

**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**“Potenciación de Biomasa y Lentinan en Cultivo
Sumergido de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler:
Aplicación de Extractos Promotores”**

POR:

DAMIAN LÓPEZ PEÑA

TESIS APROBADA POR LA

**COORDINACION DE TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS

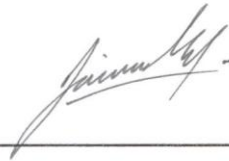
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de **Damian López Peña**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dr. Martín Esqueda Valle

Director de Tesis



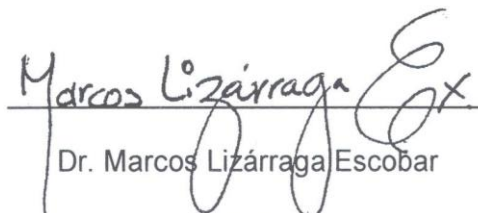
Dr. Jaime Lizardi Mendoza

Asesor



Dr. Agustín Rascón Chu

Asesor



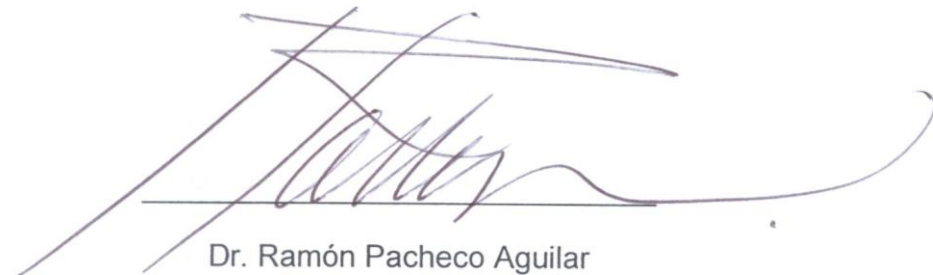
Dr. Marcos Lizárraga Escobar

Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

A handwritten signature in dark ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right. The signature is positioned above a horizontal line.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los mexicanos que pagan sus impuestos, y a CONACYT, que administra una parte de esos impuestos para invertirlos en educación. Porque un país con educación es un país competitivo.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., por recibirme como estudiante en el programa de maestría en ciencias.

Gracias al Dr. Martin Esqueda Valle por aceptarme en su equipo de trabajo y por tenerme la confianza para dejar en mis manos este proyecto. De igual manera agradezco al Dr. Jaime Lizardi Mendoza, por apoyarme tanto con todo lo referente a lentinan y por tenerme la confianza para pasar días enteros en el laboratorio de biopolímeros. Gracias al Dr. Agustín Rascón Chu, por apoyarme y ayudarme siempre que lo necesité gracias por sus consejos, siempre con puertas abiertas. Gracias al Dr. Marcos Lizárraga Escobar, por su apoyo incondicional, por aceptar ser parte de esto, por sus recomendaciones y por ser un buen amigo.

Quiero expresar un agradecimiento muy especial a la M.C. Karla Guadalupe Martínez Robinson por todo su apoyo técnico y experiencia, con el análisis proximal, extracción y caracterización de lentinan. Además por la confianza que me tuvo y por siempre darme un espacio en el laboratorio, ¡muchas gracias Karla!

A los técnicos de mi laboratorio, el lab. de biotecnología de hongos. Gracias a la Biol. Georgina Vargas Rosales por el apoyo técnico brindado en el laboratorio. Con el mismo tono, un sincero agradecimiento al M.C. Aldo Hiram Gutiérrez Saldaña por todo el apoyo técnico durante todo el proceso de fermentación, también por sus consejos. ¡Gracias Geo y Aldo por su amistad y por los buenos momentos que se viven en este laboratorio!.

Un sincero agradecimiento al M.C. Luis Enrique González Siqueiros y a la Q.B. Rosa Amparo Nieblas Almada por el apoyo técnico brindado con los molinos y consultas. De igual forma quiero agradecer a la Dra. Ana María Calderón de la Barca por la amabilidad para conmigo, y al Q.B. René Valenzuela Miranda por el apoyo técnico brindado en las determinaciones de nitrógeno. Gracias al M.C. Alberto Sánchez Estrada por el apoyo técnico brindado.

Un sincero agradecimiento al Dr. Ali Asaff Torres y a la la Dra. Yolanda Reyes Vidal por su apoyo con el agitador orbital. Expreso también un especial agradecimiento a la M.C. Rosina Cabrera Ruiz por su apoyo con los análisis de cinéticas de crecimiento, y por todos sus consejos, ¡muchas gracias Rosina!. También quiero externar un sincero agradecimiento a la Dra. Mayra de la Torre por el apoyo brindado con las cinéticas de crecimiento y modelos de crecimiento poblacional. Del mismo modo un agradecimiento a la Dra. Evelia Acedo Félix por su apoyo, disposición y ayuda con el agitador orbital.

Un agradecimiento al Dr. Gustavo González Aguilar por su apoyo en la parte de caracterización de extractos de madera de vid, igualmente a la Q.B. Mónica Alejandra Villegas Ochoa por el apoyo técnico brindado. También un agradecimiento a la M.C. Armida Rodríguez Félix por sus consejos y su disponibilidad. Al Dr. Miguel Beltrán.

Muchas gracias a todo el grupo de biopolímeros, por adoptarme en el laboratorio y por sus consejos, bromas y buenos momentos. A la Dra. Elizabeth Carvajal Millan, Dra. Yolanda López Franco, Dr. Jaime Lizardi Mendoza, Q.B. Alma Consuelo Campa Mada, M.C. Alma Rosa Toledo, M.C. Karla Martínez Robinson y a todos los muchachos, Neydeli,, Gonzalo, Fernanda, Jorge, Ana Luisa y Adriana.

Un especial agradecimiento a todos los compañeros y amigos: Alberto, Beto, Gonzalo, Fernanda, Eduardo, Alfonso, Cynthia, Rafa, Geo, Aldo, Toño y Javier.

A Camelia, por todo su apoyo y comprensión, por el tiempo, los colores, las letras, los ojos, las risas, las cosas, las calmas, enojos... por todo...

A mi familia, Jorge, Margarita, Juanita, Fernando, Elisa, Samuel, Karina, Beto, Eric, Guerra, Ricardo, Javier... por todo...

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con mucho cariño a mis dos grandes mentores en la etapa de mi formación como biólogo. Al Dr. Marcos Lizárraga Escobar y a la Dra. Helvia R. Pelayo Benavides por el apoyo incondicional que me brindaron, también por su amistad y por compartir conmigo toda esa experiencia. Porque sin su apoyo no estaría donde hoy me encuentro.

Con el mismo sentimiento dedico este trabajo de investigación a mi familia (Ana Margarita Peña Juárez y Jorge López Peña) por todo su apoyo y amor; y a Dalton, mi gran compañero de vida.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
SUMMARY.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
<i>Lentinula edodes</i> “shiitake”.....	3
Taxonomía, distribución y hábitat.....	3
Nutrición, desarrollo y estructura.....	3
Propiedades nutrimentales y medicinales.....	7
Importancia económica.....	9
Cultivo de <i>Lentinula edodes</i> y otros hongos medicinales.....	10
Cultivo tradicional.....	10
Cultivo de <i>L. edodes</i> con formulaciones sintéticas.....	11
Utilización de sustratos alternativos para el cultivo de <i>L. edodes</i>	12
Cultivo sumergido de <i>L. edodes</i> y otras especies medicinales.....	13
Lentinan: un β -(1-3)-glucano de <i>L. edodes</i>	16
Extracción y aislamiento.....	17
Estructura química y conformación en solución.....	18
Bioactividad y modo de acción.....	19
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
Cepas, medios y condiciones de cultivo.....	21

Extractos de madera de vid	21
Obtención de los extractos	21
Caracterización de los extractos	22
Preparación de la muestra	22
Fenoles totales.....	22
Flavonoides totales	22
Potenciación de biomasa (evaluación de los extractos)	23
Selección de la cepa y medio de cultivo base	23
Determinación de la cinética de crecimiento	23
Obtención de lentinan.....	24
Composición proximal de biomasa y determinación de carbohidratos totales y nitrógeno en productos.....	25
Determinación de carbohidratos totales	25
Determinación de cenizas	25
Determinación de nitrógeno y proteína	25
Determinación de grasa cruda	26
Caracterización de lentinan	26
Análisis de composición de monómeros	26
Identificación de lentinan (FT-IR)	26
Diseños experimentales y análisis estadístico.....	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
Extractos de madera de vid	28
Rendimiento	28
Fenoles y flavonoides totales	28
Potenciación de biomasa (evaluando los extractos).....	29
Selección de la cepa y medio de cultivo base	31
Cinética de crecimiento	32
Composición proximal de biomasa.....	35
Color y morfología	36

Obtención y caracterización de lentinan	37
Rendimiento del extracto, carbohidratos totales y nitrógeno	37
Composición de monómeros.....	40
Rendimiento neto de lentinan.....	43
Identificación de lentinan (FT-IR)	44
CONCLUSIONES	46
PERSPECTIVAS	47
BIBLIOGRAFÍA CITADA	48
APÉNDICE.....	55
Apéndice 1. Preparación de medios de cultivo	55
Medio GP	55
Medio de Kirk 1	55
Medio de Kirk 2	55
Medio de Lomberh	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de un basidiomiceto..	5
Figura 2. Síntesis de β -(1-3)-glucanos.....	6
Figura 3. Estructura de lentinan.....	17
Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología para la obtención de lentinan propuesta por Yap y Ng (2001).	25
Figura 5. Cinética de crecimiento de <i>L. edodes</i> (Control).....	33
Figura 6. Cinética de crecimiento de <i>L. edodes</i> (T1).	33
Figura 7. Cinética de crecimiento de <i>L. edodes</i> (T2).	34
Figura 8. Morfología y color del micelio producido.....	37
Figura 9. Coloración del lentinan extraído.	39
Figura 10. Cromatogramas con composición de monosacáridos del lentinan extraído de Control, T1 y T2.....	42
Figura 11. Rendimiento neto de lentinan de Control, T1 y T2.....	43
Figura 12. Espectros de infrarrojo en modo de transmisión del lentinan extraído de Control, T1 y T2.	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividades de lentinan y modelo biológico utilizado.	19
Tabla 2. Contenido de fenoles y flavonoides totales en los extractos.....	29
Tabla 3. Efecto de los extractos de madera de vid sobre la producción de biomasa de <i>L. edodes</i>	31
Tabla 4. Interacción entre dos cepas de <i>L. edodes</i> y cuatro medios de cultivo base.	32
Tabla 5. Parámetros de la cinética de crecimiento de Control, T1 y T2.....	35
Tabla 6. Composición proximal de biomasa de tratamientos Control, T1 y T2.....	36
Tabla 7. Rendimiento, carbohidratos totales y nitrógeno de los productos..	39
Tabla 8. Composición de monómeros del lentinan extraído del Control, T1 y T2.....	40

RESUMEN

Distintos productos obtenidos de *Lentinula edodes* (shiitake) se utilizan como suplemento alimenticio, debido a los beneficios que ofrece hacia la salud. Entre los distintos compuestos aislados de shiitake destaca lentinan, un β -glucano con actividad inmunomoduladora. Trabajos previos indican que mediante la aplicación al medio de cultivo líquido con distintos extractos de madera de vid se aumenta la producción de biomasa en shiitake y una suplementación con un extracto fenólico incrementa la actividad de la β -glucano sintasa. El objetivo de este estudio fue evaluar la producción de biomasa y lentinan en un medio de cultivo base con la suplementación de extractos de madera de vid (acuoso, etanólico, clorofórmico y toluénico). Se evaluaron las cepas IE245 e IE105 de *L. edodes* y cuatro medios de cultivo base (glucosa-peptona, medio de Lomberh y dos modificaciones del medio de Kirk) para la producción de biomasa. La combinación con mayor producción (Lomberh-IE245) se eligió como control y base para formular dos tratamientos (T1: suplementación con los cuatro extractos y T2: suplementación con los extractos acuoso y etanólico). De estos tratamientos se determinaron los parámetros de una cinética de crecimiento, se caracterizó la biomasa, además se extrajo y caracterizó lentinan. Al final de la cinética de crecimiento no se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre los tratamientos. La máxima producción de biomasa predicha por el modelo logístico utilizado se observó en el T2 (16.57 g/L) y la mínima en el control (10.78 g/L). Las μ_M para el Control, T1 y T2 fueron de 0.052, 0.146 y 0.133 días⁻¹ respectivamente. Tanto en el rendimiento del extracto como en carbohidratos totales en el mismo no se observaron diferencias ($p>0.05$). Se encontraron diferencias en la cantidad de glucosa en los productos entre los tratamientos (T1 y T2) con respecto al control. Asimismo se observaron diferencias ($p<0.05$) en el rendimiento neto entre T2 (2.47%) y el Control (1.59%), lo cual puede ser indicador de una potenciación de la actividad de la β -glucano sintasa.

SUMMARY

Various products obtained from *Lentinula edodes* (shiitake) are used as food supplement because of the benefits to health. Among the various compounds isolated from shiitake lentinan is highlighted, a β -glucan with immunomodulatory activity. Previous studies indicate that by the application to the liquid culture medium with different grapevine wood extracts the biomass production is increased in shiitake and a phenolic extract supplementation increases the activity of β -glucan synthase. The aim of this study was to evaluate the biomass production and lentinan on a base culture medium with supplementation with vine wood extracts (aqueous, ethanol, chloroform and toluene). Strains IE105 and IE245 of *L. edodes* and four basic culture media (glucose-peptone medium Lomberh and two half Kirk modifications) were evaluated for the production of biomass. The combination with increased production (Lomberh-IE245) was chosen as control and basis for designing two treatments (T1: supplementation with the four extracts and T2: supplementation with aqueous and ethanol extracts). Of these treatments the kinetic parameters of growth were determined; biomass was characterized also lentinan was extracted and characterized. At the end of the kinetics of growth there were no significant differences ($p > 0.05$) between treatments. The maximum biomass production predicted by the logistic model used was observed in T2 (16.57 g / L) and the lowest in the control (10.78 g / L). The μ_M for the Control, T1 and T2 were 0,052, 0,146 and 0,133 days⁻¹ respectively. Both in the extract yield as total carbohydrates in the same there were no difference ($p > 0.05$). Differences were found in the amount of glucose in the products between treatments (T1 and T2) compared to control. Likewise, there were differences ($p < 0.05$) in net return between T2 (2.47%) and Control (1.59%), which may be an indicator of a potentiation of the activity of β -glucan synthase.

INTRODUCCIÓN

Lentinula edodes (Berk.) Pegler, popularmente conocido como “shiitake”, es un hongo de pudrición blanca, lo que indica su capacidad para degradar la celulosa, hemicelulosa y lignina. Es consumido por su buen sabor, gran valor nutrimental y propiedades medicinales (Stamets, 2000). Entre dichas propiedades destaca la actividad inmunomoduladora, la cual es atribuida principalmente al lentinan, un β -(1-3)-glucano de la pared celular (Wasser, 2005). Estos polisacáridos son sintetizados por la β -(1-3)-glucano sintasa, un complejo enzimático asociado a la membrana celular. En *L. edodes* este complejo es estimulado principalmente por estrés oxidativo extracelular. Además se ha observado que una suplementación con compuestos fenólicos al medio de cultivo incrementa la actividad de la β -(1-3)-glucano sintasa. Por lo que se cree que la generación de especies reactivas de oxígeno producto del rompimiento de anillos aromáticos es importante para la regulación de este complejo enzimático (Reverberi *et al.*, 2004).

Gracias a sus características nutrimentales y medicinales, *L. edodes* ocupa el segundo lugar entre los hongos más cultivados a nivel mundial, sólo después del champiñón y actualmente China es el principal productor (Chen, 2005). *L. edodes* se cultiva de forma tradicional sobre troncos de encino (*Quercus* spp.), no obstante la mayor parte de la producción actual se obtiene utilizando sustratos sintéticos formulados con base en viruta de encino suplementada. Estas técnicas de cultivo requieren 1 año y 4 meses respectivamente, para cumplir un ciclo de producción (Stamets, 2000). En las últimas décadas por la inaccesibilidad del encino en algunas áreas y el riesgo ecológico que representa su utilización, se han buscado sustratos alternativos que generen un rendimiento competente y un producto de alta calidad.

La madera derivada de la poda de la vid se ha utilizado para el cultivo de *L. edodes*, produciendo eficiencias biológicas altas en periodos cortos (de 44-98 días dependiendo la cepa utilizada) (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006).

Lo anterior es de suma importancia, ya que México es un gran productor de uva (SAGARPA, 2010) y esta actividad genera una alta cantidad de residuos lignocelulósicos al año, los cuales son quemados en el campo o escasamente utilizados. La producción de carpóforos en medio sólido es la técnica ms utilizada, no obstante hoy en día existe una nueva tendencia con respecto a la obtención de productos de origen fúngico.

Recientemente la técnica de cultivo sumergido de hongos medicinales ha tomado gran auge. Esta técnica permite dirigir los cultivos hacia la obtención de un producto particular, con resultados más homogéneos. Además en 21 días se puede producir una cantidad de biomasa suficiente para la extracción de algún compuesto (Papaspyridi *et al.*, 2010). En un estudio previo (Harris-Valle *et al.*, 2007), se ha cultivado *L. edodes* en fermentación líquida, suplementando el medio de cultivo con una combinación de cuatro extractos de distinta polaridad de madera de vid (acuoso, etanólico, clorofórmico y toluénico). Es importante señalar que extractos polares de madera de vid son ricos en compuestos fenólicos. Esta suplementación incrementa la producción de biomasa y la actividad de las principales enzimas ligninolíticas de *L. edodes*. Entre estas enzimas, la actividad de aril alcohol oxidasa y lacasa está asociada con la producción extracelular de especies reactivas de oxígeno. El presente estudio está dirigido hacia el incremento de biomasa de *L. edodes* en fermentación líquida y a la evaluación de lentinan, mediante la suplementación al medio de cultivo con distintas concentraciones y combinaciones de los extractos de madera de vid mencionados anteriormente.

ANTECEDENTES

Lentinula edodes “shiitake”

Es un basidiomiceto nativo del continente asiático, el cual debido a sus características es considerado una exquisitez y elixir de la vida en algunos países como Japón y China; ya que se ha consumido con propósitos nutrimentales y medicinales por más de dos milenios (Stamets, 2000). Shiitake es bajo en lípidos y contiene cantidades considerables de fibra y proteínas; además es conocido por su potencial para reducir los niveles de colesterol en la sangre y su actividad inmunomoduladora (Chang y Miles, 2004). Hoy en día existe una gran cantidad de productos a base de *L. edodes* en el mercado y gracias a su aceptación, la producción de este hongo ha aumentado.

Taxonomía, distribución y hábitat

Lentinula edodes es un basidiomiceto del orden Agaricales, el cual está incluido en la familia Marasmiaceae (www.indexfungorum.org). Es nativo del sureste de Asia y está registrado en Corea, Japón, China, Vietnam, Tailandia, Burma, Filipinas, Papúa Nueva Guinea, Taiwán y en el norte de Borneo. En la naturaleza se desarrolla de manera saprófita sobre troncos caídos y árboles en decadencia, principalmente de los géneros *Castanopsis*, *Pasania*, *Castanea*, *Fagus*, *Acer*, *Alnus*, *Populus*, y *Quercus*; en bosques con clima húmedo y templado (Wasser, 2005). Dado que es un hongo de pudrición blanca, contiene enzimas hidrolíticas y oxidativas que le permiten degradar la celulosa, hemicelulosa y lignina de manera selectiva, jugando un papel importante en el ecosistema (Elisashvili *et al.*, 2008).

Nutrición, desarrollo y estructura

Todos los hongos son heterótrofos, ya que liberan enzimas al medio para degradar el sustrato y absorber los nutrientes por ósmosis (Herrera y Ulloa,

1998). Estos requieren fuentes de carbono y nitrógeno en una relación óptima para su desarrollo. Algunos utilizan los nitratos o amonio como única fuente de nitrógeno, mientras que otros necesitan nitrógeno orgánico. En este caso, un simple aminoácido como la asparagina puede ser una buena fuente. La mayoría de los hongos pueden aprovechar la glucosa y otros monosacáridos como fuente de carbono. En la naturaleza estos degradan la celulosa hasta llegar a celobiosa y glucosa para absorberla. Algunos necesitan ciertas vitaminas para su buen funcionamiento, los requerimientos más comunes pueden ser cubiertos por pequeñas cantidades de tiamina, biotina o ambas (Deacon, 2006).

Los hongos son de los organismos más variables y polimorfos entre los seres vivos. En términos generales, los basidiomicetos forman un micelio verdadero compuesto por estructuras filamentosas y delgadas denominadas hifas. En alguna de las fases de su ciclo producen esporas sexuales (basidiosporas). Las esporas son unidades microscópicas de propagación, de las cuales emerge una hifa monocariótica (micelio primario) y al encontrarse con una hifa complementaria, se unen en un proceso denominado plasmogamia, dando origen a hifas dicarióticas (micelio secundario). Cuando las condiciones son propicias el micelio produce fructificaciones (micelio terciario), en donde ocurre la cariogamia (fusión de núcleos) y posteriormente un proceso de meiosis en estructuras conocidas como basidios para cerrar el ciclo. Los basidios producirán esporas con carga haploide para volver a comenzar el ciclo (Figura 1) (Deacon, 2006; Herrera y Ulloa, 1998).

La célula fúngica cuenta con características que la hacen única. A excepción del núcleo, pueden pasar organelos de una célula a otra a través del poro entre septos. En la parte apical de las hifas existe una zona con pocos o ningún organelo mayor donde se conglomeran vesículas quizás derivadas de los cuerpos de Golgi. Dichas vesículas contienen quitina sintasa, la enzima responsable de la síntesis de quitina, que junto con los β -glucanos son los componentes más importantes de la pared celular.

Después de la zona de vesículas se encuentra una región rica en mitocondrias, donde por la acción de ATPasas se genera un gradiente de protones (H^+) a través de la membrana celular. Dicho gradiente está relacionado con la toma de nutrientes en el ápice de la hifa (Deacon, 2006).

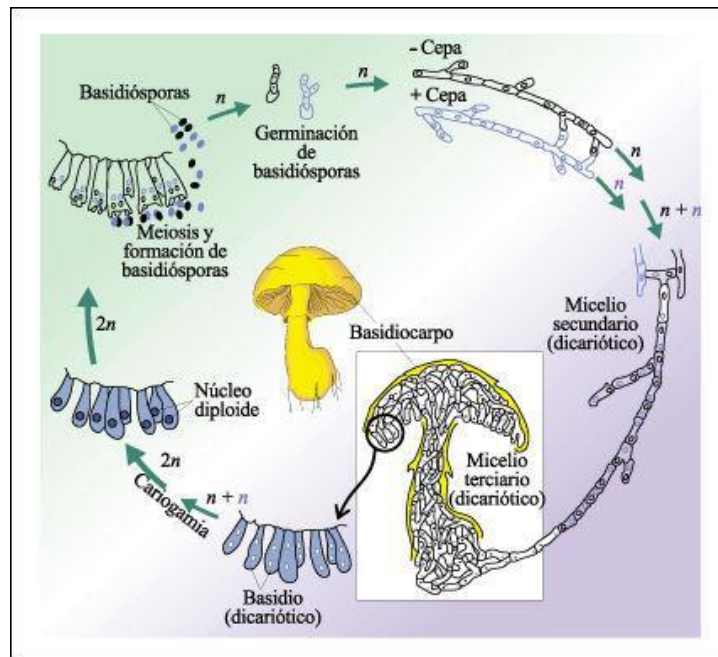


Figura 1. Ciclo de vida de un basidiomiceto. Fuente: Herrera y Ulloa, 1998.

La pared celular fúngica tiene funciones de gran importancia en estos organismos. Sirve como protectora de factores perjudiciales (estrés abiótico y organismos patógenos), regula la morfogénesis y recibe señales externas. También es útil para la transferencia de mensajeros de membrana intracelulares e interviene en la producción de células de resistencia. (Feofilova, 2010). Los mayores componentes de la pared celular de los hongos son polisacáridos, alrededor del 90%. En basidiomicetes se encuentran principalmente quitina y glucanos, no obstante pueden estar presentes otros carbohidratos como galactosa, galactosamina, xilosa y fucosa; también proteínas y sales inorgánicas (Lalgé y Calderone, 2006). Los componentes de la pared celular pueden dividirse en (a) estructurales

como la quitina y β -glucanos; y (b) infraestructurales como manoproteínas, xilomanoproteínas y α -(1-3)-glucanos. (Feofilova, 2010).

La síntesis de los β -(1-3)-glucanos se realiza por un complejo enzimático asociado a la membrana celular, denominado β -glucano sintasa (UDP-glucosa 1-3- β -D-glucano 3- β -D-glucosil transferasa, EC 2.4.1.34) (GS). Este complejo enzimático utiliza UDP-glucosa para sintetizar los β -glucanos, que al mismo tiempo son extrudidos al espacio periplasmático. En *L. edodes* el complejo GS está compuesto por una subunidad catalítica (FKS) y una reguladora (RHO), la última es una proteína G encargada de activar la subunidad FKS. La actividad de RHO es regulada por la proteína ROM (factor de intercambio GDP-GTP), la cual es estimulada por estrés ambiental, principalmente de tipo oxidativo (Figura 2) (Reverberi *et al.*, 2004).

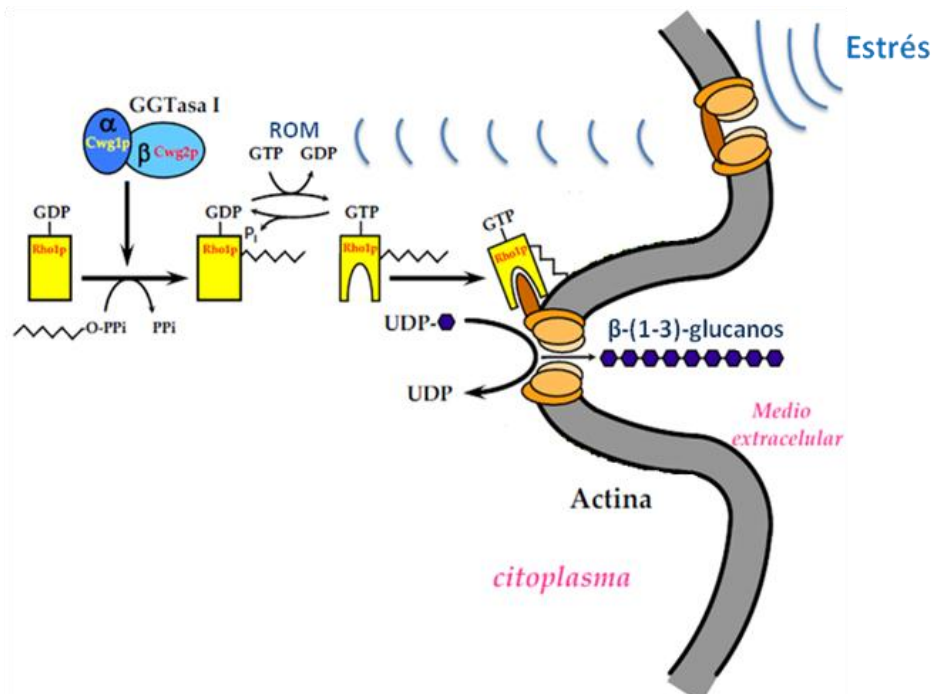


Figura 2. Síntesis de β -(1-3)-glucanos. Fuente: Pereira-Martins, 2009.

La quitina forma un complejo estable con los β -glucanos, es conocido como el complejo quitina-glucano, en donde una red de microfibrillas de quitina se encuentra inmersa en una matriz amorfa de glucanos. El contenido y la relación quitina-glucano puede variar dependiendo de la composición del medio de cultivo (Latgé y Calderone, 2006).

Propiedades nutrimentales y medicinales

Además de la importancia de este hongo para el ecosistema, el humano ha encontrado en él grandes beneficios para la salud. *L. edodes* es un hongo comestible y medicinal reconocido por su gran valor nutrimental. Contiene 58-60% de carbohidratos, 3-4% de lípidos y 20-23% de proteínas con una digestibilidad de 80-87% (Wasser, 2005). Estas están compuestas por 18 distintos aminoácidos incluyendo los esenciales (Turlo *et al.*, 2008). Además contiene vitamina 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 (Çağlarirmak, 2007). Su contenido de fibra presenta un rango de 6-15%, con polisacáridos como la quitina y β -glucanos, y lignina como constituyentes de la pared celular (Stamets, 2000). Además del perfil nutrimental mencionado anteriormente, *L. edodes* es reconocido por sus propiedades medicinales y su baja toxicidad para el organismo.

Entre las distintas propiedades que se le atribuyen a shiitake, cabe destacar la capacidad antimicrobiana. Esta se ha estudiado *in vitro* y probado en una gran gama de microorganismos como bacterias gram positivas y negativas, levaduras y hongos filamentosos. En estudios previos, extractos acuosos han ocasionado halos de inhibición en cultivos de bacterias patógenas importantes como *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., entre otras. También se ha demostrado su efectividad contra hongos como *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* (Hearst *et al.*, 2009) y *A. flavus* (Rao *et al.*, 2009). No solo los basidiomas y el micelio, también el medio líquido en el que *L. edodes* es cultivado adquiere esta propiedad, lo cual propone que el hongo excreta al medio de cultivo algunas de las sustancias

responsables de esta actividad. Uno de los componentes a los que se le atribuye actividad antimicrobiana es la lentionina (Hatvani, 2001), un compuesto azufrado y principal responsable de brindar el aroma y sabor característico de *L. edodes*.

La lentionina es un compuesto multifuncional, ya que también ha mostrado actividad anti-agregación plaquetaria *in vitro*. Esto se comprobó en un estudio con sangre de voluntarios sanos, tratados con ácido araquidónico y U-46619 (el análogo del tromboxano A₂) para inducir agregación plaquetaria. La lentionina resultó ser el más efectivo entre los compuestos obtenidos de aceites esenciales de *L. edodes* (Shimada *et al.*, 2004).

Distintos extractos orgánicos del micelio y cuerpo fructífero han exhibido gran potencial para evitar la oxidación celular. En un trabajo realizado por Kitzberger *et al.* (2007), se obtuvieron extractos de fructificaciones de *L. edodes* con distintos solventes orgánicos (hexano, diclorometano y etil acetato), y por extracción supercrítica. Estos extractos mostraron una gran actividad antioxidante y buena capacidad para atrapar radicales libres. En otro estudio Turlo *et al.* (2010), cultivaron *L. edodes* en fermentación líquida suplementando el medio de cultivo con selenio (Se). Se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos acuoso y metanólico del micelio suplementado con Se y sin suplementar. El micelio suplementado mostró hasta el doble de actividad antioxidante, un mayor poder reductor y una capacidad para atrapar radicales libres 40% mayor, con respecto a los controles sin suplementar. Extractos del micelio y fructificaciones de *L. edodes* obtenidos con distintos solventes han mostrado actividad antioxidante, lo cual propone que son distintos compuestos los responsables de esta propiedad.

Otras actividades biológicas que ha mostrado este basidiomiceto son los efectos citostático e inmunomodulador. Estos se han probado *in vitro* con la línea celular humana de adenocarcinoma de mama (MCF-7) y en una prueba de transformación de linfocitos. Se estudiaron extractos acuoso y metanólico tanto del basidioma como del micelio, logrando la supresión de la

proliferación de las células MCF-7, con valores de IC₅₀ bajos (120-250 µg/ml) con respecto a los valores IC₅₀ en células normales (Israilides *et al.*, 2008). La actividad inmunomoduladora también se ha demostrado *in vivo* mediante la administración de lentinan (un β-glucano de la pared celular) a ratones con células tumorales (K36) implantadas. En dicho estudio se observó un incremento de interleucina-2, factor de necrosis tumoral-α e interferón-γ. Además se lograron inhibiciones del tumor de hasta 96% (Yap y Ng, 2001). Esto sugiere que el extracto acuoso de *L. edodes* tiene actividad citostática, y ambos extractos (acuoso y metanólico) así como lentinan, son potentes estimuladores del sistema inmunológico.

Importancia económica

Gracias a las características mencionadas anteriormente, *L. edodes* ocupa el segundo lugar entre los hongos cultivados a nivel mundial. En los últimos 70 años las técnicas de cultivo de éste y otros hongos han evolucionado notablemente. Anteriormente la investigación referente al cultivo estaba restringida a países como Japón, China y Corea, en donde este hongo se puede encontrar creciendo de manera natural. Ahora *L. edodes* es aprobado por los consumidores en Norteamérica y otras partes del mundo, principalmente Europa. Debido al gran auge, algunas unidades de producción experimental operan en países como Holanda, Francia, Alemania, Polonia (Campbell y Racjan, 1999) y México (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006).

A principios de la década de los 80's, Japón era el líder en la producción de *L. edodes*, contribuyendo con un 82.8% de la producción mundial. En 1987, ocurrió un cambio drástico en las dinámicas globales con respecto a *L. edodes*, China tomó el liderazgo por primera vez produciendo 178,800 t (Chen, 2005). Con el paso del tiempo, el cultivo de este exquisito hongo ha aumentado, alcanzando una producción de 7.5×10^6 t en el 2000 (Kitzberger *et al.*, 2007). Shiitake ha tomado tanto auge, que en la actualidad existe una gran variedad de productos como extractos del micelio y cuerpo

fructífero, los cuales son comercializados como suplementos alimenticios (Wasser, 2005). Además se utiliza como ingrediente de aderezos para ensaladas y es comercializado en presentación de bolsas de té, incluso es componente de algunos productos de belleza como cremas para la piel (Sugui *et al.*, 2003). Se estima que su comercialización genera alrededor de \$5-6 billones de dólares por año (Lull *et al.*, 2005).

Cultivo de *Lentinula edodes* y otros hongos medicinales

El cultivo de hongos como *L. edodes* es una actividad milenaria. Comenzó utilizando troncos caídos principalmente de encino. Posteriormente se desarrolló la técnica de cultivo en bolsas utilizando aserrín del mismo árbol como sustrato. En las últimas décadas, por la inaccesibilidad del encino y el riesgo ecológico que representa su utilización, se han evaluado sustratos alternativos para su cultivo (Stamets, 2000). Recientemente, con el desarrollo de la tecnología y con nuevos enfoques para la utilización de hongos medicinales, se cultivan *L. edodes* y otros hongos de interés comercial y farmacológico en medio líquido. Esto se realiza utilizando matraces Erlenmeyer y biorreactores. Con esta nueva técnica se pueden biodirigir los cultivos, logrando periodos cortos de producción y la recuperación de la biomasa es sencilla (Papaspnyridi *et al.*, 2010).

Cultivo tradicional

El cultivo tradicional de *L. edodes* se inició en China, posteriormente gente que trabajaba en granjas en Japón perfeccionó la técnica hasta convertirlo en industria (Chen, 2005). Los primeros registros que se conocen acerca del cultivo de este hongo corresponden a Wu Sang Kwuang durante la dinastía Sung en China (960-1127). En 1904, el investigador Japonés Shozaburo Mimura publicó los primeros estudios sobre el cultivo de *L. edodes* en troncos inoculados con micelio previamente cultivado. El cultivo tradicional se realiza con troncos de árboles como el *Quercus*, *Fagus*, *Populus* y *Acer*,

idea que surgió al observar que el hongo se desarrollaba de manera natural en los troncos de estos árboles (Stamets, 2000). De acuerdo con este autor, la técnica consiste en practicar orificios en dichos troncos, posteriormente se inoculan con madera o aserrín colonizado por *L. edodes*. Estos se apilan a la intemperie, se espera a que el hongo colonice el tronco y fructifica cuando es temporada de lluvias. El proceso puede tardar de seis meses a un año y su rendimiento es bajo. Actualmente se sigue cultivando *L. edodes* de manera tradicional, no obstante la mayor parte de la producción mundial se obtiene utilizando formulaciones sintéticas.

Cultivo de *L. edodes* con formulaciones sintéticas

Según Stamets y Chilton, 1983, esta técnica requiere de varios pasos antes de obtener las fructificaciones. Primeramente es necesario obtener una cepa, para lograrlo, la propagación vegetativa es la forma más común y recomendada, ya que asegura el aislamiento de una cepa sin problemas importantes de contaminación. Para ello es necesario preparar un medio de cultivo en donde se pueda desarrollar de manera adecuada. Los medios más recomendados para *L. edodes* son: 1. agar con extracto de papa, dextrosa y levadura, 2. agar con extracto de malta y 3. agar con extracto de avena y levadura. El medio de cultivo previamente preparado, se inocula tomando una pequeña parte del contexto del hongo, después se incuba a una temperatura de 25°C en la oscuridad por ca. 9 días

Una vez que un tercio del medio está colonizado por el hongo, es adecuado para la fase de preparación de semilla (inóculo), donde se recomiendan los granos de trigo, sorgo y mijo. Se toma una porción de micelio previamente cultivado en agar para inocular cada uno de los frascos o bolsas con grano estéril. Posteriormente se incuban a 25°C por ca. 15 días

Para obtener fructificaciones generalmente se utiliza una formulación a base de aserrín o viruta de encino, adicionado con materia rica en nitrógeno como salvado de arroz, trigo, centeno, avena o melaza. La mezcla se coloca en bolsas que resistan el calor del autoclave, se esterilizan e

inoculan con la semilla previamente preparada. Una vez que el sustrato está completamente colonizado, las bolsas son retiradas y los bloques colonizados se colocan en un lugar apropiado para su fructificación.

El cuarto de fructificación debe tener una humedad relativa de 95-100% para la formación de los primordios y una temperatura de entre 10-16°C. Una vez formados los primordios, la humedad se disminuye a un rango de 60-80%, y la temperatura se aumenta a 16-18°C para el desarrollo de las fructificaciones. Este proceso requiere de luz e intercambios de aire fresco. Una estrategia utilizada para *L. edodes* (Stamets, 2000), es sumergir los bloques de sustrato colonizado en agua fría por 24-36 h para inducir la formación de fructificaciones. Todo el proceso de cultivo dura de 3-4 meses, según la cepa y la cantidad de inóculo con que se trabaje.

Utilización de sustratos alternativos para el cultivo de *L. edodes*

Ya que la utilización de madera de encino podría poner en riesgo el ecosistema, además de ser inaccesible en algunas zonas, se han buscado sustratos alternativos para el cultivo de shiitake. Debido a la agricultura y otras actividades, anualmente se generan una gran cantidad de residuos lignocelulósicos en todo el mundo. Estos se han aprovechado para el cultivo de *L. edodes* y otros hongos saprobios como una forma de remediación (Sánchez y Royse, 2002). En Turquía se cultivó *L. edodes* sobre cáscara de avellana pura y mezclada con rastrojo de trigo, y viruta de haya (*Fagus silvatica*), obteniendo eficiencias biológicas (EB) de 43-62%. La EB más alta se logró con una mezcla de 25% de cáscara de avellana y 75% de rastrojo de trigo (Özçelik y Pekşen, 2007). En los Estados Unidos se cultivó *L. edodes* utilizando rastrojo de trigo como sustituto parcial del aserrín de encino, obteniendo eficiencias biológicas de 87-107% (Royse y Sánchez, 2007).

En México se ha cultivado este hongo de manera exitosa utilizando sustratos no convencionales. Gaitán-Hernández y Mata (2004) cultivaron *L. edodes* sobre rastrojo de trigo, con la novedad de pasteurizar el sustrato

aprovechando la energía geotérmica de una planta de la Comisión Federal de Electricidad en Puebla. Ellos demostraron que el rastrojo de trigo pasteurizado es una buena alternativa para el cultivo de *L. edodes*, con costos de producción bajos.

. En búsqueda de un sustrato ideal para el cultivo de *L. edodes*, se realizó un estudio sobre la utilización de madera de la poda de la vid para el cultivo de este hongo. En dicho estudio se obtuvieron eficiencias biológicas cercanas al 100%, un tiempo de incubación aceptable y un periodo corto (45-90 días dependiendo la cepa) de producción de carpóforos. Esto coadyuvó a entender que no sólo las maderas duras son un buen sustrato para el cultivo de *L. edodes* (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006). El corto periodo de producción y la alta EB obtenida sobre la madera de vid, se puede atribuir a que existe una gran biodisponibilidad de compuestos susceptibles a oxidación por parte de las enzimas secretadas por este hongo (Cabrera-Ruiz, 2010). Lo anterior es de suma importancia, ya que México es un gran productor de uva (SAGARPA, 2010) y dicha actividad genera una gran cantidad de desechos anualmente. Actualmente la mayoría de los trabajos que tratan del cultivo de *L. edodes* se dirigen al mejoramiento del proceso, rendimiento y calidad del producto.

Cultivo sumergido de *L. edodes* y otras especies medicinales

La última tendencia en cuanto a cultivo se refiere, es la producción de biomasa fúngica por fermentación líquida. Mediante esta técnica los cultivos pueden ser dirigidos hacia la obtención de productos de interés. Cultivos sumergidos de *L. edodes* se han enfocado en la obtención de un producto enriquecido en vitamina B₁₂. En este estudio se probaron distintos medios logrando producir hasta 10 g/L de micelio. En adición, se logró incrementar la biosíntesis de esta vitamina en más de 800%, agregando cobalto y metionina al medio de cultivo (Turlo *et al.*, 2008). También se han realizado esfuerzos con el hongo medicinal *Ganoderma lucidum*, potenciando la producción de biomasa y ácido ganodérico, triterpenoide conocido

principalmente por su actividad anti-VIH y anticancerígena. Lo anterior se logró adicionando distintas fuentes de carbono y nitrógeno al medio de cultivo y seleccionando las mejores. Con dicho protocolo se formuló un medio complejo compuesto de glucosa, peptona, harina de maíz y polvo de frijol de soya (Xu *et al.*, 2008).

Recientemente los polisacáridos de origen fúngico, en especial los β -glucanos han tomado gran relevancia debido a sus propiedades medicinales, entre las que destacan sus efectos antitumorales e inmunomoduladores (Wasser, 2005). Lo anterior ha promovido la investigación sobre el cultivo sumergido de distintos hongos medicinales. En el basidiomiceto *Antrodia cinnamomea*, se evaluó la influencia que tienen los factores como pH, temperatura, fuente de carbono y nitrógeno en el crecimiento micelial y síntesis de exopolisacáridos. La producción de exopolisacáridos en esta especie puede ser potenciada manipulando las condiciones del cultivo y modificando la composición del medio (Lin y Sung, 2006). Otro hongo en el que se ha seguido una estrategia similar es *Armillaria luteo-virens*. En este basidiomiceto se encontró que el extracto de levadura y las distintas concentraciones de glucosa son factores que influyen en el desarrollo micelial y producción de exopolisacáridos (Jiao *et al.*, 2008).

Otros hongos cultivados que contienen polisacáridos biológicamente activos son *Schizophyllum commune* y *Ganoderma lucidum*. El esquizofilan es un β -glucano producido por *S. commune*. Este se ha obtenido por cultivo sumergido, seleccionando las mejores fuentes de carbono y nitrógeno (Kumari *et al.*, 2008). Para la producción de polisacáridos en *G. lucidum* se han seguido distintas estrategias. Recientemente se estudiaron los efectos de distintos elicitores fúngicos para la producción de polisacáridos. Dichos elicitores se obtuvieron de hongos como *Tuber*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Saccharomyces*. Este es un nuevo y efectivo enfoque para la producción de biomasa y polisacáridos de este hongo (Zhu *et al.*, 2008). Otra estrategia que se ha empleado es el cambio de la tensión de oxígeno

disuelto y pH aplicado en distintos tiempos de la fermentación, adicionando el medio con lactosa como fuente de carbono (Tang *et al.*, 2009).

Como se había mencionado anteriormente, *L. edodes* es uno de los hongos de mayor importancia farmacológica debido al lentinan, un β -glucano de la pared celular al cual se le atribuyen propiedades inmunoestimulantes (Yap y Ng, 2001). Actualmente son escasos los trabajos en *L. edodes* dirigidos a la estimulación de la producción de biomasa y lentinan en cultivo sumergido. Tomati *et al.* (2004) realizaron un estudio sobre la utilización de aguas residuales del procesamiento del olivo (OMW) para el cultivo de *L. edodes*. En donde se observó una producción de biomasa dos veces mayor (ca. 12.5 g/L) con respecto al control (extracto de malta con peptona). Además se caracterizó una fracción polisacáridica extraída de shiitake mediante la utilización de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), logrando identificar a lentinan y xilano.

Ruiz-Esparza (2005) cultivó *L. edodes* y encontró que la cepa IE-245 produjo la mayor cantidad de biomasa con la formulación descrita por Lomberh *et al.* (2002), misma cepa con la que se obtuvo una EB del 93% sobre madera de vid (Gaitán-Hernandez *et al.*, 2006). También se encontró que el método propuesto por Yap y Ng (2001) fue más eficiente que el de Chihara *et al.* (1969) para la obtención de lentinan a partir del micelio, logrando aislar polisacáridos de mayor pureza. Estudios de metilación, derivatización, FT-IR (espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier) y RMN en 1 y 2 dimensiones permitieron confirmar la estructura característica de β -(1-3)-glucano (lentinan).

En *L. edodes* se conoce que la actividad de lignina peroxidasa es estimulada por distintos compuestos fenólicos, mientras que la actividad de manganeso peroxidasa es potenciada principalmente por estrés oxidativo. La actividad de aril alcohol oxidasa y lacasa está relacionada con la generación *in situ* de especies reactivas de oxígeno (H_2O_2 , OH^\cdot y O_2^\cdot), producto de la oxidación enzimática de compuestos fenólicos. Por lo anterior, se ha reportado que las enzimas oxidativas presentes en *L. edodes*

operan de forma cooperativa en la degradación de la lignina (Elisashvili *et al.*, 2008; Harris-Valle *et al.*, 2007).

Los últimos autores mencionados evaluaron la influencia de la aplicación de extractos de madera de vid de distinta polaridad al medio de cultivo de *L. edodes*. En dicha investigación se observó que los extractos polares (acuoso y etanólico) estimulan la producción de biomasa y de manera contraria, los no polares (toluénico y clorofórmico) la inhiben. Además se encontró que una mezcla de todos los extractos puede aumentar de manera significativa la producción de biomasa (ca. el doble con respecto al control). En este mismo estudio se observó que mediante la aplicación de estos extractos al medio de cultivo se incrementa la actividad de las principales enzimas ligninolíticas presentes en *L. edodes*.

En un esfuerzo por dilucidar como opera el complejo enzimático responsable de la síntesis de los β -(1-3)-glucanos en *L. edodes* y aprovechando la productividad de las OMW, se probó el efecto de la adición de éstas al medio de cultivo. Se observó que su aplicación estimula la actividad de la GS significativamente (ca. 4 veces más con respecto al control). Se conoce que las OMW contienen en su mayoría compuestos fenólicos y lipídicos. Bajo esta premisa, se adicionó un extracto fenólico de OMW al medio de cultivo, derivando en un incremento significativo de la actividad de la GS (ca. 7 veces más con respecto al control). Además, la adición de OMW y el extracto fenólico individualmente, tienen una influencia positiva sobre la actividad de lacasa. De forma similar se observó un incremento en la actividad de catalasa y superóxido dismutasa, enzimas relacionadas con la respuesta al estrés oxidativo (Reverberi *et al.*, 2004).

Lentinan: un β -(1-3)-glucano de *L. edodes*

Con el desarrollo de nuevas herramientas la obtención, caracterización y el conocimiento del modo de acción de metabolitos con actividad biológica se han facilitado. Por lo que de *L. edodes* se han logrado extraer y aislar

distintos compuestos bioactivos, entre los que destaca lentinan, un β -(1-3)-D-glucano presente en la pared celular de *L. edodes*, el cual presenta dos ramificaciones laterales cada cinco residuos (Figura 3) (Zhang *et al.*, 2011). Lentinan es considerado un potente inmunoestimulador y está aprobado en Japón para terapias antitumorales (Kupfahl *et al.*, 2006).

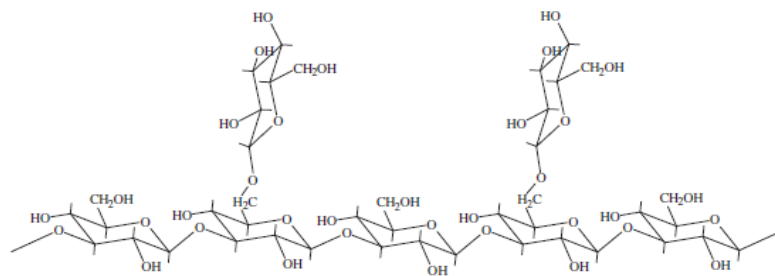


Figura 3. Estructura de lentinan. Fuente: Zhang *et al.*, 2011.

Extracción y aislamiento

Chihara *et al.* (1969) aislaron por primera vez lentinan. El proceso requirió de 20 kg de hongos en fresco, e involucra etapas de extracción con agua caliente, seguido de una remoción de proteínas y subsecuentes lavados con ácido acético, hidróxido de sodio y etanol. Posteriormente esta técnica fue mejorada por Yap y Ng (2001), disminuyendo el tiempo y costo de la extracción. Dicho protocolo requiere de 100 g de cuerpos fructíferos en fresco para la extracción e involucra una homogenización de la biomasa y extracción con agua caliente, seguido de una precipitación con etanol y tratamientos de índole física para obtener 325 mg de lentinan.

Recientemente se aisló lentinan con un nuevo método que involucra una extracción con una solución de NaOH/NaBH₄, seguido de un proceso de desproteinización y un tratamiento con H₂O₂ para decolorizarlo,

posteriormente se dializa por 7 días. Este proceso es seguido de pasos de centrifugación y tratamientos con agua/acetona, y un último dializado para obtener un producto puro con un rango de peso molecular relativamente estrecho. Por este nuevo método de obtención el lentinan puede ser almacenado más de dos años y tiene un rendimiento de 5%, el más alto registrado (Wang *et al.*, 2008). En ese mismo año surge una patente china, la cual trata de la extracción de lentinan con ultrapresiones. Este método involucra una extracción líquida a ultra alta presión utilizando polvo seco de *L. edodes*, seguido de las filtraciones convencionales. Este es un proceso de corta duración que no utiliza altas temperaturas ni soluciones alcalinas que puedan degradar la molécula y disminuir su actividad (Zhang *et al.*, 2011).

Estructura química y conformación en solución

La estructura química de un polisacárido está definida por los monosacáridos que lo constituyen, configuración y posición de enlaces glucosídicos, y secuencia de monosacáridos. Esta demostrado que lentinan esta compuesto por unidades de β -(1-3)-D-glucosa en su cadena principal, presentando dos ramificaciones laterales de β -(1-6)-D-glucopiranosil cada cinco residuos (Sasaki y Takasuka, 1976). Además se ha encontrado que presenta un rango de peso molecular (M_w) de 3×10^5 - 10.5×10^5 Da, dependiendo la técnica de determinación utilizada (Zhang *et al.*, 2011).

Lentinan adopta una conformación de triple hélice en solución, lo cual se cree que esta relacionado con su bioactividad. Se ha demostrado que esta actividad disminuye al romperse la triple hélice y obtener volutas sencillas (Zhang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008). Los puentes de hidrógeno intramoleculares son las fuerzas que mantienen estables la conformación de hélice sencilla de lentinan. En cambio, la conformación de triple hélice se la confiere la formación intermolecular de puentes de hidrógeno. La transición de hélice sencilla a triple puede ser inducida por un cambio en la temperatura de la solución. (Wang *et al.*, 2008). Estos datos son de gran importancia en cuanto a la aplicación de lentinan se refiere.

Bioactividad y modo de acción

La actividad de lentinan se estudió por primera vez en sarcoma 180 en ratones, inhibiendo el crecimiento de las células tumorales y logrando la regresión completa de los tumores en 10 dosis de 5-30 mg/Kg (Chihara *et al.*, 1969, 1970). Una estrategia común para aumentar o modificar las propiedades de las moléculas es la modificación química. La actividad de lentinan en su forma sulfatada se ha probado en la enfermedad de Newcastle, promoviendo la producción de anticuerpos y linfocitos (Guo *et al.*, 2008). Existen distintos estudios sobre la actividad biológica de lentinan, principalmente en su forma nativa (Tabla1).

Tabla 1. Actividades de lentinan y modelo biológico utilizado.
Fuente: Zhang *et al.*, 2011.

Muestra	Animales	Bioactividad
Lentinan	Ratones	Antitumoral, antimetástasis
Lentinan sulfatado	Pollos	Antiviral, inmunomodulación
Lentinan	Ratones	Antitumoral, inducción de FNT
Lentinan	Ratones	Actividad contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Lentinan	Peces	Inmunoestimulante
Lentinan	Cerdos	Activación de macrófagos
Lentinan	Ratones	Inducción de exudado peritoneal
Lentinan	Ratones	Actividad contra <i>Listeria monocytogenes</i>
Lentinan	Ratas	Antitumoral, Antioxidativo
Lentinan	Ratas	Activación de macrófagos
Lentinan	Ratones	Estimulante de expresión de citosinas
Lentinan	Ratones	Actividad contra infección de malaria

En general, las propiedades inmunoestimulantes y anticancerígenas de lentinan pueden ser atribuidas a la activación de distintas células del sistema inmunológico. Lentinan es capaz de activar fagocitos, macrófagos y células asesinas naturales, los cuales desintegran patógenos y células muertas o tumorales por fagocitosis. Además, lentinan es capaz de activar la producción de mensajeros celulares como el óxido nítrico y el factor de necrosis tumoral alfa (Zhang *et al.*, 2011; Chen y Seviour, 2007).

HIPÓTESIS

La producción de biomasa y lentinan de micelio de *L. edodes* en cultivo sumergido utilizando medios base, se incrementa significativamente mediante la suplementación con extractos de distinta polaridad de madera de vid.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la producción de biomasa y lentinan de *L. edodes* en cultivo sumergido con suplementación de extractos de madera de vid con distinta polaridad.

Objetivos específicos

- Determinar la concentración de extractos de madera de vid (acuoso, etanólico, clorofórmico y toluénico) que produzca una cantidad alta de biomasa de *L. edodes* en cultivo sumergido.
- Determinar la cinética de crecimiento de dos tratamientos y su control (Tratamiento 1 (T1): suplementación con una mezcla de los cuatro extractos de madera de vid; tratamiento 2 (T2): suplementación con una mezcla de los extractos acuoso y etanólico de madera de vid; Control: medio de cultivo sin suplementar).
- Obtener, caracterizar y cuantificar el lentinan obtenido a partir de los tratamientos mencionados anteriormente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas, medios y condiciones de cultivo

Se trabajó con las cepas IE-105 e IE-245 de *L. edodes*, donadas por el Instituto de Ecología (INECOL) Unidad Xalapa, Veracruz. Se utilizó agar papa dextrosa para los cultivos de rutina (producción de inóculo). Se evaluaron cuatro medios de cultivo base: Glucosa-Peptona (GP), el reportado por Lomberh *et al.* (2002) y dos modificaciones del medio reportado por Kirk *et al.* (1976). La formulación de los medios se describe en el apéndice 1. Para las fases experimentales se utilizaron matraces Erlenmeyer con capacidad de 125 mL, llenados con 50 mL de medio de cultivo, cada uno se inoculó con dos discos de 1cm de diámetro de agar colonizado con micelio de *L. edodes*. En la etapa de producción de biomasa para la obtención de lentinan, se utilizaron matraces con capacidad de 1L llenados con 400 mL de medio, cada uno se inoculó con 16 discos de 1cm de diámetro. El pH inicial de los medios se ajustó a 5.5 utilizando HCl 3 M y NaOH 3 M. En todos los experimentos los matraces se colocaron en un agitador orbital a 120 rpm, 25°C, en la oscuridad por 21 días.

Extractos de madera de vid

Obtención de los extractos

Se utilizó madera de vid (*Vitis vinifera var. superior*) de un mismo lote de producción proveniente de La Costa de Hermosillo. La madera se molió en un molino eléctrico a un tamaño de partícula de 1-2 mm. Los extractos se obtuvieron de 120 g de madera de vid, utilizando un equipo soxhlet con los distintos solventes (agua, etanol, tolueno y cloroformo) en reflujo constante por ca. 3 h. Posteriormente los extractos se concentraron utilizando un

rotavapor y finalmente se secaron con flujos de aire (Harris-Valle *et al.*, 2007), a excepción del extracto acuoso el cual se liofilizó.

Caracterización de los extractos

Preparación de la muestra

Se pesaron 0.501 g del extracto acuoso, 0.506 g del extracto etanólico, 0.502 g del extracto clorofórmico y 0.21 g del extracto toluénico. Posteriormente, se homogenizó cada muestra con 20 mL de metanol al 80%, el homogenizado se sonicó por 30 min y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se dieron dos lavados adicionales con 10 mL de metanol 80%, colectando el sobrenadante para ser filtrado en papel Whatman No. 1. Finalmente el extracto obtenido fue aforado a un volumen de 30 mL con metanol 80% y almacenado a -20°C hasta su uso en las determinaciones de fenoles y flavonoides totales.

Fenoles totales

La determinación de fenoles totales se realizó empleando el método espectrofotométrico descrito por Singleton y Rossi (1965), con algunas modificaciones. Se adicionó en una microplaca 75 µL del reactivo Folin-Ciocalteu [1:10], 15 µL de extracto y 60 µL de Na₂CO₃ al 7.5%. La mezcla se dejó reposar durante 30 min y se leyó la absorbancia a 765 nm en un lector de placas. Los resultados se reportan como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de peso seco (ps) de extracto, utilizando una curva estándar de ácido gálico.

Flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se determinó siguiendo el método descrito por Zhinsen *et al.* (1999), con algunas modificaciones. En tubos de 2 mL se colocaron 100 µL de extracto, inmediatamente se adicionaron 430 µL de NaNO₃ al 7% y se dejó reposar durante 5 min, posteriormente, se

agregaron 30 μL de AlCl_3 al 10% y transcurrido 1 minuto se adicionó 440 μL de NaOH (1 molar). Se tomaron 150 μL de cada tubo y se llevaron a una microplaca para leer la absorbancia a 496 nm en un lector de placas. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de catequina (EC)/100 g de peso seco (ps) de extracto, utilizando una curva estándar de catequina.

Potenciación de biomasa (evaluación de los extractos)

Partiendo de una concentración conocida de los extractos de madera de vid reportada por Harris-Valle *et al.* (2007), se realizaron distintas corridas experimentales aplicando un gradiente de concentraciones de extractos al medio de cultivo. En esta etapa se trabajó con la cepa IE-105 y el medio de cultivo base GP. Las concentraciones con mayor producción de biomasa se llevaron a la etapa de cinética de crecimiento.

Selección de la cepa y medio de cultivo base

En esta etapa se evaluó la interacción de los cuatro medios base con las dos cepas de *L. edodes*. La combinación con mayor producción de biomasa se eligió como base para formular dos tratamientos, el tratamiento 1 (T1) consistió en la aplicación de una combinación de los cuatro extractos, y el tratamiento 2 (T2) constó de una aplicación de los extractos polares. El control consistió solo del medio base sin la aplicación de extractos. De los tres se determinaron los parámetros de una cinética de crecimiento, se produjo biomasa para obtener lentinan y se determinó la composición proximal de dicha biomasa.

Determinación de la cinética de crecimiento

De los tratamientos mencionados se colectó el micelio producido cada tercer día hasta los 21 días, utilizando un papel filtro de poro grueso para separarlo

del medio de cultivo. El tiempo de fermentación se determinó con base en un estudio previo (Harris-Valle *et al.*, 2007). Posteriormente se llevó a peso constante en un horno a 40°C por 48 horas. Se pesaron los filtros sin biomasa y con biomasa para obtener por diferencia el peso del micelio y posteriormente graficar la producción de biomasa (peso seco) a través del tiempo. Para la descripción cuantitativa de la cinética de crecimiento se utilizó la ecuación logística de Velhurst-Pearl:

$$X(t) = \frac{X_M}{1 - [(X_M - X_0)/X_0 e^{\mu_M t}]}$$

Donde X (t) es la biomasa en cualquier tiempo de la fermentación, X₀ es la biomasa inicial, μ_M es la velocidad específica de crecimiento máxima (días⁻¹) y X_M es la biomasa máxima en el periodo de cultivo. Esta ecuación ajusta los datos experimentales al menor valor de la suma de cuadrado del error en función de los parámetros mencionados anteriormente (Viniestra-González *et al.*, 2003).

Obtención de lentinan

Para la obtención de lentinan se siguió la metodología propuesta por Yap y Ng (2001), descrita en la Figura 4. Mediante este protocolo se realizan extracciones con agua a 100°C, además se utiliza etanol para la precipitación de los polisacáridos y posteriores lavados, las demás etapas son centrifugaciones para separar los componentes de la matriz.

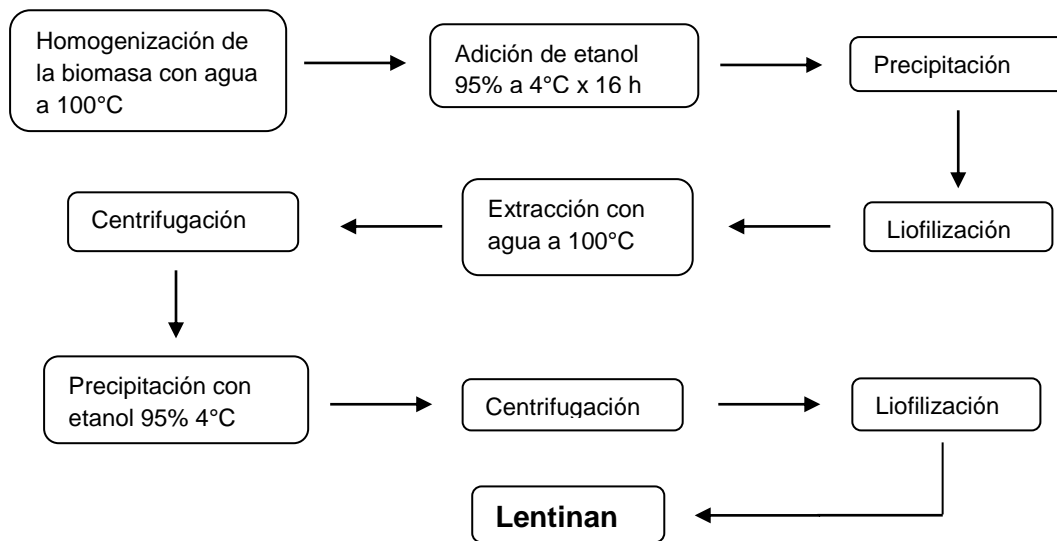


Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología para la obtención de lentinan propuesta por Yap y Ng (2001).

Composición proximal de biomasa y determinación de carbohidratos totales y nitrógeno en productos

Se determinó la composición del micelio y productos de acuerdo a las técnicas mencionadas a continuación.

Determinación de carbohidratos totales

Se utilizó el método de Dubois *et al.* (1956), para determinar carbohidratos totales tanto en biomasa como en productos extraídos.

Determinación de cenizas

Las cenizas en biomasa se determinaron por el método No. 942.05 de la AOAC (2000).

Determinación de nitrógeno y proteína

Para la determinación de nitrógeno en biomasa y productos se empleó el método No. 990.03 de la AOAC (1990), utilizando un equipo de combustión

Leco FP-528. Se utilizó el factor de conversión de $N \times 4.38$ para la determinación de proteína en biomasa (Chang y Miles, 2004).

Determinación de grasa cruda

La grasa de la biomasa se determinó siguiendo el método No. 7.060 de la AOAC (1990).

Caracterización de lentinan

Se realizó una caracterización de los productos obtenidos con el fin de identificar y caracterizar lentinan.

Análisis de composición de monómeros

Se determinó la composición de los monosacáridos presentes en las muestras extraídas del micelio de *L. edodes*, mediante una hidrólisis con ácido trifluoroacético 4N a 120°C por 6 h, seguido de la evaporación del ácido y posteriores lavados de residuos. El hidrolizado se analizó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). El cromatógrafo es un equipo Varian Pro Star (Modelo 210), equipado con un detector de índice de refracción (Varian 356-LC) y una columna Varian Hi-Plex (PLHI-PLHX, 300 X 7.7 mm). La fase móvil utilizada fue H₂O con H₂SO₄ 0.05 mM, el flujo se ajustó a 0.5 mL/min y la temperatura de inyección fue de 65°C. Se utilizaron estándares de glucosa, arabinosa, galactosa, xilosa, manosa, ribosa y ramnosa para identificar los monosacáridos presentes en las muestras.

Identificación de lentinan (FT-IR)

Se obtuvieron espectros con el modo de transmisión utilizando un espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier, mediante el análisis de la muestra en una pastilla con KBr. La pastillas se elaboraron en una prensa a 6000 psi.

Diseños experimentales y análisis estadístico

En la etapa de obtención de los extractos de madera de vid se realizó estadística descriptiva. En la etapa de la evaluación de los extractos de madera de vid se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía a un nivel de $p < 0.05$, en donde la variable de agrupación fue los tratamientos y la variable de respuesta la biomasa producida. Para la etapa de selección de la cepa y medio de cultivo base se realizó un ANOVA a un nivel de $p < 0.05$, en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 X 4. Los niveles del factor A fueron las cepas (IE-105 e IE-245), mientras que los niveles del factor B fueron los cuatro medios de cultivo base (GP, Lomberh *et al.*, 2002 y las dos modificaciones del medio reportado por Kirk *et al.*, 1976), en esta etapa se realizaron 5 repeticiones por tratamiento. En la fase de cinética de crecimiento se realizó un ANOVA a un nivel de $p < 0.05$, en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 7 X 3, en donde los niveles del factor A son los días de cosecha y los niveles del factor B son los tratamientos.

Para la composición proximal se realizó un ANOVA de una vía, donde la variable de agrupación fueron los tratamientos y las variables de respuesta los valores de cenizas, grasa cruda, proteína y carbohidratos totales. En la etapa de determinación de lentinan se realizó un ANOVA de una vía a un nivel de $p < 0.05$, en donde las variables de respuesta fueron el rendimiento del extracto, el rendimiento polisacárido del extracto, la pureza y la cantidad de nitrógeno. La variable de agrupación fueron los tratamientos. Cuando se encontraron diferencias en los análisis de varianza, se realizaron pruebas de comparación de medias de acuerdo con Tukey-Kramer a un nivel de $p < 0.05$. En todos los análisis se utilizó el paquete estadístico NCSS (Hintze, 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extractos de madera de vid

Rendimiento

Los extractos de madera de vid realizados con solventes de distinta polaridad tuvieron los siguientes rendimientos: Tolueno (ET): $0.88 \pm 0.34\%$, cloroformo (EC): $0.40 \pm 0.23\%$, etanol (EE): $2.22 \pm 0.84\%$, agua (EA): $3.58 \pm 1.20\%$. Resultados similares fueron reportados por Harris-Valle *et al.* (2007), utilizando los mismos solventes y la madera de vid como materia prima. Lo anterior indica que los componentes de la madera de vid son constantes aún en distintos lotes.

Fenoles y flavonoides totales

En la Tabla 2 se muestran los valores de fenoles y flavonoides totales de los extractos de madera de vid. Se puede observar que el EA exhibe el valor más alto tanto de fenoles como de flavonoides totales (2801.86 mgEAG/100 g p.s. y 1347.67 mgEC/100 g p.s. respectivamente). El EE presentó el segundo valor más alto de fenoles totales de 861.88 mgEAG/100 g p.s. El ET exhibió el valor más bajo de fenoles totales de 742.67 mgEAG/100 g p.s., no obstante presentó el segundo valor más alto de flavonoides totales (727.47 mgEC/100 g p.s.).

Tabla 2. Contenido de fenoles y flavonoides totales en los extractos.

Los valores son los promedios \pm desviación estándar de tres repeticiones.*Fenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico/100g de extracto en peso seco (p.s.). ** Flavonoides totales expresados como mg equivalentes de catequina/100g de extracto p.s.

Extracto	Fenoles totales (mgEAG/100 g)*	Flavonoides totales (mgEC/100 g)**
EA	2801.86 \pm 70.77	1347.67 \pm 23.43
EE	861.88 \pm 101.21	72.61 \pm 3.39
EC	813.18 \pm 83.35	79.18 \pm 9.26
ET	742.67 \pm 97.27	727.47 \pm 74.53

Potenciación de biomasa (evaluando los extractos)

La Tabla 3 muestra la producción de biomasa de *L. edodes* mediante la aplicación al medio de cultivo con distintas combinaciones de los extractos de madera de vid (concentraciones no mostradas). El tratamiento control (GP: glucosa-peptona) produjo la menor cantidad de biomasa (4.5 g/L reportado en peso seco). Mediante la suplementación al medio de cultivo con combinaciones de los cuatro extractos (tratamientos con código Y) de madera de vid, se logró producir hasta 11.8 g/L de micelio; mientras que la suplementación con combinaciones de los extractos polares (acuoso y etanólico; tratamientos con código Z), produjo hasta 9.5 g/L de biomasa. Ambos resultados superan los reportados por Harris-Valle *et al.* (2007), quienes obtuvieron una producción de ca. 7 g/L mediante la suplementación con una combinación de los cuatro extractos, utilizando el mismo medio de cultivo base (GP). Existen reportes de la potenciación de biomasa de distintos basidiomicetos incluyendo *L. edodes*, mediante la aplicación con extractos polares de tallos de maíz al medio de cultivo (Beltrán-García *et al.*, 2001), lo cual indica que moléculas polares de distintas fuentes vegetales tienen un efecto positivo en el desarrollo de algunos basidiomicetos.

Los autores citados anteriormente sugieren que en extractos polares de tallos de maíz, los compuestos que potencian la producción de biomasa de basidiomicetos son flavonoides y fenólicos. Mientras que Reverberi *et al.* (2004) mencionan que además de los compuestos fenólicos, compuestos lipídicos pueden potenciar la producción de biomasa en algunos basidiomicetos, incluyendo *L. edodes*. Por otro lado, Harris-Valle *et al.* (2007) reportan que mediante la suplementación al medio GP con extractos lipofílicos de madera de vid (clorofórmico y toluénico), la producción de biomasa se inhibe. Además en dicho estudio se observa que mediante la suplementación con extractos polares al medio GP se incrementa la producción de biomasa. La información disponible sugiere que este incremento de producción de biomasa no es influenciada únicamente por la polaridad de los compuestos, sino por la moléculas que están presentes en dichos extractos. Los extractos polares (acuoso y etanólico) de madera de vid son ricos en compuestos fenólicos. Una suplementación con dichos extractos al medio de cultivo incrementa la producción de biomasa (hasta el doble con respecto al control sin suplementar utilizando el medio GP) de *L. edodes*, sin la necesidad de suplementar con los extractos de menor polaridad. Lo mencionado anteriormente es importante desde el punto de vista costo-beneficio.

Estos resultados proporcionaron la base para establecer dos tratamientos a evaluar en las siguientes etapas Y4 (T1: suplementación con los cuatro extractos) y Z3 (T2: suplementación con los extractos acuoso y etanólico). El criterio de selección para las concentraciones de los extractos se basó en la máxima producción de biomasa de las concentraciones aplicadas.

Tabla 3. Efecto de los extractos de madera de vid sobre la producción de biomasa de *L. edodes*. Los valores son los promedios \pm desviación estándar de 3 repeticiones.

Código de tratamientos	EA	EE	EC	ET	Biomasa (g/L)*
Control G/P	0**	0	0	0	4.51 \pm 0.74
Y0	-	-	-	-	8.21 \pm 0.87
Y1	-	-	-	-	8.99 \pm 0.49
Y2	-	-	-	-	9.62 \pm 1.01
Y3	-	-	-	-	9.51 \pm 0.38
Y4	-	-	-	-	11.8 \pm 0.85
Y5	-	-	-	-	10.79 \pm 0.61
Z1	-	-	0	0	8.34 \pm 1.18
Z2	-	-	0	0	8.16 \pm 0.54
Z3	-	-	0	0	9.51 \pm 1.40
Z4	-	-	0	0	9.00 \pm 0.48

* Biomasa expresada en base seca. ** Sin aplicación de extracto.

Selección de la cepa y medio de cultivo base

En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos a partir de la interacción de dos cepas de *L. edodes* con 4 medios de cultivo base. La interacción Kirk1-IE105 no generó crecimiento, mientras que las interacciones con mayor producción fueron Lomberh-IE245 y GP-IE105, con 8.79 y 5.67 g/L respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados por Turlo *et al.* (2008), quienes logran producir hasta 10 g/L de biomasa de shiitake utilizando un medio de cultivo complejo. El medio de Lomberh es rico en nutrientes y con diversos componentes (Lomberh *et al.*, 2002), lo que favorece el desarrollo de shiitake. Además Gaitán-Hernández *et al.* (2006) reportan rendimientos altos utilizando madera de vid en sólido con la cepa IE245. La interacción Lomberh-IE245 resultó significativamente ($p < 0.05$) más productiva que las demás y se decidió tomarla como Control para la siguiente etapa.

Tabla 4. Interacción entre dos cepas de *L. edodes* y cuatro medios de cultivo base. Los valores son los promedios \pm desviación estándar de 5 repeticiones. *Biomasa reportada en base seca.

Cepa	Medio	Biomasa (g/L)*
IE245	Lomberh	8.79 \pm 0.86 ^{a**}
IE105	GP	5.67 \pm 0.34 ^b
IE105	Lomberh	5.53 \pm 0.52 ^b
IE245	GP	5.27 \pm 0.35 ^b
IE105	Kirk2	3.90 \pm 0.58 ^c
IE245	Kirk2	3.73 \pm 0.49 ^c
IE245	Kirk1	2.87 \pm 0.43 ^c
IE105	Kirk1	— ^{***}

** Diferentes literales indican diferencias ($p < 0.05$).

*** Sin producción de biomasa.

Cinética de crecimiento

En las Figuras 5, 6 y 7 se muestran las curvas de las cinéticas de crecimiento ajustadas al modelo logístico utilizado para los dos tratamientos formulados y su control. Los datos experimentales indican que al día 18, T1 y T2 fueron diferentes ($p < 0.05$) al Control, registrando ca. 11.5 g/L de biomasa, valor cercano al máximo registrado al final del cultivo, esto puede deberse a la alta biodisponibilidad de compuestos susceptibles a oxidación, presentes en los extractos de madera de vid (Cabrera-Ruiz, 2010). Al final de la fermentación no se observaron diferencias ($p > 0.05$) en biomasa entre tratamientos, no obstante mediante la suplementación con los extractos de madera de vid al medio de cultivo, la producción de *L. edodes* se acelera. Al día 15 de la fermentación, T1 y T2 alcanzan la biomasa que el Control produce al día 21 de cultivo. Lo anterior es relevante en procesos industriales, ya que al acortar el tiempo de la fermentación se reducen los costos de operación.

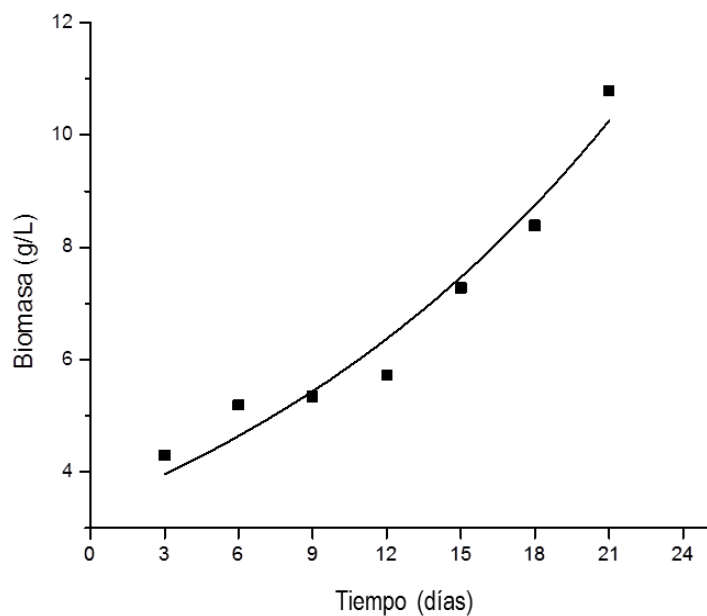


Figura 5. Cinética de crecimiento de *L. edodes* (Control).

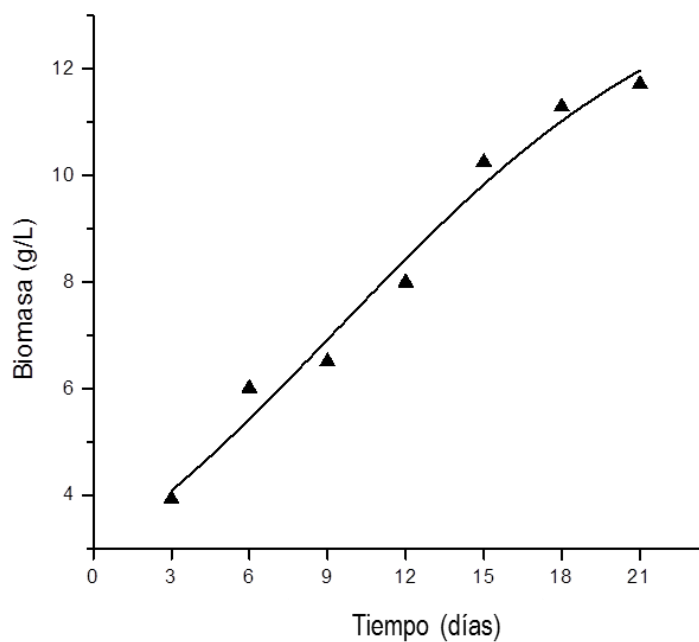


Figura 6. Cinética de crecimiento de *L. edodes* (T1).

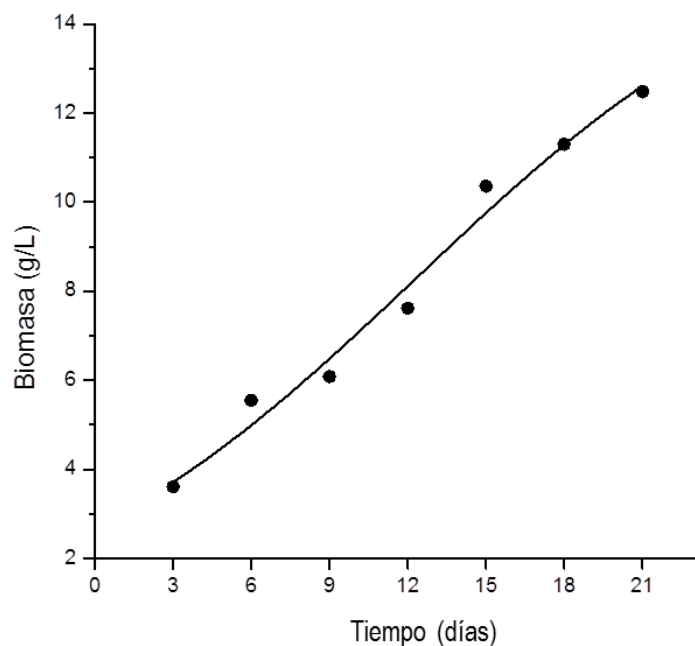


Figura 7. Cinética de crecimiento de *L. edodes* (T2).

En la Tabla 5 se exhiben los parámetros de la cinética de crecimiento. Se puede observar que T2 presentó un mayor valor de X_M (16.5 g/L), seguido de T1 y finalmente el Control. Estos resultados son similares a los obtenidos por Tomati *et al.* (2004), quienes reportan una producción de *ca.* 12.5 g/L de biomasa suplementando un medio de cultivo con aguas residuales del procesamiento de la aceituna. Es conocido que este residuo es rico en compuestos fenólicos al igual que los extractos polares de madera de vid, lo que puede explicar los altos rendimientos en biomasa. Los resultados obtenidos en este estudio superan los reportados por Feng *et al.* (2010), quienes logran producir hasta 6.9 g/L de micelio en forma de pelet y *ca.* 9 g/L en su forma filamentosa, mediante una optimización del medio de cultivo. El rendimiento (Y) se comportó de la misma manera que X_M , ya que es la relación entre la biomasa máxima predicha por el modelo y la cantidad de sustrato utilizado (fuente de carbono). Las μ_M en T1 y T2 fueron más de dos veces mayores al Control. En el caso del Control, el tiempo de duplicación de la biomasa (T_d) es de 13.3 días, mientras que en T1 y T2 este se reduce

a menos de la mitad. El Control presentó la R^2 más baja (0.86), mientras que T2 presentó la R^2 más alta (0.94). Lo anterior indica que el modelo logístico utilizado explica mejor el comportamiento de T1 y T2.

Tabla 5. Parámetros de la cinética de crecimiento del Control, T1 y T2.

Tratamientos	X_M (g/L)	Y (x/s)	μ_M (días ⁻¹)	Td (Ln2/ μ_M)	R^2
Control	10.748	0.268	0.052	13.3	0.86
T1	14.052	0.351	0.146	4.7	0.89
T2	16.578	0.414	0.133	5.2	0.94

X_M : Biomasa máxima; Y: Rendimiento (biomasa/sustrato); Td: Tiempo de duplicación de biomasa μ_M : Velocidad específica máxima de crecimiento.

Composición proximal de biomasa

En la Tabla 6 se muestra la composición proximal de la biomasa de los tratamientos Control, T1 y T2. Los porcentajes de cenizas fueron similares entre los tratamientos y sin diferencias significativas ($p > 0.05$). El tratamiento con el valor más bajo de grasa fue el Control (6.3%), mientras que el T1 presentó el valor más alto (8.7%). T1 se formuló con una combinación de los 4 extractos de madera de vid, dos de los cuales son lipofílicos (clorofórmico y toluénico), lo cual puede explicar un mayor porcentaje de grasa cruda en biomasa. Los valores mencionados anteriormente superan a los reportados para cuerpo fructífero, los cuales oscilan de 2-5% (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006; Stamets, 2000). El valor de proteína más alto lo presentó T2, mostrando diferencias ($p < 0.05$) con el Control, el cual exhibió el valor más bajo. Lo anterior puede deberse a la presencia de aminoácidos libres o proteínas en los extractos de madera de vid. El contenido de carbohidratos totales registrados en este estudio osciló entre 64-70%. Se han reportado 60.9% de carbohidratos totales en micelio de *L. edodes* (Ruiz-Esparza, 2005), mientras que para cuerpo fructífero de 55-85% (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006; Stamets, 2000).

Tabla 6. Composición proximal de biomasa de tratamientos Control, T1 y T2. Los valores son los promedios \pm desviación estándar de tres repeticiones (expresados en base seca). * $N \times 4.38$ (Chang y Miles, 2004).

Tratamientos	Cenizas (%)	Grasa Cruda (%)	Proteína (%)*	Carbohidratos Totales (%)
Control	4.31 \pm 0.128 ^a	6.31 \pm 0.735 ^b	18.62 \pm 0.748 ^b	70.61 \pm 0.289 ^a
T1	4.10 \pm 0.086 ^a	8.73 \pm 0.887 ^a	22.66 \pm 1.728 ^a	64.49 \pm 2.094 ^b
T2	4.15 \pm 0.030 ^a	7.67 \pm 1.148 ^{a,b}	23.38 \pm 0.911 ^a	64.77 \pm 2.397 ^b

Distinta literal en la misma columna indica diferencias significativas.

La información obtenida en esta parte de la investigación es de gran valor, ya que existen pocos datos que describen la composición proximal del micelio de shiitake en cultivo sumergido. En estudios recientes se ha propuesto un proceso biotecnológico en el que se obtiene micelio de *L. edodes* enriquecido en vitamina B₁₂, en dicha investigación se sugiere que este producto puede ser consumido por personas con deficiencias en la ingesta de esta vitamina (Turlo *et al.*, 2008). En términos generales se conoce que *L. edodes* es rico en proteínas y carbohidratos, además es bajo en grasa (Chang y Miles, 2004), no obstante es necesario resaltar que existe un vacío de información al respecto. *L. edodes* es el segundo hongo comestible cultivado a nivel mundial, además el micelio de este hongo es consumido como suplemento alimenticio (Wasser, 2005).

Color y morfología

Con la aplicación de los extractos de madera de vid, el medio de cultivo se tornó turbio y conforme transcurrió el tiempo de la fermentación el medio se fue clarificando. En T1 y T2 la biomasa se desarrolló de color marrón claro, mientras que en el tratamiento control se observó un micelio de color blanquecino. Ya se ha reportado la clarificación de un medio de cultivo rico

en compuestos fenólicos mediante el cultivo de *L. edodes*. También se ha observado el desarrollo de un micelio de color marrón claro, producto de la incorporación de estos fenoles en la biomasa (D'Anibale *et al.*, 2004; Lakhtar *et al.*, 2010).

En los procesos de fermentación la morfología del micelio es un factor importante. En la Figura 8 se muestra la morfología y color del micelio producido. El tratamiento control y T1 generaron una morfología de agregados pequeños y de forma esférica, mientras que T2 generó micelio disperso y filamentoso. Feng *et al.* (2010) mencionan que en hongos filamentosos, una morfología de pequeños filamentos dispersos en el medio de cultivo es lo más deseable en procesos de producción a gran escala, ya que este comportamiento origina un crecimiento similar al exponencial.



Figura 8. Morfología y color del micelio producido. A: Control, B: T1 y C: T2.

Obtención y caracterización de lentinan

Rendimiento del extracto, carbohidratos totales y nitrógeno

Los resultados del rendimiento de la extracción (RE), carbohidratos totales (CT) y porcentaje de nitrógeno (N) en el extracto se presentan en la Tabla 7. El rendimiento del extracto osciló de 3.6-4.1%, sin diferencias significativas ($p>0.05$) entre los grupos. Estos valores superan los reportados por Yap y Ng (2001), quienes registran un rendimiento de 3.2% utilizando basidiomas como materia prima. Ruiz-Esparza (2005) reporta rendimientos de 3.9% para

cuerpo fructífero y 1% en micelio de *L. edodes* con el método de aislamiento propuesto por Yap y Ng (2001), el mismo protocolo utilizado en este estudio. Los valores de carbohidratos totales entre Control, T1 y T2 fueron similares (87.4-90.6%) y sin diferencias significativas ($p>0.05$). Tanto el rendimiento del extracto como los carbohidratos totales del mismo resultaron ser iguales entre los tratamientos, lo cual indicaría que parte de la hipótesis no se cumple. La falta de diferencias en el rendimiento de los extractos puede deberse a la excesiva manipulación realizada en los pasos de lavados con etanol al momento de la obtención de los mismos. Mientras que la falta de diferencias en carbohidratos totales puede atribuirse a la fisiología misma del hongo, es decir, que produzca siempre la misma proporción de polisacáridos en esa fracción extraída. Además de los parámetros mencionados anteriormente, la proporción de glucosa en los extractos influye en la hipótesis planteada, una discusión al respecto se incluye en el apartado de rendimiento neto.

Existen reportes de 51-97% de carbohidratos totales en muestras de *Lentinan* obtenido mediante distintos métodos y con diferente fuente para su obtención (micelio y basidiomas) (Ruiz-Esparza, 2005). Con respecto al porcentaje de nitrógeno, T1 y T2 exhibieron los valores más altos (2.16 y 1.71% respectivamente). Existen autores que utilizan el mismo factor de conversión empleado en cuerpo fructífero ($N \times 4.5$ o 4.38) para calcular proteína. En este estudio sólo se reportó el porcentaje de nitrógeno, ya que al momento de la extracción la relación de proteínas/quitina (moléculas con nitrógeno) que se obtienen de la matriz es incierta, y utilizar el mismo factor de conversión es causa de controversia.

Tabla 7. Rendimiento, carbohidratos totales y nitrógeno de los productos. Los valores son los promedios \pm la desviación estándar de 3 repeticiones.

Tratamientos	RE (%)	CT (%)	N (%)
Control	3.65 \pm 0.55 ^a	90.63 \pm 5.75 ^a	0.97 \pm 0.36 ^b
T1	3.60 \pm 0.47 ^a	88.14 \pm 4.69 ^a	2.16 \pm 0.47 ^a
T2	4.17 \pm 0.78 ^a	87.45 \pm 3.98 ^a	1.71 \pm 0.40 ^{a,b}

Distinta literal en la misma columna expresa diferencias significativas ($p < 0.05$).

Los polisacáridos extraídos, al igual que el micelio de donde se obtuvieron presentan diferencias de color (Figura 9). Los glucanos extraídos de Control presentan una coloración blanquecina, mientras que los obtenidos de T1 y T2 una coloración marrón. Existen reportes de la obtención de ligninas de extractos acuosos de *L. edodes* (Kojima *et al.*, 2010), además de los mencionados anteriormente, los cuales tratan de la incorporación de compuestos fenólicos a la biomasa. Esto puede explicar el comportamiento de pigmentación.



Figura 9. Coloración del lentinan extraído. Control (derecha), T1 (centro) y T2 (izquierda).

Composición de monómeros

En la Tabla 8 se exhibe la composición de monómeros de los polisacáridos obtenidos de Control, T1 y T2. El Control mostró una relación molar cercana a 1:1 (glucosa/xilosa), dicho grupo presentó el valor más bajo de glucosa (49%), significativamente menor ($p < 0.05$) que T1 y T2, mismos que exhibieron valores de 64.5 y 68% respectivamente. El contenido de ribosa en todos los grupos fue bajo (0.39-2.35%). Tomati *et al.* (2004), reportan a lentinan y xilano en una fracción del micelio de shiitake cultivado en medio líquido suplementado con aguas residuales del procesamiento de la aceituna. Lo cual indica que estas moléculas están estrechamente relacionadas en la pared celular en micelio de este basidiomiceto. En la Figura 10 se muestran los cromatogramas obtenidos de Control, T1 y T2, en los cuales se pueden apreciar claramente las tendencias mencionadas anteriormente.

Tabla 8. Composición de monómeros del lentinan extraído del Control, T1 y T2. Los valores son los promedios \pm las desviaciones estándar de tres repeticiones.

Tratamientos	Glucosa (%)	Xilosa (%)	Ribosa (%)
Control	49.04 \pm 7.27 ^b	49.9 \pm 7.38 ^b	1.17 \pm 0.24 ^b
T1	64.57 \pm 1.41 ^a	33.66 \pm 0.79 ^a	2.35 \pm 0.20 ^a
T2	68.02 \pm 0.40 ^a	31.5 \pm 0.35 ^a	0.39 \pm 0.03 ^c

Distinta literal en la misma columna indica diferencias significativas.

Las diferencias encontradas con respecto al contenido de glucosa en los extractos, puede deberse a la inducción de la actividad de la GS. Reverberi *et al.* (2004), reportan un incremento de hasta 4 veces en la actividad de esta enzima mediante la suplementación al medio de cultivo con OMW, y 7 veces mayor mediante una suplementación con 7.5 mg/ml de un extracto fenólico obtenido de las OMW, además observaron un aumento en la actividad de catalasa y superóxido dismutasa. Anteriormente se mencionó

que tanto las OMW como los extractos de madera de vid son ricos en compuesto fenólicos, lo cual indica que el estrés oxidativo causado por éstos y por su degradación, activa el mecanismo del complejo enzimático GS. La cantidad de fenoles totales adicionados en el presente estudio al medio de cultivo en los tratamientos fue similar, no obstante pueden existir otros componentes en los extractos que afecten la actividad de la GS, y de otras enzimas como la quitina sintasa, lo cual puede afectar la cantidad de glucanos durante la extracción.

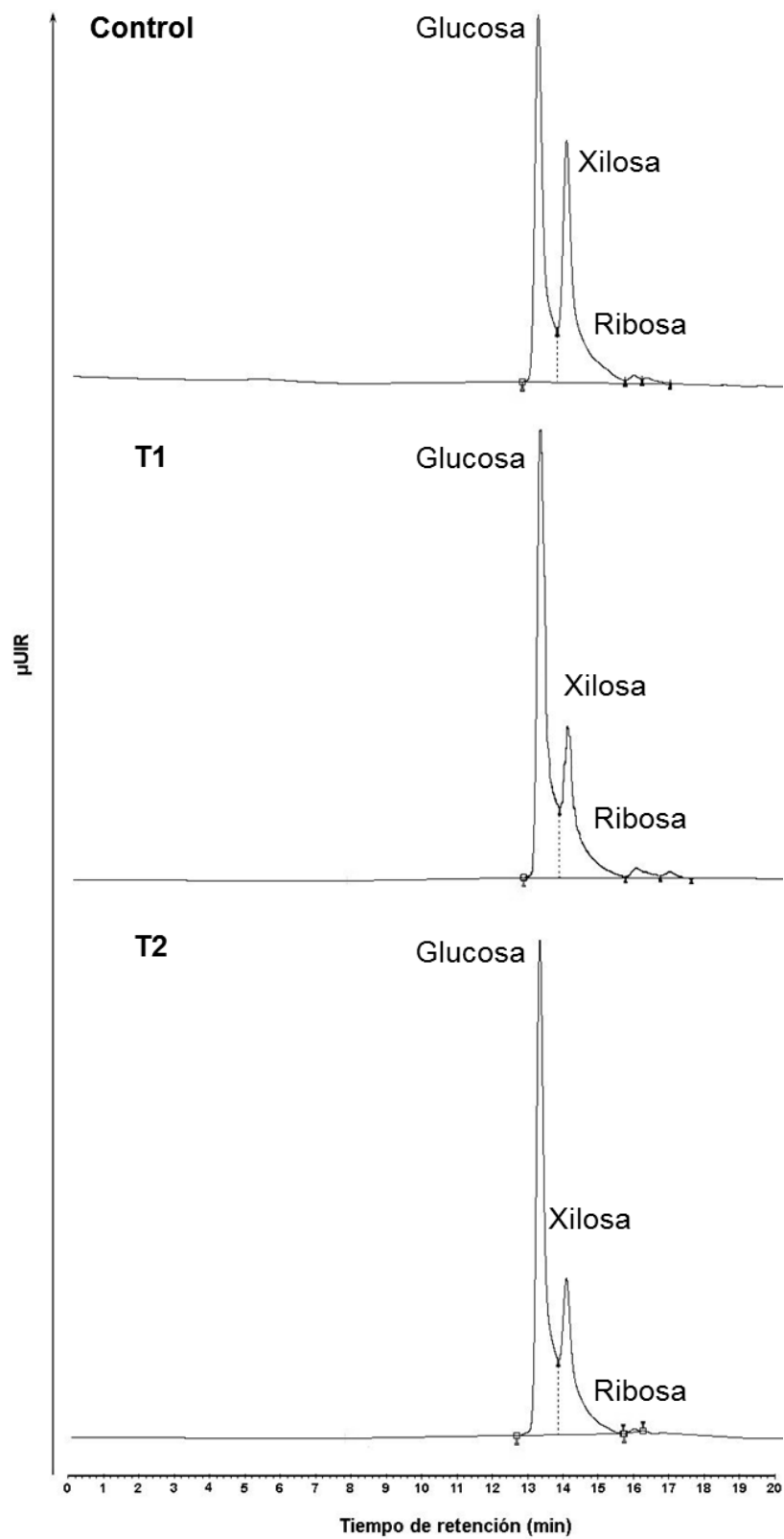


Figura 10. Cromatogramas con composición de monosacáridos del lentinan extraído de Control, T1 y T2.

Rendimiento neto de lentinan

El rendimiento de recuperación neto de los glucanos involucra el rendimiento del extracto, los carbohidratos totales en el extracto y la cantidad de glucosa de los mismos. En la Figura 11 se muestra el rendimiento neto de glucanos extraídos del Control, T1 y T2. Se observa que T2 registró el valor más alto (2.47%), exhibiendo diferencias con el Control (1.59%), mientras que T1 fue igual ($p>0.05$) a los demás (2.04%). El rendimiento neto de glucanos se calculó de la siguiente manera: Si el rendimiento de uno de los extractos (RE) fue de 3.65%, los carbohidratos totales (CT) del mismo fue de 88.4% y el contenido de glucosa de 54.9%; entonces se multiplica $3.65 \times 0.884 \times 0.549 = 1.77\%$ de glucanos netos. Se realizó este ejercicio debido a la gran manipulación al momento de realizar la extracción, tal como se menciona en el apartado de rendimiento del extracto, carbohidratos totales y nitrógeno. Es importante señalar que parte de lo que se detectó como glucosa puede tratarse de glucosas o N-acetil-glucosamina libres. Es necesario realizar caracterizaciones más completas para asegurarse de que las glucosas detectadas solo pertenecen a lentinan.

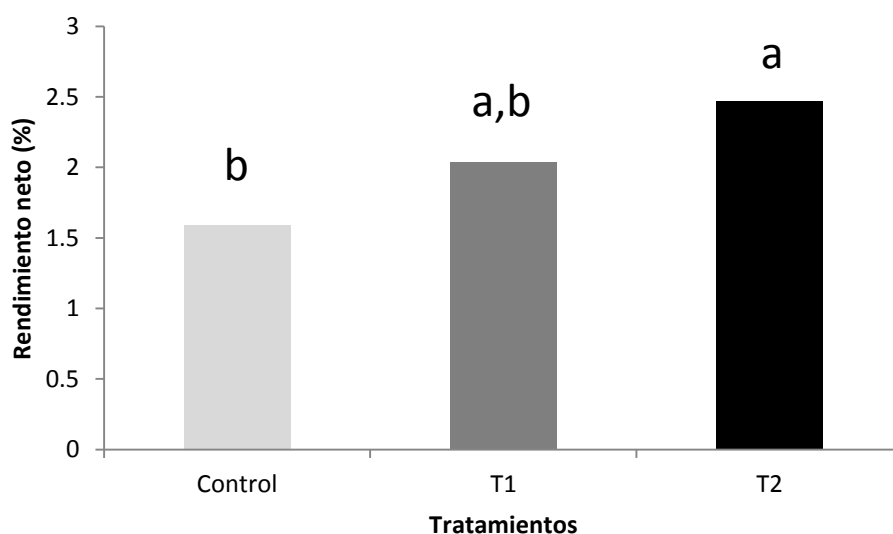


Figura 11. Rendimiento neto de lentinan de Control, T1 y T2.

Identificación de lentinan (FT-IR)

La espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier es una técnica sencilla y rápida que permite la identificación de moléculas. En la Figura 12 se muestran los espectros de infrarrojo del Control, T1 y T2. En los espectros pueden apreciarse bandas comunes a todos los polisacáridos. La banda a ca. 3400 cm^{-1} corresponde a la vibración del enlace O-H, mientras que la banda ubicada ca. 2900 cm^{-1} es la que originan los grupos C-H. A 1655 cm^{-1} se localiza la banda correspondiente a la amida I (Argüelles *et al.*, 2004), lo cual indica que en Control, así como en T1 y T2 existe quitina o proteína residual. Es conocido que la quitina forma un complejo estable con los glucanos (Latgé y Calderone, 2006), por lo cual es comprensible que en la extracción se obtengan cantidades bajas de quitina. El método de aislamiento utilizado en el presente estudio para la obtención de lentinan (Yap y Ng, 2001), emplea un paso en el cual se conserva una fracción soluble en agua para la extracción del glucano, por lo tanto la cantidad de quitina que se extrae con este debe ser mínima. En los tres espectros existe una banda ubicada a ca. 1540 cm^{-1} , en T1 y T2 dicha banda se vuelve más evidente. Esta banda esta asociada con la amida II, lo cual también puede ser evidencia de la presencia de quitina o proteína en esos tratamientos. Lo anterior es congruente con los resultados obtenidos de nitrógeno en los productos, ya que T1 y T2 muestran los valores más altos.

Es necesario mencionar que entre los $1000\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$, se visualizan varias bandas de las cuales las localizadas en ca. 1080 y 1020 cm^{-1} son asignadas a estiramientos C-O y deformaciones C-H del anillo de piranosa (Ruiz-Esparza, 2005). En la región de ca. 1240 cm^{-1} se observa una banda en T1 y T2, siendo menos evidente en Control. En los tres tratamientos es notable una banda localizada a ca. 930 cm^{-1} , también se puede observar la presencia de una banda a ca. 890 cm^{-1} , la cual es más notoria en Control. Bandas en esa región se han asignado a C1-H del anillo de piranosa. Es importante mencionar que la banda a 890 cm^{-1} es característica de β -D-glucanos (lentinan) (Wang y Zhang, 2009).

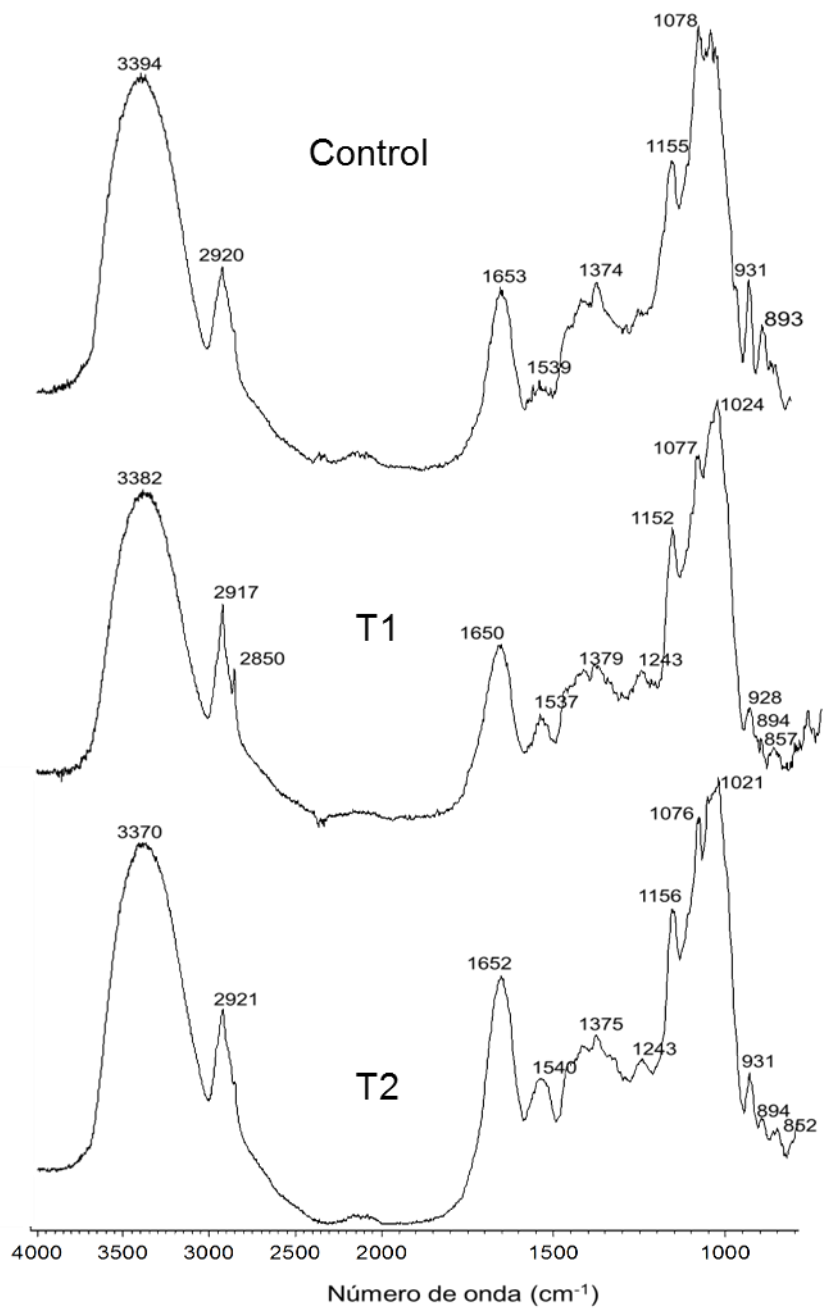


Figura 12. Espectros de infrarrojo en modo de transmisión del lentinan extraído de Control, T1 y T2.

CONCLUSIONES

La suplementación con extractos de madera de vid utilizando el medio GP incrementó significativamente ($p < 0.05$) (ca. el doble con respecto al control) la producción de biomasa en la cepa IE105 de *L. edodes*. Además, una suplementación con extractos de madera de vid utilizando tanto el medio de Lomberh como el medio GP produjo una cantidad de biomasa alta, aún suplementando sólo con los extractos polares (acuoso y etanólico).

La suplementación con los extractos permitió una cinética de crecimiento predecible por el modelo logístico, lo cual es importante para la producción de shiitake a escala industrial.

Con la suplementación de los extractos al medio de cultivo, se obtienen extracciones con mayor cantidad de glucosa, lo cual puede ser indicador de la potenciación de la actividad del complejo enzimático β -glucano sintasa.

PERSPECTIVAS

Este estudio aborda dos grandes retos a vencer con respecto al cultivo sumergido de *L. edodes*, por un lado el incremento de producción de biomasa y por otro la producción de lentinan. Para futuros estudios en esta misma línea de investigación se recomienda trabajar con las enzimas que conforman el complejo GS. Así como la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y el gen FKS (gen que codifica para la sub unidad catalítica del complejo GS), para tener un panorama más amplio y responder preguntas a profundidad, con respecto a los extractos de madera de vid. También se recomienda realizar pruebas de capacidad antioxidante tanto del micelio como de los polisacáridos extraídos, sobre todo de los tratamientos T1 y T2, los cuales parecen ser ricos en compuestos fenólicos. Asimismo realizar un estudio acerca de la bioactividad de los compuestos excretados al medio de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- AOAC. 1990. Crude protein in meat and meat products including pet foods. Combustión method 990.03.
- AOAC. 2000. Determinación de cenizas (550°C) Método 942.05.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist, 15th edn. AOAC International, Arlington.
- Argüelles, W., Heras, A., Acosta, N., Galed, G., Gallardo, A., Miralles, B., Peniche, C., San Roman, J. 2004. Caracterización de quitina y quitosano. En: Ana Pastor de Abram (Ed.), Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Pontificia Universidad Católica del Perú/Fondo editorial. Perú.
- Beltrán-García, M.J.; Orozco, A; Samayoa, I.; Ogura, T. (2001). Lignin degradation products from corn stalks enhance notably the radial growth of basidiomycete mushroom mycelia. *Revista de la Sociedad Química de México* 45 (2), 77-81.
- BeMiller, J. 2008. Polysaccharides: Occurrence, Significance, and Properties. En: B. O. Fraser-Reid, K. Tatsuta and J. Thiem, (Ed.), *Glycoscience*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 1413-1435.
- Cabrera-Ruiz, R. 2010. Efecto de la poda de vid sobre los parámetros de crecimiento y producción de enzimas ligninolíticas de *Lentinula edodes*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Çağlarırmak, 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.
- Campbell, A. y Racjan, M. 1999. The comercial explotation of the white rot fungus *Lentinula edodes* (shitake). *International Biodeterioration & Biodegradation* 43, 101-107.
- Chang, S. y Miles, P. 2004. Mushrooms. Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environment Impact, 2da ed. CRC Press. Florida.

- Chen, J., Seviour, R. 2007. Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans. *Mycological Research* III, 635-652.
- Chen, W. 2005. Shiitake Bag Cultivation. En: *Mushroom Growers, Handbook 2*. Mushroom World, Seoul, Corea, pp. 73-87.
- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y., Fukuoka F. 1970. Fractionation and Purification of the Polysaccharides whit Marked Antitumor Activity, Especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an Edible Mushroom). *Cancer Research* 30, 2776-2781
- Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, G., Sasaki, T., Fukuoka, F. 1969. Inhibition of Mouse Sarcoma 180 by Polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature* 222, 687-688.
- D'Annibale, A.; Casa, R.; Pieruccetti, F.; Ricci, M.; Marabottini, R. (2004). *Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere* 54, 887-894.
- Deacon, J. 2006. *Fungal Biology*, 4ta ed. Blackwel Publishing. Inglaterra.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamiltosn, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytic Chemistry*. 26. 350-356.
- Elisashvili, V., Penninck, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metrveli, E., Kharziani, T., Kvesitadze, G. 2008. *Lentinus edodes* and *Pelurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technology* 99, 457-462.
- Feofilova, E. 2010. The Fungal Cell Wall: Modern Concepts of Its Composition and Biological Function. *Microbiology* 79 (6), 711-720.
- Feng, Y.-L., Li, W.-Q., Wu, X.-Q., Cheng, J.-W., Ma, S.-Y. 2010. Statistical optimization of media for mycelial growth and exo-polysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies. *Biochemical Engineering Journal* 49, 104-112.
- Gaitán-Hernández, R., Esqueda, M., Gutiérrez, A., Sánchez, A., Beltrán-García, M., Mata G. 2006. Bioconversion of agrowastes by *Lentinula*

- edodes*: the high potencial of viticulture residues. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71, 432-439.
- Gaitán-Hernández, R. y Mata, G. 2004. Cultivation of the edible Mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) in Pasteurized Wheat Straw – Alternative use of Geothermal energy in México. *Engineering Life Science* 45 (3), 230-237.
- Guo, Z., Hu, Y., Wang, D., Ma, X., Zhao, X., Zhao, B. 2008. Sulfated modification can enhance the adjuvancity of lentinan and improve the immune effect of ND vaccine. *Vaccine* 27, 660-665.
- Harris-Valle, C., Esqueda, M., Sánchez, A, Beltrán-García, M., Valenzuela-Zoto, E. 2007. Polar vineyard pruning extracts increase the activity of the main lignolytic enzymes in *Lentinula edodes* cultures. *Canadian Journal of Microbiology* 53, 1150-1157.
- Hatvani, N. 2001. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17, 71-74.
- Hearts, R., Nelson, D., McCollum, G., Millar, B., Maeda, Y., Goldsmith, C., Rooney, P., Loughrey, A., Rao, J., Moore, J. 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.
- Herrera, T. y Ulloa M. 1998. El reino de los hongos *Micología básica y aplicada*. 2da ed. Fondo de cultura económica. México D. F.
- Hintze, J., 2007. NCSS 2007. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA.
- Index fungorum org. (<http://www.indexfungorum.org/names/names.asp> Autor: Kirk, P. Fecha de acceso: 01/05/11).
- Israilides, C., Kletsas, D., Arapoglou, D., Philippoussis, A., Pratsinis, H., Ebringerova, A., Hříbalová, V., Harding, S. E. 2008. *In vitro* cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. *Phytomedicine* 15, 512-519.
- Jiao, Y., Chen, Q., Zhou, J., Zhang, H., Chen, H. 2008. Improvement of exopolysaccharides production and modeling kinetics by *Armillaria luteo-*

- virens* Sacc. in submerged cultivation. Food Science and Technology. 41, 1694-1700.
- Kirk, T. K., Connors, W. J., Zeikus, G. 1976. Requiriments for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi. Applied Environmental Microbiology. 32, 192-194.
- Kitzberger, C., Smânia, A., Pedroza, 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.
- Kojima, H.; Akaki, J.; Nakajima, S.; Kamei, K.; Tamesada, M. (2010). Structural analysis of glicogen-like polysaccharides having macrophage-activating activity in extracts of *Lentinula edodes* mycelia. Journal of Natural Medicine 64, 16-23.
- Kumari, M., Survase, S., Singhal, R. 2008. Production of schizophyllan using *Schizophyllum commune* NRCM. Bioresource Technology. 99, 1036-1043.
- Kupfahl, C., Geginat, G., Hof, H. 2006. Lentinan has a stimulatory effect on innate and adaptive immunity against murine *Listeria monocytogenes* infection. International Immunopharmacology 6, 686-696.
- Lakhtar, H.; Ismaili-Alaoui, M.; Philippoussis, A.; Perraud-Gaime, I.; Roussos, S. (2010). Screening of strains of *Lentinula edodes* grown on model olive mill wastewater in solid and liquid state culture for polyphenol biodegradation. International Biodeterioration and Biodegradation 64, 167-172.
- Latgé, J., Calderone, R. 2006. The Fungal Cell Wall. En: Kües/Fisher (Ed.), The Mycota I, Groth, Differentitation and Sexuality. Springer-Verlarg Berlin, Heidelberg, pp 73-104.
- Lin, E.-S. y Sung, S.-C. 2006. Cultivating conditions influence exopolisaccharide production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. International Journal of Food Microbiology 108, 182-187

- Lomberh, M. L. Solomko, E. F., Buchalo, A. S., Kirchhoff, B. 2002 Studies of medicinal mushrooms in submerged cultures, en: Mushroom biology and Mushroom Products. UAEM. 367-377.
- Lull, C., Wichers, H., Savelkoul, H. 2005. Antiinflammatory and Immunomodulating Properties of Fungal Metabolites. Mediators of Inflammation 2, 63-80.
- Özçelik, E. y Pekşen, A. 2007. Hazelnut husk as a substrate for the cultivation of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*). Bioresource Technology 98, 2652-2658.
- Papaspyridi, L.-M., Katapodis, P., Gonou-Zagou, Z., Kapsanaki-Gotsi, E., Christakopoulos, P. 2010. Optimization of biomass production with enhance glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. Biochemical Engineering Journal 50, 131-138.
- Pereira-Martins, I. M. 2009. Análisis funcional de las proteínas Bgs, subunidades catalíticas de la $\beta(1,3)$ glucan sintasa de *Schizosaccharomyces pombe*. Tesis de Doctorado. Universidad de Salamanca, Dpto. de Microbiología y Genética. Instituto de Microbiología Bioquímica USAL/CSIC. Salamanca, España.
- Rao, J., Millar, B., Moore, J. 2009. Antimicrobial properties of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*). International Journal of Antimicrobial Agents 33, 591-592.
- Reverberi, M., Di Mario, F., Tomati, U. 2004. β -Glucan synthase induction in mushrooms grown on olive mil wastewaters. Applied Microbiology and Biotechnology. 66, 217-225.
- Royse, D. y Sanchez, J. 2007. Ground wheat straw as a substitute for portions of oak wood chips used in shiitake (*Lentinula edodes*) substrate formulae. Bioresource Technology 98, 2137-2141.
- Ruiz-Esparza, S. 2005. Caracterización fisicoquímica y actividad biológica de polisacáridos extraídos de micelio y cuerpo fructífero del hongo *Lentinula edodes*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.

- SAGARPA, SIAP: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=305 Fecha de acceso: 01/05/11. Fecha de actualización: 2010.
- Sánchez, J., y Royse, D. 2002. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Limusa/Noriega Editores. México, D.F.
- Sasaki, T., & Takasuka, N. (1976). Further study of the structure of lentinan, an antitumor polysaccharide from *Lentinus edodes*. Carbohydrate Research 47, 99-104.
- Shimada, S., Komamura, K., Kumagai, H., Sakurai, H. 2004. Inhibitory activity of shiitake flavor against platelet aggregation. BioFactors 22, 177-179.
- Stamets, P. 2000. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. 3ra ed. Ten Speed Press. Berkeley, Toronto.
- Stamets, P. y Chilton, J. 1983. The Mushroom Cultivator. 1ra ed. Agarikon Press. Olympia, Washington.
- Sugui, M., Alves de Lima, P., Delmanto, R., da Eira, A., Salvadori, D., Ribeiro, L. 2003. Antimutagenic effect of *Lentinula edodes* (BERK.) Pegler mushroom and possible variation among lineages. Food and Chemical Toxicology 41, 555-560.
- Tang, Y.-J., Zhang, W., Zhong, J.-J. 2009. Performance analyses of a pH-shift and DOT-shift integrated fed-batch fermentation process for the production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. Bioresource Technology 100, 1852-1859.
- Tomati, U., Belardinelli, M., Galli, E., Iori, V., Capitani, D., Mannina, L., Viel, S., Segre, A. 2004. NMR characterization of the polysaccharidic fraction from *Lentinula edodes* grown on olive mill waste waters. Carbohydrate Research. 339, 1129-1134.
- Turlo, J., Gutkowska, B., Herold, F. 2010. Effect of selenium enrichment on antioxidant activities and chemical composition of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. mycelial extracts. Food and Chemical Toxicology 48, 1085-1091.

- Turlo, J., Gutkowska, B., Herold, F., Krzyczkowski, W., Błażewicz, Kocjan, R. 2008. Optimizing vitamin B₁₂ biosynthesis by mycelial cultures of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. *Enzyme and Microbial Technology* 43, 369-374.
- Viniegra-Gonzalez, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Romero-Gomez, S.J., Díaz-Godínez, G., Augur, C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* 13, 157-167.
- Wang, X., Xu, X., Zhang, L. 2008. Thermally Induced Conformation Transition of Triple-Helical Lentinan in NaCl Aqueous Solution. *Journal of Physical Chemistry* 112, 10343-10351.
- Wang, X., Zhang, L. 2009. Physicochemical properties and antitumor activities for sulfated derivatives of lentinan. *Carbohydrate Research* 344, 2209-2216.
- Wasser, S. 2005. Shiitake (*Lentinus edodes*). En: *Encyclopedia of Dietary Supplements*. Marcel Dekker, Inc. New York. U.S. pp. 653-664.
- Xu, P., Ding, Z.-Y., Qian, Z, Zhao, C.-X., Zhang, K.-C. 2008. Improved production of micelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. *Enzyme and Microbial Technology* 42, 325-331.
- Yap, A.-T. y Ng, M.-L. 2001. An Improved Method for the Isolation of Lentinan from the Edible and Medicinal Shiitake Mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 3, 9-19.
- Zhang, Y., Li, S., Wang, X., Zhang, L., Cheung, P. 2011. Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocolloids* 25, 196-206.
- Zhu, L.-W., Zhong, J.-J., Tang, T.-J. 2008. Significance of fungal elicitors on the production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by the submerged culture of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry* 43, 1359-1370.

APÉNDICE

Apéndice 1. Preparación de medios de cultivo

Medio GP

10 g/L de peptona y 40 g/L de glucosa.

Medio de Kirk 1

2 g/L de KH_2PO_4 , 0.5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L de CaCl_2 , 2 g/L de NH_4NO_3 y 40 g/L de carboximetilcelulosa (CMC).

Medio de Kirk 2

Los mismos componentes y las mismas concentraciones que en Kirk 1, exceptuando la fuente de carbono (CMC) la cual fue sustituida por glicerol (40 g/L)

Medio de Lomberh

40 g/L de glucosa, 3 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L de KH_2PO_4 , 1 g/L de K_2HPO_4 , 2 g/L de peptona, 2 g/L de extracto de levadura y 10 mL de solución traza, la cual se prepara con: 0.4 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L de ZnCl_2 , 0.8 g/L de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.1 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.