \text{ N}) (\text{meq ác. málico}) / 100 \text{ g}] \times 100..(\text{Ecuación 4})$$

7.5.5 Humedad

Después de cosechados, los carpóforos fueron fraccionados y 5 g se utilizaron para medir la humedad con una balanza electrónica para humedad (VELAB VE-50-5 Illinois E.U.A.).

7.5.6 Parámetros de color

El color del hongo se evaluó usando un espectrofotómetro (Konica Minolta, CM-2600d, Osaka, Japón). Los parámetros registrados fueron:

L*. Valor correspondiente a la luminosidad. Su escala es de 0 a 100, describiendo al negro y blanco respectivamente.

a*. Su eje hace referencia a los colores que van de verde a rojo, con signos negativos y positivos respectivamente.

b*. Su eje hace referencia a los colores que van del azul al amarillo, con signos negativos y positivos respectivamente.

A partir de los parámetros L*, a* y b* se calculó la cromaticidad (C*), ángulo de matiz (h°) (McGuire, 1992) e índice de blancura (WI).

C*.Cromaticidad. Indica a la pureza del color observado. Se calcula a través de la Ecuación 5.

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \dots\dots\dots(\text{Ecuación 5})$$

h°. Ángulo de matiz. Este valor describe el tono y corresponde a un ángulo inferior a 360° donde 0, 90, 180, y 270° representan a los colores rojo-purpura, amarillo, verde y azul respectivamente. Se calcula a través de la Ecuación 6.

$$h^\circ = \text{artg} (b^*/a^*) \dots\dots\dots(\text{Ecuación 6})$$

IW. Índice de blancura. Corresponde al grado de blancura de la superficie de la muestra. Una superficie blanca ideal debe tener un IW = 100. Cuando la diferencia entre el blanco ideal y el de la superficie que se evalúa se incrementa entonces IW disminuye. Se calcula mediante la Ecuación 7 (Montoya-López *et al.*, 2012).

$$IW = 100 - [(100 - L^*)^2 + (a^{*2} + b^{*2})]^{1/2} \dots\dots\dots(\text{Ecuación 7})$$

7.5.7 Polifenoles totales

La concentración de polifenoles totales se midió por espectrofotometría basado en una reacción oxido/reducción. Para ello se utilizó el reactivo Folin-Ciocalteu de acuerdo al método modificado de Singleton y Rossi (1965). A 400 µL de sobrenadante del extracto metanólico, se le agregó 1 mL de agua destilada y se hizo reaccionar con 200 µL de Folin-Ciocalteu. Después de 5 a 8 min, se adicionaron 2 mL de Na₂CO₃ (75 g / 100 mL) y se aforó a 5 mL con agua destilada. La muestra se agitó manualmente y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h antes de leer su absorbancia a 750 nm (JENWAY 6305, Sttafordshire, United Kingdom).

La cuantificación se realizó con una curva estándar de ácido gálico (0.02 a 0.12 mg mL⁻¹) (Figura A2) y se reportó como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de hongo en base seca (mg EAG g⁻¹ bs).

7.5.8 Flavonoides

El contenido de flavonoides se determinó de acuerdo al método descrito por Zhishen *et al.* (1999). Para ello, 250 µL de sobrenadante del extracto metanólico de la muestra se mezcló con 75 µL de NaNO₂ (5 g / 100 mL) y se agitó en un vortex antes de agregar 150 µL de AlCl₃ 10 g / 100 mL y se incubó durante 5 min. Posteriormente, se adicionaron 500 µL de NaOH 1 M y se aforó a 3 mL con agua destilada. La absorbancia se midió a 510 nm. Para la cuantificación se utilizó una curva estándar de (+)-catequina (0.83 a 4.16 µg mL⁻¹) (Figura A3) y los valores se expresaron como mg equivalentes de catequina por gramo de tejido (mg catequina g⁻¹ bs).

7.5.9 Ácido ascórbico

El contenido de ácido ascórbico se determinó de acuerdo a Miller (2001). Del sobrenadante del extracto acuoso se tomaron 2 mL y fueron titulados con la sal 2,6-dicloroindofenol hasta obtener un vire de incoloro a rosa, registrando el volumen utilizado. Para la cuantificación se utilizó una curva de calibración con ácido ascórbico de 0.002 a 0.2 mg mL⁻¹ (Figura A4).

7.5.10 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se midió de acuerdo al método de Brand-Williams *et al.* (1995). Se tomaron 100 µL de sobrenadante del extracto metanólico y se hicieron reaccionar con 2.9 mL de reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) [3.9 mg /100 mL⁻¹ de metanol al 80% (v/v)]. Se agitó manualmente, se incubó durante

30 min a 25 °C y posteriormente se leyó a 517 nm. Para la cuantificación se utilizó una curva estándar de Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (0.13-0.79 $\mu\text{mol Eq Trolox mL}^{-1}$) (Figura A5). El resultado fue expresado como micromoles equivalentes de Trolox por cada gramo de hongo ($\mu\text{mol Eq Trolox g}^{-1}$ bs).

7.6. Análisis estadístico

Se realizó un modelo bifactorial completamente aleatorio con seis réplicas para los parámetros de productividad y cuatro para los parámetros físico-químicos y compuestos con actividad antioxidante. Los factores independientes fueron tipo de cepa y tipo de sustrato y las variables de respuesta para los parámetros de productividad fueron: eficiencia biológica, tasa de producción y rendimiento; para los parámetros físico-químicos y compuestos con actividad antioxidante: azúcares totales, °Brix, pH, acidez titulable, humedad y parámetros de color L^* , a^* y b^* , polifenoles totales, flavonoides, ácido ascórbico y actividad antioxidante.

Las variables de respuesta fueron analizadas utilizando modelos lineales generalizados (GLM), con un diseño bifactorial con su respectiva interacción y fueron transformadas a valores ranqueados para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Los resultados se expresaron como valores medios y error estándar (ES). Se realizó la comparación múltiple de los valores promedio de cada variable de respuesta por el método de Tukey ($\alpha=0.05$). Los análisis fueron procesados en el software Statistica 7.0.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Producción de carpóforos

El pH y el porcentaje de humedad de los sustratos antes del proceso de inoculación fue de 5.30 y 48 % para ME, 5.54 y 70 % para RS y 5.70 y 83.5 % para BC respectivamente.

El periodo de incubación (PI) para la formación de primordios estuvo en el intervalo de 40 a 50 días dependiendo del sustrato, para el tiempo de incubación se consideró la formación de pseudoesclerocio y aparición de conglomerados miceliales. El menor tiempo se registró con el sustrato ME seguido de RS y por último BC (Cuadro 3). El PI para la cepa IE-245 fue menor comparado con IE-256. Un resultado similar de PI \approx 50 días fue reportado por Mata *et al.* (2014) usando como sustratos paja de cebada (*Hordeum vulgare* L.), bagazo de caña de azúcar, aserrín de roble (*Quercus* sp.) y hojarasca de haya (*Platanus mexicana* Moric.).

El periodo de producción (PP) para la cepa IE-245 fue similar con los tres sustratos (28-30 días), mientras que con la cepa IE-256 hubo mayor variación (30–50 días). La cepa IE-245 presentó sólo dos cosechas en todos los sustratos, mientras que de la cepa IE-256 se obtuvieron tres, excepto en RS. La mayor cantidad de carpóforos se generó con el tratamiento IE-256/RS (371.30 g) y la menor con IE-245/BC (139.66 g) (Cuadro 3). Peralta Márquez y Frutis Molina (2010) obtuvieron 327.3 g de carpóforos en tres cosechas cuando cultivaron shiitake en paja de trigo pasteurizada y suplementada.

Cuadro 3. Producción de carpóforos frescos de *Lentinula edodes* en viruta de madera de encino (ME), rastrojo de sorgo (RS) y bagazo de caña (BC).

Cepa	Sustrato	PI	PP	Cosechas	Peso total (g) ^a	Producción por cosechas (%) ^b		
						Primera	Segunda	Tercera
IE-245	ME	40	28	2	234.70± 29.33 ^{abc}	85.15	14.84	
	RS	45	30	2	253.85± 32.79 ^{abc}	92.38	7.61	
	BC	50	30	2	139.66± 29.33 ^a	91.56	8.43	
IE-256	ME	45	37	3	273.33± 26.77 ^{bc}	71.57	23.91	4.51
	RS	48	30	2	371.30± 32.79 ^c	83.61	16.38	
	BC	50	50	3	195.40± 32.79 ^{ab}	81.44	11.28	7.27

Los valores son promedios ± error estándar de seis repeticiones. Valores en una columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

PI periodo de incubación (tiempo desde inoculación hasta formación de pseudoesclerocios), PP periodo de producción (tiempo desde la formación de primordios hasta la última cosecha).

^aPeso fresco de los hongos cosechados de las seis réplicas.

^bDistribución de peso total de hongos obtenidos en cada cosecha, estimado en porcentaje.

De acuerdo al diámetro del píleo, los hongos obtenidos se clasificaron principalmente dentro de los grupos G1 y G2. Sólo los tratamientos IE-245/RS, IE-256/ME e IE-256/BC produjeron carpóforos del grupo G3 y únicamente el tratamiento IE-256/ME produjo carpóforos del grupo G4 (2 carpóforos) con un peso de 174.45 g (Cuadro 4). En forma similar, Sobal *et al.* (2010) reportaron carpóforos de shiitake clasificados como G1, G2 y G3, éstos fueron cultivados en formulaciones que incluían como sustrato base aserrín de encino (*Quercus acutifolia* Neé), aserrín de *Bursera* (*B. simaruba* L. Sarg.), olote de maíz (*Zea mays* L.) y bagazo de caña de azúcar.

Cuadro 4. Número de hongos y peso de carpóforos de *Lentinula edodes* cosechados de diferentes sustratos evaluados.

Cepa	Sustrato	Número y peso promedio (g) de hongos por grupos de tamaño			
		G1	G2	G3	G4
IE-245	ME	95 (101.79)	61 (132.91)	0 (0)	0 (0)
	RS	30 (52.02)	28 (138.57)	3 (63.26)	0 (0)
	BC	9 (9.82)	19 (129.84)	0 (0)	0 (0)
IE-256	ME	5 (10.41)	7 (22.91)	2 (65.56)	2 (174.45)
	RS	123 (206.10)	35 (165.10)	0 (0)	0 (0)
	BC	12 (33.08)	16 (63.15)	7 (99.17)	0 (0)

Número y peso de los hongos de acuerdo al diámetro de píleo: G1 < 5 cm, G2 5-9.9 cm, G3 10-14.9 cm y G4 mayores de 15 cm.

Los valores promedio de EB mostraron diferencias con respecto a la cepa, al sustrato y sus interacciones (Cuadro 1A). El valor más alto de EB se registró con el tratamiento IE-256/RS (103.71%), por el contrario el tratamiento IE-245/ME presentó el valor más bajo (41.99) (Cuadro 5). Los valores de EB obtenidos están dentro del intervalo citado en anteriores estudios (36.3-320.1%) donde utilizaron sustratos alternativos como brácteas de piña, paja de cebada, paja de trigo (*Triticum aestivum* L.), rastrojo de maíz, aserrín de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam) y bagazo de caña de azúcar (Salmones *et al.*, 1999; Ashrafuzzaman *et al.*, 2009; Peralta Márquez y Frutis Molina 2010; Gaitán-Hernández *et al.*, 2014).

En general, el valor más alto de EB se obtuvo por la cepa IE-256 (70.74%) independientemente del sustrato (Cuadro 6). Por otra parte, la mayor EB se registró en el sustrato RS (87.31%) independientemente de la cepa (Cuadro 7).

Cuadro 5. Productividad de cepas de *Lentinula edodes* en cada uno de los sustratos evaluados.

Sustrato	Cepa	EB (%)	TP (%)	R (%)
ME	IE-245	41.99± 5.11 ^a	0.61± 0.06 ^a	25.45± 1.94 ^{bc}
	IE-256	42.59± 6.26 ^a	0.51± 0.07 ^a	25.81± 2.37 ^{bc}
RS	IE-245	70.90± 6.26 ^b	0.94± 0.07 ^b	23.63± 2.37 ^{ab}
	IE-256	103.71± 6.26 ^c	1.32± 0.07 ^c	34.57± 2.37 ^c
BC	IE-245	62.88± 6.26 ^{ab}	0.78± 0.07 ^{ab}	15.72± 2.37 ^a
	IE-256	65.94± 6.26 ^{ab}	0.62± 0.07 ^{ab}	16.48± 2.37 ^{ab}

Los valores son promedios ± error estándar de seis repeticiones, valores en una columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey). EB eficiencia biológica, TP tasa de producción, R rendimiento.

Cuadro 6. Productividad de *Lentinula edodes* por cepa evaluada

	IE-245	IE-256
EB (%)	58.59 ± 3.41 ^a	70.74 ± 3.61 ^b
TP (%)	0.78 ± 0.04 ^a	0.82 ± 0.04 ^a
R (%)	21.60 ± 1.29 ^a	25.62 ± 1.37 ^b

Los valores son promedios ± error estándar de seis repeticiones, valores en una fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

Cuadro 7. Productividad de *Lentinula edodes* por sustrato evaluado

	ME	RS	BC
EB (%)	42.29 ± 4.04 ^a	87.31 ± 4.43 ^c	64.41 ± 4.43 ^b
TP (%)	0.56 ± 0.04 ^a	1.13 ± 0.05 ^b	0.70 ± 0.05 ^a
R (%)	25.63 ± 1.53 ^b	29.10 ± 1.68 ^c	16.10 ± 1.68 ^a

Los valores son promedios ± error estándar de seis repeticiones, valores en una fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

El crecimiento de los carpóforos se ha asociado con las características del sustrato, entre otros, la humedad del mismo es un factor determinante, ya que se sabe que la nutrición del hongo depende del agua debido a que adquiere sus nutrientes por absorción y de esta forma las enzimas extracelulares e intracelulares los metabolizan (De León *et al.*, 2012). Dicha actividad enzimática podría degradar y aprovechar en mayor o menor proporción los nutrientes del sustrato dependiendo de la cepa.

La TP no fue afectada por el factor cepa, pero si por el sustrato y sus interacciones (Cuadro 1A). Los valores más altos de TP se observaron con el sustrato RS, con valores de 1.32% y 0.94%, con la cepa IE-256 e IE-245, respectivamente (Cuadro 5), éstos valores son mayores a los registrados por Royse (1985) en shiitake cultivado en aserrín de arce (*Acer spp.*) y abedul (*Betula alba*) (0.29 a 0.79%). Gaitán-Hernández *et al.* (2014) reportaron un amplio intervalo de TP cuando utilizaron paja de trigo (*Triticum aestivum* L.) como sustrato (0.30 a 3.40%). Los sustratos ME y BC evaluados en este estudio tuvieron valores menores sin presentar diferencia entre ellos.

En general, el valor más alto de TP se obtuvo por la cepa IE-256 (0.82%) independientemente del sustrato (Cuadro 6). Por otra parte, la mayor TP se registró en el sustrato RS (1.13%) independientemente de la cepa (Cuadro 7).

El R fue afectado por la cepa y el sustrato pero no por sus interacciones (Cuadro 1A). Los valores más altos de R se obtuvieron en los tratamientos IE-256/RS, IE-256/ME e IE-245/ME; por el contrario valor menor de R se presentó en IE-245/BC (Cuadro 5). El intervalo de los valores de R observado en este estudio (15.72-34.57) es mayor al reportado por Kilpatrick *et al.* (2000) (5 a 31%) utilizando paja de trigo como sustrato.

Los resultados de R presentados en este experimento con los sustratos RS y ME y con ambas cepas fueron mayores a los reportados por Gaitán-Hernández *et al.* (2006a) quienes trabajaron con paja de cebada y paja de trigo y con la cepa IE-245 (20.33 y 21.86 %). En general, el valor más alto de R se obtuvo por la cepa IE-256 (25.62%) independientemente del sustrato (Cuadro 6). Por otra parte, el mayor R se registró en el sustrato RS (29.10%) independientemente de la cepa (Cuadro 7).

8.2 Parámetros físico-químicos

8.2.1 Azúcares totales

Los valores promedio del contenido de azúcares fueron diferentes entre las cepas y entre sustratos, así como sus interacciones (Cuadro 1A).

El mayor contenido de azúcares se observó en los carpóforos del tratamiento IE-256/RS (17.61 mg glucosa g⁻¹ bs) y la menor cantidad se registró en los hongos del tratamiento IE-256/ME (5.40 mg glucosa g⁻¹ bs) (Figura 5). En general, el mayor contenido de azúcares se obtuvo por la cepa IE-256 (11.82 mg glucosa g⁻¹ bs) independientemente del sustrato (Cuadro 8). Por otra parte, la mayor concentración se registró en el sustrato RS (15.13 mg glucosa g⁻¹ bs) independientemente de la cepa (Cuadro 9).

La diferencia observada en el contenido de azúcares de los carpóforos cultivados con diferentes cepas y sustratos podría atribuirse a la actividad de las enzimas de tipo hidrolasa que están presente en los hongos y que transforman la celulosa y la hemicelulosa de los sustratos de crecimiento, produciendo monosacáridos como glucosa, fructosa, manosa, además de otros azúcares (Leonowicz *et al.*, 1999; Valverde *et al.*, 2015) que son utilizados por los hongos durante el proceso de respiración.

En el metabolismo celular, los azúcares son los compuestos principalmente utilizados para llevar a cabo el proceso de respiración (Kader y Saltveit, 2003). Entre los azúcares más abundantes en los hongos comestibles se encuentran la xilosa, la glucosa y la ribosa. En *L. edodes*, manitol podría participar en el crecimiento de los carpóforos dándoles volumen y firmeza (Kalac, 2013).

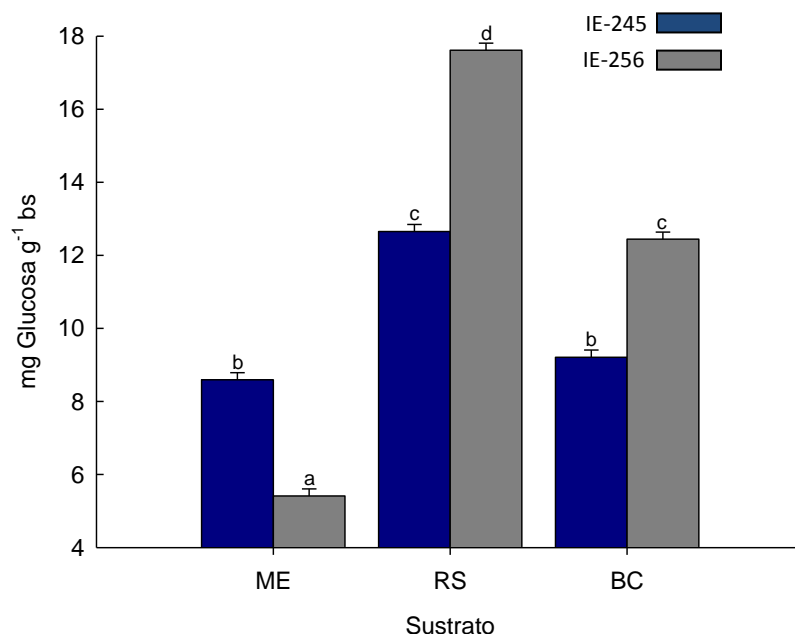


Figura 5. Contenido total de azúcares en carpóforos de dos cepas de *L. edodes* cultivadas en viruta de madera de encino (ME), rastrojo de sorgo (RS) y bagazo de caña de azúcar (BC). Las barras representan el promedio \pm error estándar de cuatro repeticiones. Barras con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

Cuadro 8. Parámetros fisicoquímicos en carpóforos de *Lentinula edodes* por cepa evaluada

	IE-245	IE-256
Azúcares (mg glucosa g ⁻¹ bs)	10.15 ± 0.11 ^a	11.82 ± 0.11 ^a
SST (° Brix)	5.60 ± 0.13 ^a	5.82 ± 0.13 ^a
pH	5.82 ± 0.02 ^a	5.70 ± 0.02 ^a
Acidez titulable (g ác. málico g ⁻¹ bs)	0.01 ± 0.0002 ^a	0.02 ± 0.0002 ^b
Humedad (%)	90.40 ± 0.16 ^a	92.51 ± 0.16 ^b
L*	47.09 ± 1.84 ^a	43.35 ± 1.84 ^a
h°	66.36 ± 1.35 ^b	58.05 ± 1.35 ^a

Los valores son promedios ± error estándar de cuatro repeticiones, valores en una fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

Cuadro 9. Parámetros fisicoquímicos en carpóforos de *Lentinula edodes* por sustrato evaluado

	ME	RS	BC
Azúcares (mg glucosa g ⁻¹ bs)	7.00 ± 0.13 ^a	15.13 ± 0.13 ^c	10.82 ± 0.13 ^b
SST (° Brix)	5.07 ± 0.16 ^a	4.95 ± 0.16 ^a	7.10 ± 0.16 ^b
pH	5.83 ± 0.02 ^b	5.84 ± 0.02 ^b	5.62 ± 0.02 ^a
Acidez titulable (g ác. málico g ⁻¹ bs)	0.019 ± 0.0002 ^a	0.022 ± 0.0002 ^a	0.021 ± 0.0002 ^a
Humedad (%)	91.86 ± 0.20 ^b	92.75 ± 0.20 ^b	89.77 ± 0.20 ^a
L*	36.49 ± 2.25 ^a	48.61 ± 2.25 ^b	50.55 ± 2.25 ^b
h°	54.16 ± 1.65 ^a	67.43 ± 1.65 ^b	65.02 ± 1.65 ^b

Los valores son promedios ± error estándar de cuatro repeticiones, valores en una fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

8.2.2 Sólidos solubles totales

Los valores promedio de SST fueron diferentes entre los sustratos, pero no entre las cepas y sus interacciones (Cuadro 1A). El contenido de SST en carpóforos fue mayor en el tratamiento IE-256/BC (7.37 °Brix) (Figura 6). En general, el valor más alto de SST se obtuvo por la cepa IE-256 (5.82 °Brix) independientemente del sustrato (Cuadro 8). Por otra parte, el mayor valor de SST por sustrato se registró en BC (7.10 °Brix) (Cuadro 9). Un valor más bajo fue reportado por Jiang *et al.* (2012) registrando 4.5 °Brix en *L. edodes* cosechados de una granja local en Hangzhou, China.

El contenido de SST se asocia con el contenido de moléculas como ácidos orgánicos, azúcares y lípidos (Waithaka *et al.*, 2001). Se observó una correlación alta entre SST y acidez titulable en los carpóforos cosechados ($r_p= 0.76$), mientras que con los azúcares fue baja ($r_p= 0.32$).

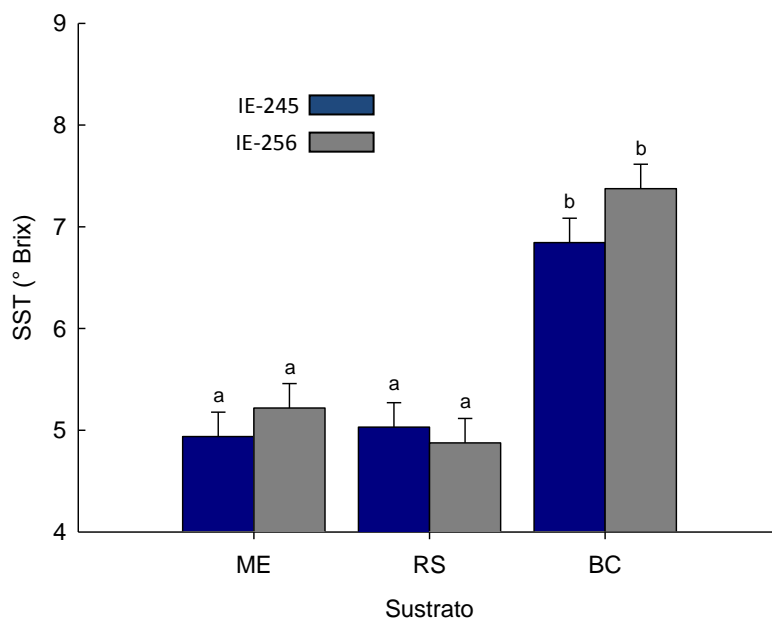


Figura 6. Contenido de sólidos solubles totales en carpóforos de dos cepas de *L. edodes* cultivadas en ME, RS, y BC. Las barras representan el promedio \pm error estándar de cuatro repeticiones. Barras con diferentes letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

8.2.3 pH y acidez titulable

Como parte del metabolismo celular de los hongos se generan ácidos orgánicos que acidifican el medio durante la fermentación (Kapritchkoff *et al.*, 2006). El pH registrado en los carpóforos fue de 5.4 a 5.9 (Cuadro 10) y fue diferente entre las cepas, sustratos y entre sus interacciones. (Cuadro 1A). En general, el valor más alto de pH se obtuvo por la cepa IE-245 (5.82) independientemente del sustrato (Cuadro 8). Por otra parte, el mayor pH se registró en el sustrato RS (5.84) independientemente de la cepa (Cuadro 9).

Cuadro 10. pH en carpóforos de dos cepas de *L. edodes* cultivadas en tres sustratos.

Cepa	pH		
	ME	RS	BC
IE-245	5.74 ± 0.03 ^a	5.91 ± 0.03 ^a	5.82 ± 0.03 ^a
IE-256	5.92 ± 0.03 ^a	5.76 ± 0.03 ^a	5.42 ± 0.03 ^b

Los valores son promedio (± error estándar) de cuatro repeticiones, valores con diferentes letras entre columnas y filas son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

El contenido de ácido málico en carpóforos varió entre las cepas, entre los sustratos y sus interacciones (Cuadro 1A). Los tratamientos de la cepa IE-256 presentaron el mayor intervalo de acidez (0.021 - 0.027 g ác. málico g⁻¹ bs) (Figura 7), mientras que la concentración más baja de ácido málico se observó en el tratamiento IE-245/BC, sin embargo, el valor más bajo de acidez por sustrato independientemente de la cepa fue con ME (Cuadro 9). Barros *et al.* (2013) reportaron una concentración de 0.028 g ác. málico g⁻¹ bs en hongos de *L. edodes* obtenido comercialmente; ellos indicaron que este ácido es de los más abundantes en esta especie.

Ribeiro *et al.* (2008) encontraron que en hongos comestibles como *Amanita rubescens* (Pers.) Fr. y *Boletus edulis* (Bull) Forq. los ácidos orgánicos presentes son el ácido málico, cítrico, oxálico y fumárico.

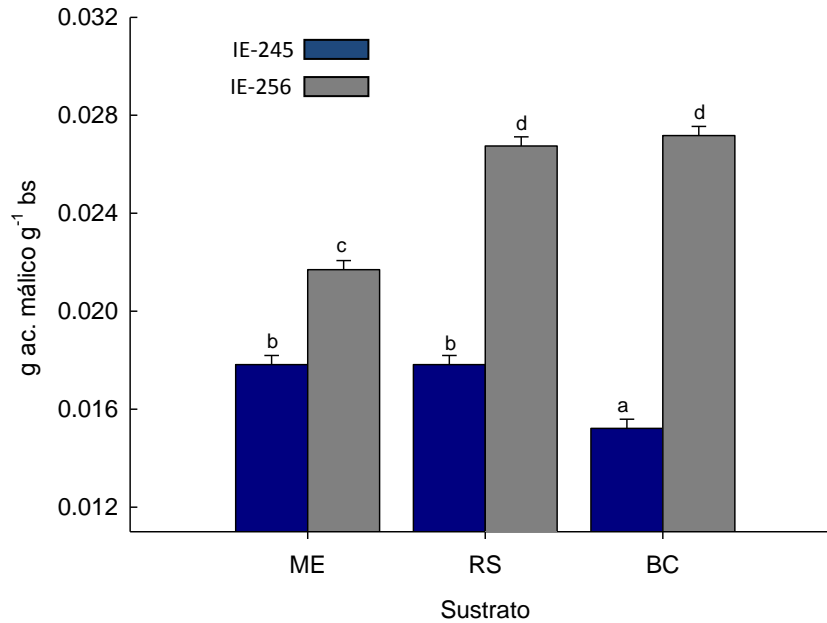


Figura 7. Contenido de ácido málico en carpóforos de dos cepas de *L. edodes* cultivadas en diferentes sustratos. Las barras representan el promedio \pm error estándar de cuatro repeticiones. Barras con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

8.2.4 Humedad

La humedad de los carpóforos difirió entre las cepas y sustratos pero no entre sus interacciones (Cuadro 1A). El intervalo de humedad en los carpóforos de shiitake fue de 88.35 a 93.80% (Figura 8). Los carpóforos de la cepa IE-256 presentaron una humedad mayor en comparación con la IE-245 (92.51%) (Cuadro 8). Por otra parte, la mayor humedad de los hongos se registró en el sustrato RS (92.75%) independientemente de la cepa (Cuadro 9).

Los valores de humedad obtenidos en este trabajo son mayores al reportado por Balbi *et al.* (2013) (88.16%). En general los hongos poseen un alto porcentaje de humedad (80 a 95%), condición que se ha relacionado con una corta vida de anaquel (Barros *et al.*, 2007; Valverde *et al.*, 2015).

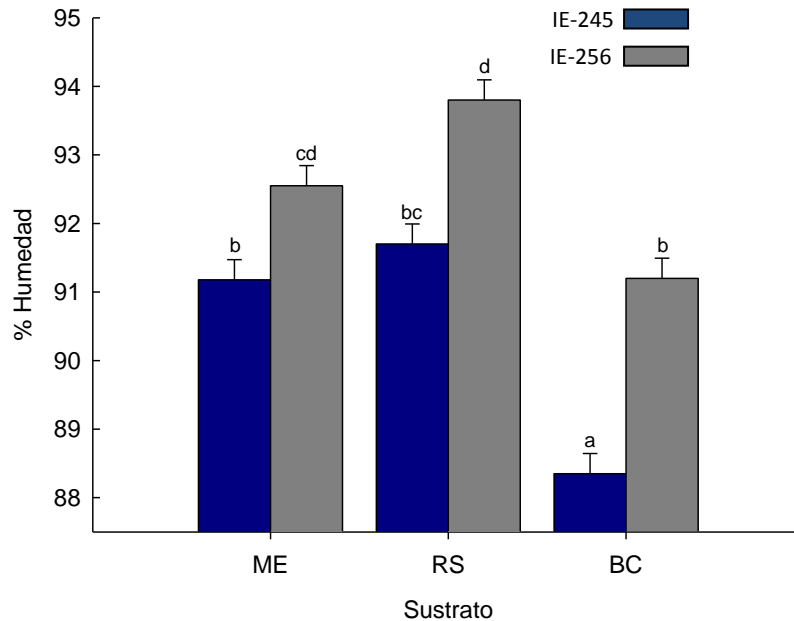


Figura 8. Porcentaje de humedad en carpóforos de dos cepas de *L. edodes* cultivadas en diferentes sustratos. Las barras representan el promedio \pm error estándar de cuatro repeticiones. Barras con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

8.2.5 Color

En el análisis realizado se encontró una amplia variación de color en los carpóforos (Figura 9). Variaciones en los parámetros de color se atribuyen a diversos factores como el sustrato utilizado durante la siembra, la intensidad de luz durante la producción, las condiciones de cosecha y la composición final del producto la cual podría estar relacionada con el color y oscurecimiento del carpóforo (Cortés *et al.*, 2011).

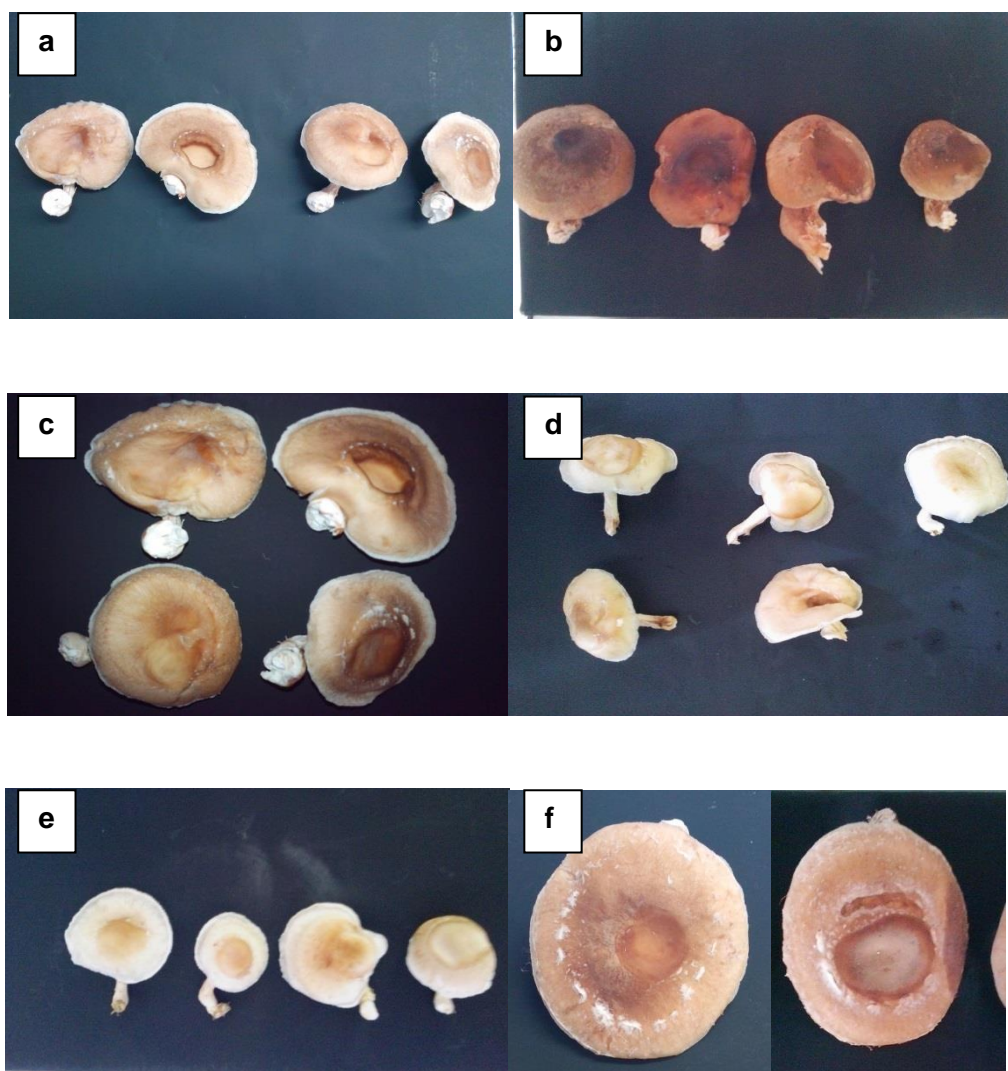


Figura 9. Coloración de los carpóforos de dos cepas de *L. edodes* cultivadas en viruta de madera de encino (ME), rastrojo de sorgo (RS) y bagazo de caña de azúcar (BC). Tratamientos: IE-245/ME (a), IE-256/ME (b), IE-245/RS (c), IE-256/RS (d), IE-245/BC (e), IE-256/BC (f).

Los valores de los parámetros L^* , a^* , b^* , C^* , h° e IW de las dos cepas cultivadas en los tres sustratos evaluados se observan en los cuadros 11 y 12.

Cuadro 11. Parámetros de color L*, a* y b* de los carpóforos de las dos cepas cultivadas en los tres sustratos evaluados.

Sustrato	Cepa	L*	a*	b*
ME	IE-245	42.54 ± 3.19 ^{ab}	13.22 ± 0.68 ^a	26.91 ± 1.57 ^a
	IE-256	30.45 ± 3.19 ^a	11.92 ± 0.68 ^{ba}	12.21 ± 1.57 ^{cb}
RS	IE-245	41.72 ± 3.19 ^{ab}	9.42 ± 0.68 ^b	22.37 ± 1.57 ^{ab}
	IE-256	55.51 ± 3.19 ^{bc}	9.68 ± 0.68 ^b	23.69 ± 1.57 ^{ab}
BC	IE-245	57.00 ± 3.19 ^c	8.90 ± 0.68 ^b	22.05 ± 1.57 ^{ab}
	IE-256	44.11 ± 3.19 ^{abc}	9.92 ± 0.68 ^b	17.69 ± 1.57 ^{ab}

Valores promedio ± error estándar de cuatro mediciones, valores en una columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

Cuadro 12. Parámetros de color C*, h° y IW de las dos cepas cultivadas en los tres sustratos evaluados.

Sustrato	Cepa	C*	h°	IW
ME	IE-245	29.98 ± 1.39 ^a	63.79 ± 2.34 ^a	35.16 ± 2.74 ^a
	IE-256	17.19 ± 1.57 ^{cb}	44.52 ± 2.34 ^b	28.24 ± 2.74 ^a
RS	IE-245	24.33 ± 1.39 ^{ab}	67.00 ± 2.34 ^a	36.80 ± 2.74 ^{ab}
	IE-256	25.60 ± 1.57 ^{ab}	67.85 ± 2.34 ^a	48.59 ± 2.74 ^{bc}
BC	IE-245	23.81 ± 1.57 ^{ab}	68.28 ± 2.34 ^a	50.72 ± 2.74 ^c
	IE-256	20.49 ± 1.57 ^b	61.77 ± 2.34 ^a	40.13 ± 2.74 ^{abc}

Valores promedio ± error estándar de cuatro mediciones, valores en una columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

El factor sustrato fue significativo en el parámetro L*, por el contrario el factor cepa no fue significativo, pero sí su interacción (Cuadro 1A). El tratamiento IE-256/ME registró el menor valor ($L^*=30.45$) indicando el color de carpóforos más oscuro; por el contrario en el tratamiento IE-245/BC se observó el valor más alto de $L^*=57.00$, indicando el color más claro (Figura 10, Cuadro 11), valor similar al reportado por Zweigle (2010) para *L. edodes* cultivado en cáscara de pistacho

($L^*=42.39$ a 43.58). De la cepa IE-245 se obtuvieron carpóforos con un mayor valor de L^* (Cuadro 8). Independientemente de la cepa, con BC se obtuvieron carpóforos de color más claro (Cuadro 9).

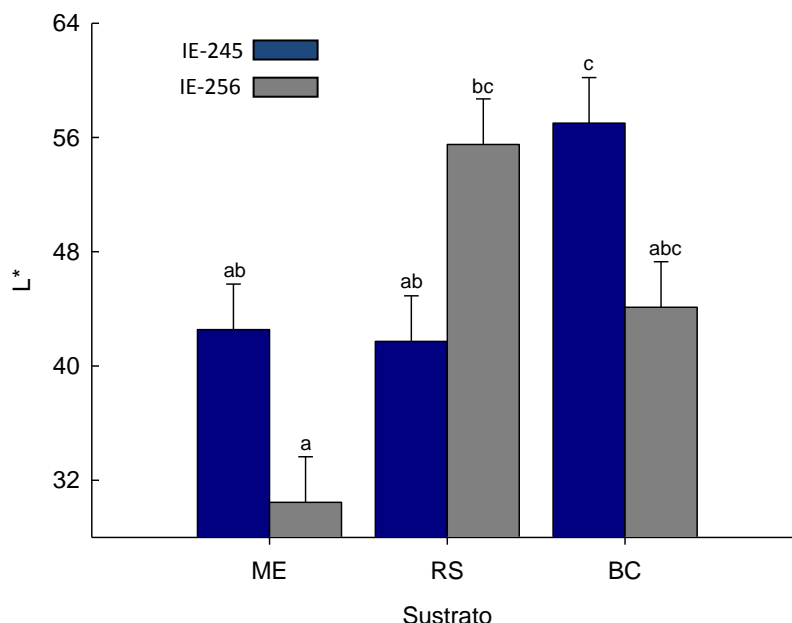


Figura 10. Valor de L^* en carpóforos de dos cepas de *L. edodes* cultivadas en tres sustratos. Las barras representan el promedio \pm error estándar de cuatro repeticiones. Barras con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

El ángulo de matiz h° también fue diferente respecto a los factores cepa y sustrato; así como sus interacciones (Cuadro 1A). El valor más bajo se presentó en el tratamiento IE-256/ME indicando un color intermedio entre el rojo y el amarillo ($h^\circ=44.52$) (McGuire, 1992). En el resto de los tratamientos los valores fueron > 61 que los ubicó en colores más cercanos al amarillo (Cuadro 12). Independientemente del sustrato, con la cepa IE-245 se obtuvieron carpóforos con valores más elevados de h° (Cuadro 8). Los hongos cosechados de ME fueron los que presentaron un color más cercano a rojo (Cuadro 9).

8.3 Compuestos con actividad antioxidante

8.3.1 Polifenoles totales

Los valores promedio de la concentración de polifenoles totales en carpóforos de shiitake mostraron diferencia respecto a los factores cepa y sustrato, además de sus interacciones (Cuadro 1A).

La concentración de polifenoles en carpóforos de shiitake se registró en un intervalo de 3.78 hasta 6.50 mg EAG g⁻¹ bs, valores ligeramente menores a lo reportado por Yildiz *et al.* (2015) (7.25 mg EAG g⁻¹ bs) y Vitrac *et al.* (2011) (8 a 15 mg EAG g⁻¹ bs), en éste último estudio utilizaron madera de roble como sustrato. La cepa IE-256 fue la que produjo carpóforos con mayor contenido de polifenoles independientemente del sustrato (Figura 11, Cuadro 13). Por otra parte, en general con el sustrato ME se obtuvieron hongos con mayor contenido de polifenoles (Cuadro 14).

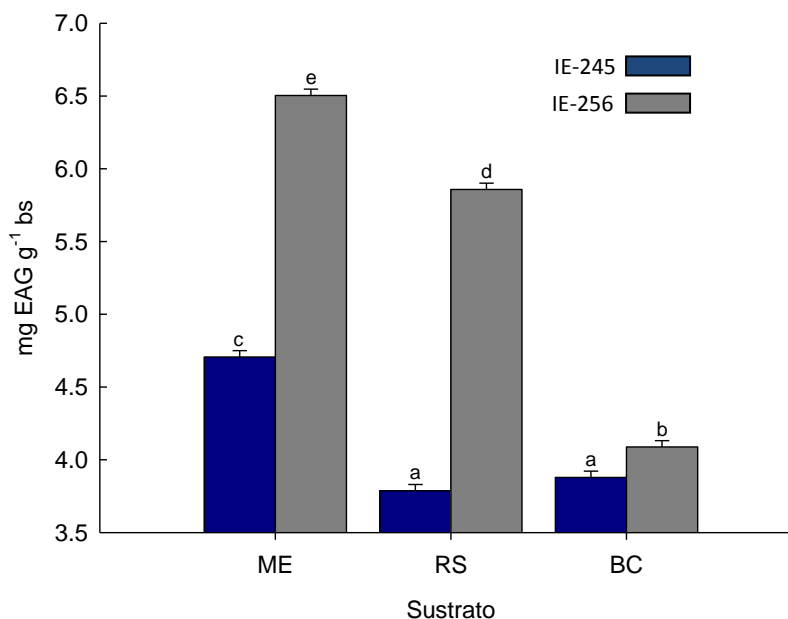


Figura 11. Contenido de polifenoles en carpóforos de dos cepas de *L. edodes* cultivadas en los sustratos evaluados. Las barras representan el promedio \pm error estándar de cuatro repeticiones. Barras con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey)

Cuadro 13. Compuestos con actividad antioxidante en carpóforos de *Lentinula edodes* por cepa evaluada

	IE-245	IE-256
Polifenoles (mg EAG g ⁻¹ bs)	4.12 ± 0.02 ^a	5.48 ± 0.02 ^b
Flavonoides (mg Catequina g ⁻¹ bs)	0.058 ± 0.0005 ^a	0.053 ± 0.0005 ^a
Ácido ascórbico (mg ác. ascórbico g ⁻¹ bs)	0.13 ± 0.009 ^b	0.08 ± 0.009 ^a
Act. Antioxidante (μmol Eq. trolox g ⁻¹ bs)	0.51 ± 0.005 ^a	0.68 ± 0.005 ^b

Los valores son promedios ± error estándar de cuatro repeticiones, valores en una fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

Cuadro 14. Compuestos con actividad antioxidante en carpóforos de *Lentinula edodes* por sustrato evaluado

	ME	RS	BC
Polifenoles (mg EAG g ⁻¹ bs)	5.60 ± 0.03 ^a	4.82 ± 0.03 ^{ab}	3.98 ± 0.03 ^a
Flavonoides (mg Catequina g ⁻¹ bs)	0.05 ± 0.0006 ^{ab}	0.07 ± 0.0006 ^b	0.03 ± 0.0006 ^a
Ácido ascórbico (mg ác. ascórbico g ⁻¹ bs)	0.10 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.01 ^a
Act. Antioxidante (μmol Eq. trolox g ⁻¹ bs)	0.74 ± 0.006 ^b	0.47 ± 0.006 ^a	0.57 ± 0.006 ^a

Los valores son promedios ± error estándar de cuatro repeticiones, valores en una fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

Los sustratos utilizados para el cultivo de hongos contienen principalmente lignina, celulosa y hemicelulosa; la degradación de la lignina se ha relacionado con la actividad de las enzimas manganeso peroxidasa y lacasa, produciendo fenoles simples (Kirk y Farrell, 1987; Chang y Miles, 2004; Montoya *et al.*, 2014).

En los carpóforos la biosíntesis de compuestos fenólicos es llevada a cabo por enzimas tales como las amonio-liasas que convierten a la fenilalanina y tirosina en ácidos fenólicos (Cheung, 2008).

La diferencia en el contenido de polifenoles observado podría estar relacionada con la actividad de éstos dos grupos de enzimas, las que degradan el sustrato y las que participan en la biosíntesis de polifenoles en los carpóforos. Recientemente Yildiz *et al.* (2015) reportaron en *L. edodes* la presencia de los ácidos fenólicos trans-cinámico, *p*-hidroxibenzoico, vanílico, siríngico, *p*-cumárico, protocatéquico, abscísico y gálico.

8.3.2 Flavonoides

El contenido promedio de flavonoides en los carpóforos de *L. edodes* varió entre las cepas los sustratos y sus interacciones (Cuadro 1A).

La concentración promedio de flavonoides en los carpóforos de shiitake fue mayor en el tratamiento IE-256/RS (0.096 mg catequina g⁻¹ bs) y se observó el valor más bajo con la misma cepa pero con BC (0.031 mg catequina g⁻¹ bs). La cepa IE-245 produjo la mayor cantidad de flavonoides con el sustrato ME (0.074 mg catequina g⁻¹ bs) mientras que con los sustratos RS y BC la concentración fue menor (Figura 12). El mayor contenido de flavonoides se obtuvo por la cepa IE-256 independientemente del sustrato (Cuadro 13). Por otra parte, la mayor concentración se registró en el sustrato RS independientemente de la cepa (Cuadro 14).

Tres de nuestros tratamientos presentaron concentraciones mayores al intervalo reportados por Mattila *et al.* (2001) (0.0008-0.05 mg catequina g⁻¹ bs). Mujic *et al.* (2010) registraron una concentración mayor (1.98 mg catequina g⁻¹ bs). En hongos comestibles, generalmente la concentración de flavonoides es baja y en shiitake se ha identificado principalmente la presencia de catequina (Kim *et al.*, 2008; Mujic *et al.*, 2010).

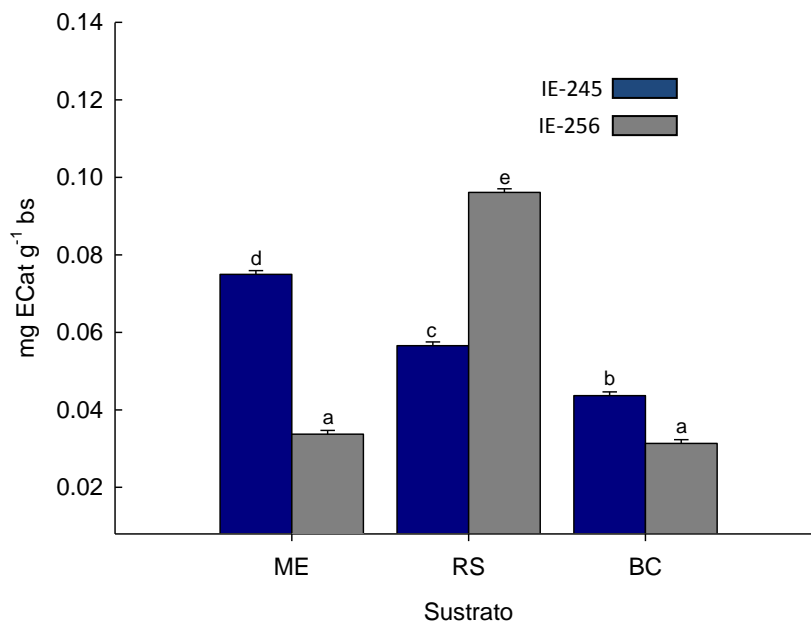


Figura 12. Contenido de flavonoides en carpóforos de dos cepas de *L. edodes* cultivadas en los sustratos evaluados. Las barras representan el promedio \pm error estándar de cuatro repeticiones. Barras con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

8.3.3 Ácido ascórbico

Otro compuesto con actividad antioxidante que se ha identificado en los hongos comestibles es el ácido ascórbico y su concentración se ha relacionado con la capacidad que tiene el hongo para retardar su proceso de senescencia (Jing-Jun *et al.*, 2012). Los valores promedios de ácido ascórbico en los carpóforos de *L. edodes* de este trabajo sólo fueron afectados por el factor cepa (Cuadro 1A).

La cepa IE-245 produjo carpóforos con mayor contenido de ácido ascórbico independientemente del sustrato, (Cuadro 13) siendo los hongos de la ME y BC los que presentaron las concentraciones más altas (0.14 mg ácido ascórbico g⁻¹ bs); la menor concentración para esta cepa se presentó con RS (0.10 mg ácido ascórbico g⁻¹ bs). Con la cepa IE-256 la mayor concentración de ácido ascórbico se observó con el sustrato BC (0.11 mg ácido ascórbico g⁻¹ bs) y la menor con ME (0.06 mg ácido ascórbico g⁻¹ bs) (Cuadro 15). Los carpóforos con mayor contenido de ácido ascórbico por sustrato evaluado fueron los cultivados en BC (Cuadro 14).

Chen *et al.* (2015) reportaron una concentración de 0.18 a 0.50 mg ácido ascórbico g⁻¹ bs en shiitake analizado en diferentes estados de maduración y cosechados de una granja local en Shanghai, China. Por el contrario Li y Chang (1985) y Mattila *et al.* (2001) reportaron valores más bajos de 0.040 a 0.059 mg ácido ascórbico g⁻¹ bs.

Cuadro 15. Contenido de ácido ascórbico en carpóforos de *L. edodes* cosechados de los sustratos evaluados.

Cepa	Sustrato	mg ác. ascórbico g ⁻¹ bs
IE-245	ME	0.14 ± 0.020 ^b
	RS	0.10 ± 0.020 ^{ab}
	BC	0.14 ± 0.020 ^b
IE-256	ME	0.06 ± 0.020 ^a
	RS	0.08 ± 0.020 ^{ab}
	BC	0.11 ± 0.020 ^{ab}

Los valores son promedio (± error estándar) de cuatro repeticiones, valores en una columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

8.3.4 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante evaluada en los carpóforos de shiitake varió entre las cepas, sustratos y sus interacciones (Cuadro 1A).

La actividad antioxidante en los carpóforos de shiitake fue mayor en los tratamientos con la cepa IE-256 (Figura 13, Cuadro 13), valores similares de 0.28 a 2.93 $\mu\text{M Trolox g}^{-1}$ bs fueron reportados por Wang y Xu (2014) en carpóforos obtenidos de una granja local en China. Independientemente de la cepa, los hongos con mayor actividad antioxidante se cosecharon de ME (Cuadro 14).

Sacchetti *et al.* (2008) indicaron que la actividad antioxidante está en función de la concentración y tipo de compuestos presentes y su contribución individual varía ampliamente. La correlación entre actividad antioxidante y polifenoles fue alta ($r= 0.72$), mientras que con el ácido ascórbico y flavonoides fue baja ($r= 0.24$ y 0.15, respectivamente).

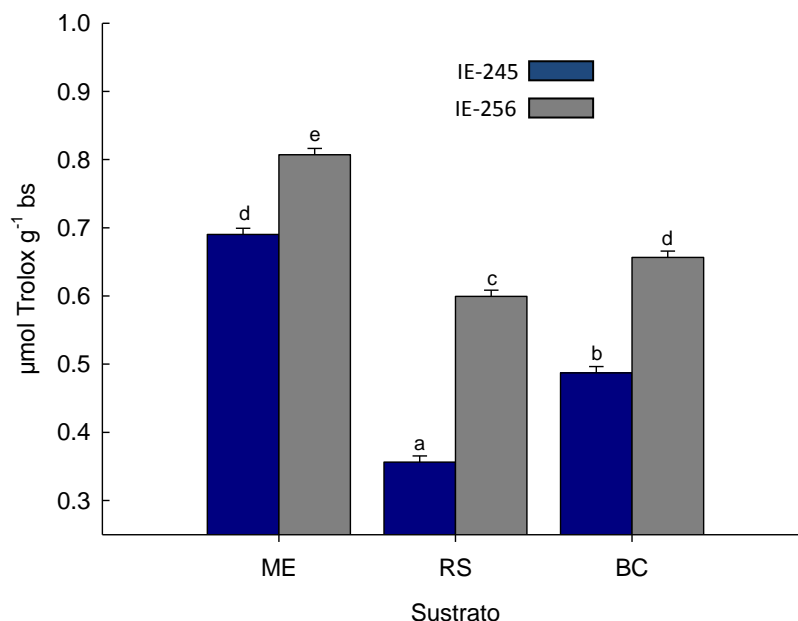


Figura 13. Actividad antioxidante en carpóforos de dos cepas de *L. edodes* cultivadas en los sustratos evaluados. Las barras representan el promedio \pm error estándar de cuatro repeticiones. Barras con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El uso de rastrojo de sorgo como sustrato es una alternativa que presenta ventajas en comparación con la madera de encino en cuanto a la eficiencia biológica, tasa de producción, rendimiento, producción de hongos obtenidos y tiempos cortos de PP.
- El uso de viruta de madera de encino como sustrato en el cultivo de shiitake presentó los valores de mayor concentración de polifenoles y actividad antioxidante en los carpóforos obtenidos.
- La cepa IE-256 presentó valores más altos de eficiencia biológica y rendimiento en comparación con IE-245.
- La actividad antioxidante mostró la mayor correlación con el contenido de compuestos fenólicos en comparación con los flavonoides y ácido ascórbico, siendo la cepa IE-256 la que produjo carpóforos con valores mayores de este parámetro.
- El tipo de sustrato y la cepa así como también la interacción cepa x sustrato influyeron en el contenido de compuestos con actividad antioxidante de los carpóforos de shiitake, así como también en sus características fisicoquímicas.
- Se propone un sustrato para cultivo de shiitake que incluya una mezcla de rastrojo de sorgo y viruta de madera de encino.
- Para futuros trabajos en donde se utilicen las mismas cepas y los mismos sustratos se recomienda el análisis de compuestos específicos de interés funcional como ácidos fenólicos, Lentinan y Eritadenina.

10. BIBLIOGRAFÍA

- AOAC, 1999.** Association of official agricultural chemists. Official methods of analysis. 16th ed. Association of analytical chemists. Washington. D. C. 1141 p.
- Aquino-Bolaños E., Urrutia-Hernández T., López del Castillo-Lozano M., Chavéz-Servia J., Verdalet-Guzmán I. 2013.** Physicochemical parameters and antioxidant compounds in edible squash (*Cucurbita pepo*) flower stored under controlled atmospheres. *Journal of Food Quality* 36: 302-308.
- Ashrafuzzaman M., Kamruzzaman A., Ismail M., Shahidullah S., Fakir S. 2009.** Substrate affects growth and yield of shiitake mushroom. *African Journal of Biotechnology* 13: 2999-3006.
- Balbi M., Fabeni F., Lazinski L., Melo A., Souza H. 2013.** Análise nutricional e perfil aminoacídico de cogumelos shiitake (*Lentinula edodes*, Agaricaceae). *Visão Acadêmica Curitiba* 14: 49-60.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D., Morais, J., Ferreira, I. 2007.** Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4781-4788.
- Barros L., Pereira C., Ferreria I. 2013.** Optimized analysis of organic acids in edible mushrooms from Portugal by ultra fast liquid chromatography and photodiode array detection. *Food Analytical Methods* 6: 309-316.

- Barros L., Venturini B., Baptista P., Estevinho L., Ferreira I. 2008.** Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: a comprehensive study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 3856-3862.
- Boa E. 2005.** Los hongos silvestres comestibles. Perspectiva global de su uso e importancia para la población. Food and Agricultural Organization of the United Nations 17.
- Brand-Williams W., Cuvelier M., Berset C. 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 28: 25-30.
- Branen A. 1975.** Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hidroxyl toluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 52: 59-63.
- Bravo L. 1998.** "Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance". *Nutrition Reviews* 56: 317-333.
- Caglarirmak N. 2007.** The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus species*) and an estimated approach to the volatile compounds *Food Chemistry* 105: 1188-1194.
- Chang R. 1996.** Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition Reviews* 54: 91-93.
- Chang S. 2012.** Mushroom science XVII. Proceeding of the 18th Congress of the International Society for Mushroom Science. China Agriculture Press. Beijing, 1 p.

- Chang S., Hayes W. 1978.** The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic press. Nueva York, San Francisco London.
- Chang S., Miles P. 2004.** Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. CRC press. Boca Ratón Florida, pp. 50-389.
- Chen A. 2005.** Shiitake bag cultivation. En: Mushroom Growers Handbook. Chang S. T.; T.H. Quimio (eds). Impreso en Korea, pp. 88.90.
- Chen W., Li W., Yang Y., Yu H., Zhou S., Feng J., Li X., Liu Y. 2015.** Analysis and evaluation of tasty components in the pileus and stipe of *Lentinula edodes* at different growth stages. Journal of Agricultural and Food Chemistry 63: 795-801.
- Cheung C. K. 2008.** Mushrooms as functional foods. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, New Jersey.
- Choi Y., Lee S., Chun J. 2006.** Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. Food chemistry 381-387.
- Cortés M., Ruíz M., Henríquez L. 2011.** Influences of the packing and packed about physiochemical properties of edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. Revista MVZ Cordoba 6: 2-8.
- De León R., Lau D., Vallejo R., Klee C. 2012.** Requerimientos fisiológicos que inciden en el crecimiento micelial y la degradación del sustrato por *Agrocybe Aegerita*. In: J. E. Sánchez, G. Mata (Eds.) ECOSUR. Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: investigación y desarrollo en un entorno multicultural. Tapachula, Chiapas. pp. 241-254.

- Dewick P. 2002.** Medicinal natural products: A biosynthetic approach. John Wiley y Sons, Ltd.
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., Smith F. 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28: 350-356.
- Dubost N., Ou B., Beelman R. 2007.** Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. Food Chemistry 105: 727-735.
- Elmastas M., Isildak O., Turkekul I., Temur N. 2007.** Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. Journal of Food Composition and Analysis 20: 337-345.
- Gaitán-Hernández R. 2001.** Use of Brown-rot fungus degraded substrate for the cultivation of *Lentinula spp* and *Pleurotus spp*. Mushroom Research 10: 13-21.
- Gaitán-Hernández R., Cortés N., Mata G. 2014.** Improvement of yield of the edible and medicinal mushroom *Lentinula edodes* on wheat straw by use of supplemented spawn. Brazilian Journal of Microbiology 45: 467-474.
- Gaitán-Hernández R., Esqueda M., Gutiérrez A., Beltrán M. 2011.** Quantitative changes in the biochemical composition of lignocellulosic residues during the vegetative growth of *Lentinula edodes*. Brazilian Journal of Microbiology 42: 30-40.
- Gaitán-Hernández R., Esqueda M., Gutiérrez A., Sánchez A., Beltrán-García M., Mata G. 2006a.** Bioconversion of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potential of viticulture residues. Applied Microbiology and Biotechnology 71: 432-439.

- Gaitán-Hernández R., Salmones D., Pérez R., Mata G. 2006b.** Manual práctico del cultivo de setas: asilamiento, siembre y producción. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Ver., México, 56 p.
- Guillamón E., García-Lafuente A., Lozano M., D'Arrigo M., Rostagno M., Villares A., Martínez J. 2010.** Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia* 81: 715-723.
- Gold M., Cernusca M., Godsey L. 2008.** A competitive market analysis of the United States shiitake mushroom marketplace. *Hort Technology* 18: 3-5.
- Gomes-da-Costa S., Cimbra L., Schunck E. 2008.** Crescimento micelial de dois isolados de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, em resíduos lignocelulosicos. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 30: 192-196.
- Guzmán G., 2008a.** Diversity and use of traditional Mexican medicinal fungi. A review. *International Journal of medicinal Mushrooms* 10: 209-217.
- Guzmán G., 2008b.** Hallucinogenic mushrooms in Mexico: an overview. *Economic botany* 62: 402-412.
- Guzmán G., Mata G., Salmones D., Soto-Velasco C., Guzmán-Dávalos L. 1993.** El cultivo de hongos comestibles con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales. Instituto Politécnico Nacional. Impreso en México. pp. 1-130 y 152-153.
- Hassing A., Liang W., Schwabl H., Stampfli K. 1999.** Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Medical Hypotheses* 52: 479-481.

- Hearst R., Nelson D., McCollum G., Millar B., Maeda Y. 2009.** An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 15: 5-7.
- Jiang T., Feng L., Li J. 2012.** Changes in microbial and postharvest quality of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) treated with chitosan-glucose complex coating under cold storage. *Food Chemistry* 131: 780-786.
- Jiang T., Muzamil M., Jiang Z., Ying T. 2010.** Influence of UV-C treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and texture of postharvest shiitake (*Lentinus edodes*) mushrooms during storage. *Postharvest Biology and Technology* 56: 209-215.
- Jing-jun Y., Jian-rong L., Xian-xiang H., Lei Z., Tian-jia J., Miao X. 2012.** Effects of active modified atmosphere packaging on postharvest quality of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) stored at cold storage. *Journal of Integrative Agriculture* 11: 474-482.
- Kader A., Saltveit M. 2003.** Respiration and gas exchange. *Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables*. Bartz J. A., and Brecht J. K. CRC Press. Nueva York. pp. 18-29.
- Kalac P. 2009.** Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry* 9-16.
- Kalac P. 2013.** A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 209-218.

- Kang M., Rico C., Lee S. 2012.** In vitro antioxidative and antimutagenic activities of oak mushroom (*Lentinula edodes*) and king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) byproducts. *Food Science Biotechnology* 21: 167-173.
- Kapritchkoff F., Viotti A., Alli R., Zuccolo M., Pradella J., Maiorano A., Miranda E., Bonomi A. 2006.** Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *Journal Biotechnology* 122: 453-462.
- Kilpatrick M., Murray D., Ward F. 2000.** Influence of substrate formulation and autoclave treatment on *Lentinula edodes* production. *Mushroom Science* 15: 803-810.
- Kim M., Seguin P., Ahn J., Kim L., Chun S., Kim E., Seo S., Kang E., Kim S., Park Y., Ro H., Chung I. 2008.** Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 7265-7270.
- Kirk T., Farrell R. 1987.** Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Annual Review Microbiology* 41: 465-505.
- Kitzberger C., Smania A., Pedrosa R., Ferreira S. 2007.** Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering* 80: 631-638.
- Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek L., Ziegenhagen D., Wojtas-Wasilewska M., Cho N., Hofrichter M., Rogalski J. 1999.** Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27: 175-185.

- Li G., Chang S. 1985.** Determination of vitamin C (ascorbic acid) in some edible mushrooms by differential pulse polarography. *Mushroom Newsletter for the Tropics* 5: 11-16.
- Lin F. Yang X., Wang Z. 2000.** Cultivation of the black oak mushroom *Lentinula edodes* in China. *Mushroom Science* 15: 955-958.
- Lull C., Wichers H., Savelkoul H. 2005.** Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation* 63-80.
- Mann J. 1987.** Secondary metabolism. Oxford University Clarendon Press. Nueva York.
- Martínez-Carrera D., López-Martínez de Alva L. 2010.** Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México II: éxitos y fracasos durante el período 1991-2009. *In: Martínez-Carrera D, Curvetto N, Sobal M, Morales P, Mora, VM (eds), Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. pp. 513-551.*
- Martínez-Carrera D., Morales P., Sobal M., Bonilla M., Martínez W., Mayett Y. 2012.** Los hongos comestibles, funcionales y medicinales: su contribución al desarrollo de las cadenas agroalimentarias y la seguridad alimentaria en México. *In: Memorias Reunión General de la Academia Mexicana de Ciencias: Ciencia y Humanismo (Agrociencias). Academia Mexicana de Ciencias, México, D.F. 750 pp.*

Martínez-Carrera D., Morales P., Sobal M., Curvetto N. 2010. Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. 648 p.

Martínez-Flores H., Maya-Cortés D., Figueroa-Cárdenas J., Garnica-Romo M., Ponce-Saavedra J. 2009. Chemical composition and physicochemical properties of shiitake mushroom and high fiber products. *Journal of Food* 7: 7-14.

Martínez-Valverde I., Periago M., Ros G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 50: 5-18.

Mata G., Valdez K., Mendoza R., Trigos A. 2014. HS/GC-MS Analyzed chemical composition of the aroma of fruiting bodies of two species of genus *Lentinus* (higher basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 16: 477-484.

Mattila P., Konko K., Eurola M., Pihlava J., Astola J., Vahteristo L., Hietaniemi V., Kumpulainen J., Valtonen M., Piironen V. 2001. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2343-2348.

McGuire R. G. 1992. Reporting of objective color measurements. *Hort Science*, 27: 1254-1255.

Miller D. 2001. Química de alimentos, Manual de laboratorio. Ed. Limusa. México D.F. Cap. 8, pp. 88-89.

- Montoya-López J., Giraldo-Giraldo G. & Lucas-Aguirre J. 2012.** Determinación del índice de blancura en harina de trigo comercial. *Vitae*, Enero-Abril, S415-S416.
- Montoya S., Sánchez O., Levin L. 2014.** Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa en diez hongos de pudrición blanca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 12: 115-124.
- Morais M., Ramos A., Matos N., Santos-Oliveira E. 2000.** Production of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) on lignocellulosic residues. *Food Science and Technology International* 6: 123-128.
- Mujic I., Zekovic Z., Lepojevic Z., Vidovic S., Zivkovic J. 2010.** Antioxidant properties of selected edible mushroom species. *Journal Central European Agriculture* 11: 387-392.
- MushWorld. 2005.** Mushroom Grower's Handbook 2: Shiitake cultivation. Seoul, Korea. 350 p.
- Parameswaran B. 2009.** Sugarcane babasse. Chapter 12. *In: Singh nee'Nigam, P., Pandey editors. Biotechnology for agro-industrial residues.* Springer.
- Pegler D. 1983.** The genus *Lentinula* (Tricholomataceae tribe collybiaeae). *Sydwia* 36: 227-239.

Peralta Márquez H., Frutis Molina I. 2010. Cultivo de *Lentinula edodes* utilizando paja de trigo pasteurizada y suplementada. *In:* Martínez Carrera D, Curvetto N, Sobal M, Morales P, Mora VM (eds). Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XXI. Red Latinoamericana de hongos comestibles y medicinales: producción, desarrollo y consumo. COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. pp. 169-174.

Philippoussis A. 2009. Production of mushrooms using agro-industrial residues as substrates. chapter 9. *In:* Singh nee'Nigam, P., Pandey editors. Biotechnology for agro-industrial residues. Springer.

Philippoussis A., Diamantopoulou P., Israilides C. 2007. Productivity of agricultural residues used for the cultivation of the medicinal fungus *Lentinula edodes*. International Biodeterioration & Biodegradation 59: 216-219.

Philippoussis P., Papadopoulou K., Lakhtar H., Roussos S., Parissopoulos G., Papanikolaou S. 2011. Biomass, laccase and endoglucanase production by *Lentinula edodes* during solid state fermentation of reed grass, bean stalks and wheat straw residues. World Journal of Microbiology and Biotechnology 27: 285-297.

Przybylowicz P., Donoghue J. 1990. Shiitake Growers Handbook. The Art and Science of Mushroom Cultivation. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque.

Quintana M., Calderón J. 2009. La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. Revista de Educación Bioquímica 28: 89-101.

Reyes-Muro L., Camacho-Villa T., Guevara-Hernández F. 2013. Rastrojos: manejo, uso y mercado en el centro y sur de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Libro Técnico Num. 7. Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, México. 1-242 p.

Ribeiro B., Lopes R., Andrade P., Seabra R., Goncalves R., Baptista P., Quelhas I., Valentao P. 2008. Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. *Food Chemistry* 110: 47-56.

Royse D. 1985. Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of shiitake mushroom. *Mycologia* 77: 756-762.

Royse D. 1996. Yield stimulation of shiitake by millet supplementation of wood chip substrate. *In: Royse DJ (ed) Mushroom Biology and Mushroom Products.* Penn State University Press, Pennsylvania 277-283 pp.

Royse D. 2014. A global perspective on the high five: *Agaricus, Pleorotus, Lentinula, Auricularia & Flammulina*. Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8).

Salmones D., Mata G., Ramos L., Waliszewski K. 1999. Cultivation of shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, in several lignocellulosic materials originating from the subtropics. *Agronomy* 19: 13-19.

Sacchetti G., Cocci E., Pinnavaia G., Mastrocola D., Rosa M. 2008. Influence of processing and storage on the antioxidant activity of apple derivatives. *International Journal of Food Science & Technology.* 43: 797-804.

- Sierra P. 1997.** Caracterización tecnológica de la industria productora de hongos comestibles en México (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México. pp. 5-35.
- Singleton V., Rossi J. 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybde-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
- Singer R., Harris B. 1987.** *Mushrooms and truffles: botany, cultivation and utilization.* 2nd Ed. Koeltz Science Books, Koenigstein. pp. 30-98.
- Sobal M., Morales P., Bonilla M., Martínez W., Galván F., Sihuacan D., Quiriz F., Juárez M., Martínez-Carrera D. 2010.** Formulaciones para la producción intensiva de *Lentinula edodes* y *L. boryana* en México. *In:* Martínez Carrera D, Curvetto N, Sobal M, Morales P, Mora VM (eds) *Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XXI.* Red Latinoamericana de hongos comestibles y medicinales: producción, desarrollo y consumo. COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla. pp. 175-187.
- Soto M. 2007.** Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*lippiagraveolens* hbk var. *Berlandier iSchafer*). *Fitotecnia Mexicana* 30: 43-49.
- Stamets P. 2000.** *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms.* Ten Speed Press. Berkeley Toronto.
- Tsao R. 2010.** Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2: 1231-1246.

- Turlo J., B. Gutkowska M. Klimaszewska C. Kapusta K. Schneider M. Sikora M. Cieslak J. Kazmierczak-Baranska A. Gorski S. Purchla A. Golas 2011.** Selenium-enriched polysaccharide fraction isolated from mycelial culture of *Lentinula edodes* (Berk.)-preliminary analysis of the structure and biological activity. Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7) pp. 247-251.
- Valverde M., Hernández-Pérez T., Paredes-López O. 2015.** Edible mushrooms: Improving human health and promoting quality life. International Journal of Microbiology 2015: 1-14.
- Velioglu Y., Mazza G., Gao L., Oomah B. 1998.** Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 4113-4117.
- Vitrac X., Reignier A., Henry-Vitrac C., Minvielle N., Merillon J., Savoie J. 2011.** Changes in antioxidant activities and compounds during cultivation of shiitake (*Lentinula edodes*). Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7). Polyphénols Biotech.
- Waithaka K., Dodge L., Reid M. 2001.** Carbohydrate traffic during opening of gladiolus florets. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 76: 120-124.
- Wang Y., Xu B. 2014.** Distribution of Antioxidant Activities and Total Phenolic Contents in Acetone, Ethanol, Water and Hot Water Extracts from 20 Edible Mushrooms via Sequential Extraction. Austin Journal Nutrition Food Sciences 2: 1-5.

- Wasser S. 2005.** Shiitake (*Lentinus edodes*). En: Coates, P.M., Blackman, M.R., Cragg G.M., Levine, M., Moss, J., White, J.D. (eds). Encyclopedia of Dietary Supplements. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. pp. 653-664.
- Yang J., Lin H., Mau J. 2002.** Antioxidant properties of several commercial mushrooms. Food Chemistry 77: 229-235.
- Yildiz O., Can, Z. Laghari A., Sahin H., Malkoc M. 2015.** Wild edible mushrooms as natural source of phenolics and antioxidants. Journal of Food Biochemistry 39: 148-154.
- Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. 1999.** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry 64: 555-559.
- Zhu F., Du B., Bian Z., Xu B. 2015.** β -Glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics physicochemical and biological activities. Journal of Food Composition and Analysis 41: 165-173.
- Zweigle C. 2010.** Pistachio byproducts as substrate for shiitake mushroom. Master thesis, Jordan College of Agricultural Sciences and technology, California State University, Fresno.

11. APÉNDICE

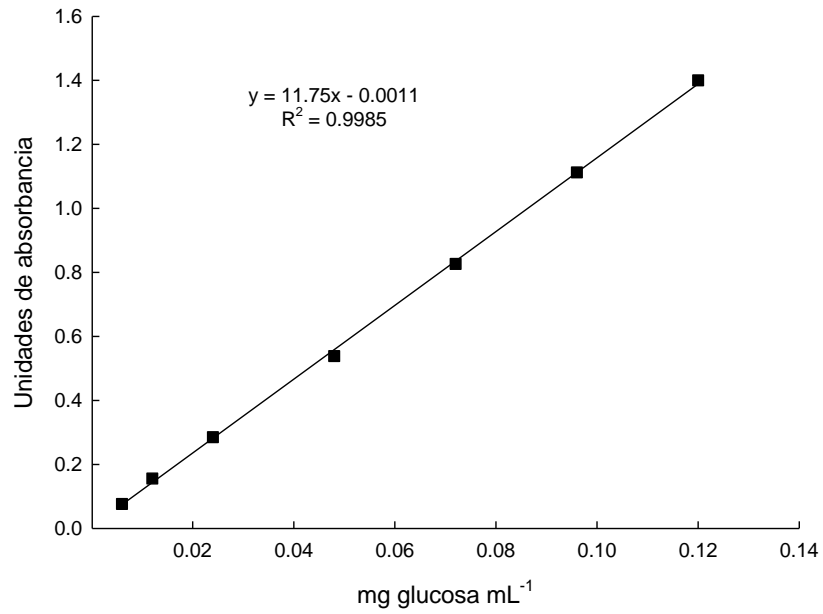


Figura A1. Curva estándar para la cuantificación de azúcares totales por el método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956).

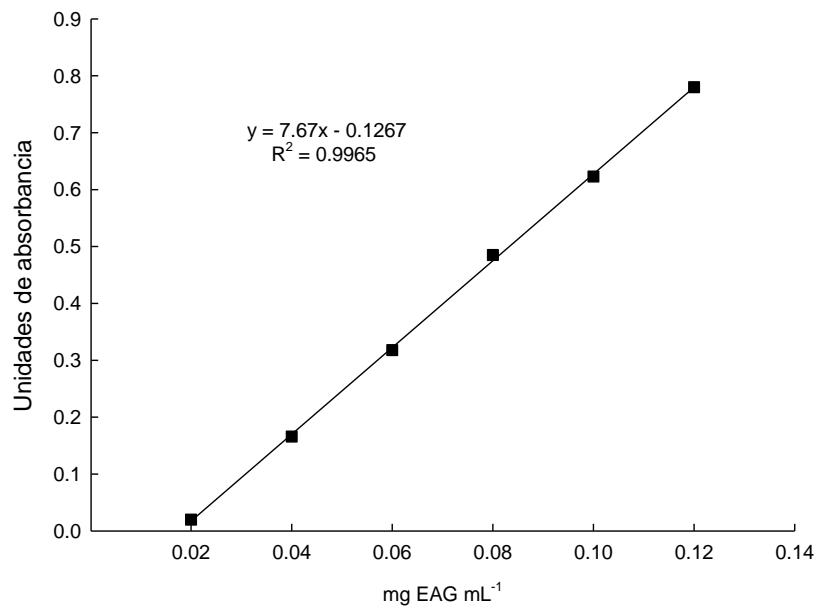


Figura A2. Curva estándar para la cuantificación de polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965).

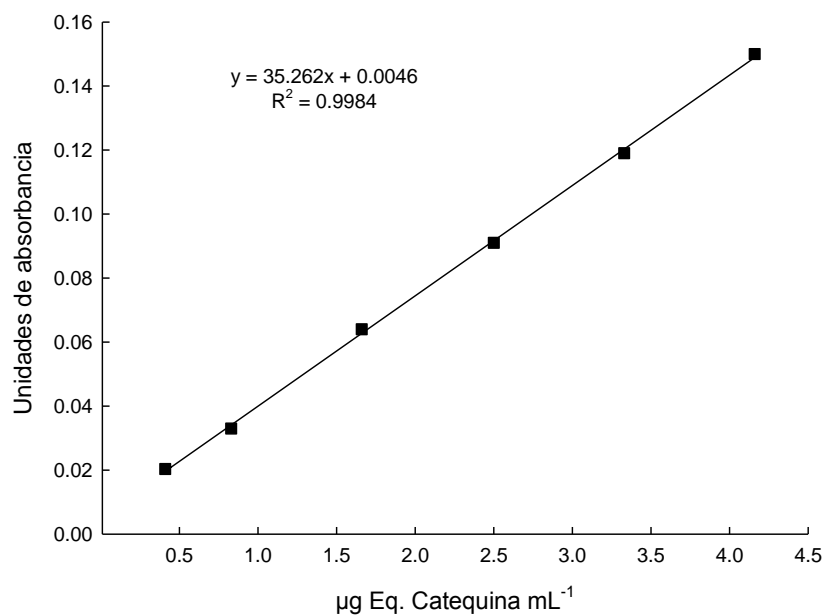


Figura A3. Curva estándar para la cuantificación de flavonoides por el método de $AlCl_3$ (Zhishen *et al.*, 1999).

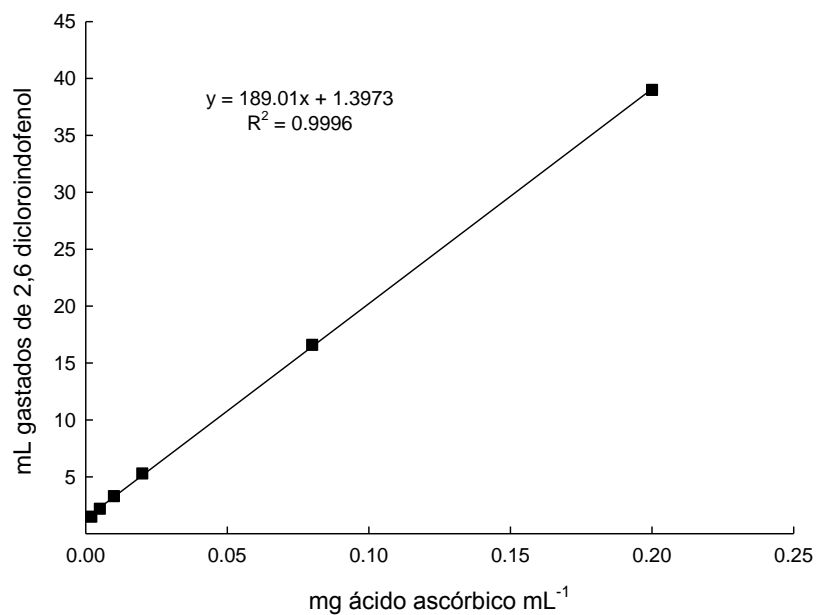


Figura A4. Curva estándar para la cuantificación de ácido ascórbico por el método de titulación con DPIP (Miller, 2001).

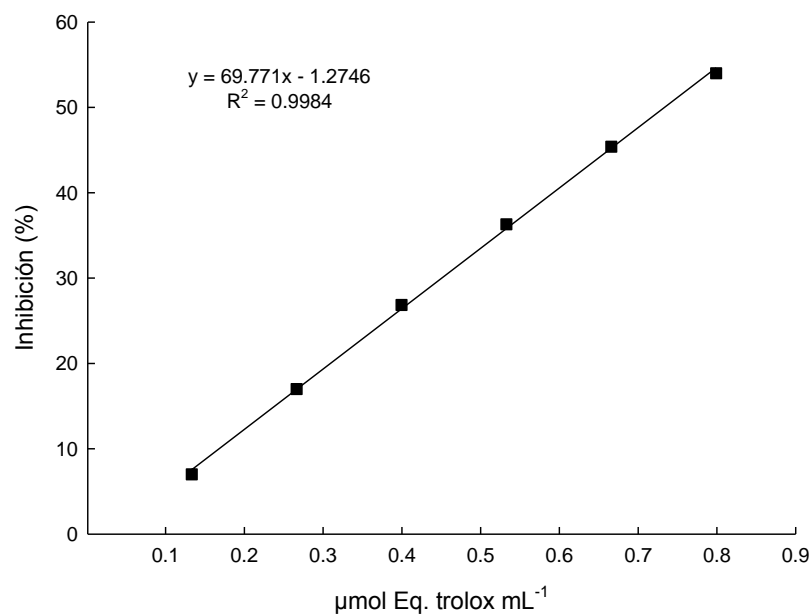


Figura A5. Curva estándar para la determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Cuadro 1A. Valores de F, p de los factores cepa, sustrato y su interacción para los parámetros de productividad, fisicoquímicos y compuestos con actividad antioxidante en carpóforos de *L. edodes*.

Parámetro	Cepa		Sustrato		Cepa x sustrato	
	F	p	F	p	F	p
Peso total	0.0940	0.76202	10.5378	0.00001*	4.4811	0.02330*
EB	5.9742	0.02391*	28.1980	0.00001*	4.2519	0.02893*
TP	0.4878	0.4929	31.4510	0.0001*	7.6077	0.00340*
R	4.5352	0.04581*	16.1392	0.00001*	3.2809	0.0586
Azúcares	111.31	0.00001*	879.89	0.00001*	244.64	0.00001*
pH	13.7	0.00162*	19.1	0.00004*	25.5	0.00001*
Acidez titulable	729.06	0.00001*	22.89	0.00001*	59.46	0.00001*
SST	1.247	0.27882	50.907	0.00001*	1.052	0.36981
Humedad	77.1	0.00001*	54.0	0.00001*	3.200	0.06683
L*	2.050	0.16930	11.392	0.00063*	11.305	0.00066*
h°	10.849	0.00039*	18.195	0.00004*	9.431	0.00157*
PT	1469.31	0.00001*	697.31	0.00001*	267.56	0.00001*
Flavonoides	35.27	0.00001*	814.38	0.00001*	900.60	0.00001*
Act. antiox.	550.73	0.00001*	445.44	0.00001*	23.65	0.00001*
Ac. ascórbico	12.5099	0.00235*	2.6064	0.10137	1.8012	0.19360

* significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

Cuadro 2A. Contenido total de azúcares en carpóforos de dos cepas de *L. edodes* cultivadas en tres sustratos.

Cepa	Sustrato	mg glucosa g ⁻¹ bs
IE-245	ME	8.59 ± 0.19 ^b
	RS	12.65 ± 0.19 ^c
	BC	9.21 ± 0.19 ^b
IE-256	ME	5.41 ± 0.19 ^a
	RS	17.61 ± 0.19 ^d
	BC	12.44 ± 0.19 ^c

Los valores son promedio (± error estándar) de cuatro repeticiones, valores en una columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

Cuadro 3A. Contenido de Sólidos solubles totales en carpóforos de dos cepas de *L. edodes* cultivadas en tres sustratos.

Cepa	Sustrato	° Brix
IE-245	ME	4.93 ± 0.23 ^a
	RS	5.03 ± 0.23 ^a
	BC	6.84 ± 0.23 ^b
IE-256	ME	5.21 ± 0.23 ^a
	RS	4.87 ± 0.23 ^a
	BC	7.37 ± 0.23 ^b

Los valores son promedio (± error estándar) de cuatro repeticiones, valores en una columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

Cuadro 4A. Contenido de ácido málico en carpóforos de dos cepas de *L. edodes* cultivadas en tres sustratos.

Cepa	Sustrato	g ác. málico g ⁻¹ bs
IE-245	ME	0.017 ± 0.0003 ^b
	RS	0.017 ± 0.0003 ^b
	BC	0.015 ± 0.0003 ^a
IE-256	ME	0.021 ± 0.0003 ^c
	RS	0.026 ± 0.0003 ^d
	BC	0.027 ± 0.0003 ^d

Los valores son promedio (± error estándar) de cuatro repeticiones, valores en una columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

Cuadro 5A. % de humedad en carpóforos de dos cepas de *L. edodes* cultivadas en tres sustratos.

Cepa	Sustrato	Humedad (%)
IE-245	ME	91.17 ± 0.29 ^b
	RS	91.70 ± 0.29 ^{bc}
	BC	88.35 ± 0.29 ^a
IE-256	ME	92.55 ± 0.29 ^{cd}
	RS	93.80 ± 0.29 ^d
	BC	91.20 ± 0.29 ^b

Los valores son promedio (± error estándar) de cuatro repeticiones, valores en una columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

Cuadro 6A. Contenido de polifenoles en carpóforos de dos cepas de *L. edodes* cultivadas en tres sustratos.

Cepa	Sustrato	mg EAG g ⁻¹ bs
IE-245	ME	4.70 ± 0.04 ^c
	RS	3.78 ± 0.04 ^a
	BC	3.87 ± 0.04 ^a
IE-256	ME	6.50 ± 0.04 ^e
	RS	5.85 ± 0.04 ^d
	BC	4.08 ± 0.04 ^b

Los valores son promedio (± error estándar) de cuatro repeticiones, valores en una columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

Cuadro 7A. Contenido de Flavonoides en carpóforos de dos cepas de *L. edodes* cultivadas en tres sustratos.

Cepa	Sustrato	mg Catequina g ⁻¹ bs
IE-245	ME	0.074 ± 0.0009 ^d
	RS	0.056 ± 0.0009 ^c
	BC	0.043 ± 0.0009 ^b
IE-256	ME	0.033 ± 0.0009 ^a
	RS	0.096 ± 0.0009 ^e
	BC	0.031 ± 0.0009 ^a

Los valores son promedio (± error estándar) de cuatro repeticiones, valores en una columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).

Cuadro 8A. Actividad antioxidante en carpóforos de dos cepas de *L. edodes* cultivadas en tres sustratos.

Cepa	Sustrato	μmol Eq. trolox g ⁻¹ bs
IE-245	ME	0.69 ± 0.009 ^d
	RS	0.35 ± 0.009 ^a
	BC	0.48 ± 0.009 ^b
IE-256	ME	0.80 ± 0.009 ^e
	RS	0.59 ± 0.009 ^c
	BC	0.65 ± 0.009 ^d

Los valores son promedio (± error estándar) de cuatro repeticiones, valores en una columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Tukey).