

Cinética de crecimiento y composición química del micelio de *Lentinula edodes* cultivado en medio líquido suplementado con extractos de madera de vid

Damian López-Peña, Aldo Gutiérrez, Martín Esqueda

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apartado postal 1735, 83000 Hermosillo, Sonora, México

Growth kinetics and chemical composition of *Lentinula edodes* mycelia produced in liquid medium supplemented with vineyard pruning extracts

Abstract. The aim of this study was to evaluate the biomass production, the kinetic growth parameters and the chemical composition of *Lentinula edodes* mycelia produced in submerged cultures supplemented with vineyard pruning extracts (aqueous, ethanol, chloroform and toluene). Strains IE-105 and IE-245 of *L. edodes* and three basic culture media were evaluated for the biomass production. The combination with higher production was chosen as control and used for the design of two treatments (T1: supplemented with four extracts, and T2: supplemented with aqueous and ethanol extracts). Biomass production was not significantly different ($P > 0.05$) among treatments after 21 days of fermentation process. The maximum biomass production predicted by the logistic model was observed in T2 (16.57 g L^{-1}), and the lowest in the control (10.78 g L^{-1}). The μ_m for the control, T1 and T2 were 0.052, 0.146, and 0.133 days^{-1} , respectively. The lower R^2 was found in the control (0.86) and the higher in T2 (0.94). Differences were found ($P < 0.05$) in the content of crude fat between control and T1, and in the amount of protein and total carbohydrates between treatments (T1 y T2) and control.

Keywords: shiitake, submerged culture, biomass production, proximal composition.

Resumen. En este estudio se evaluó la producción de biomasa, la cinética de crecimiento y la composición química del micelio de *Lentinula edodes* obtenido en cultivo sumergido con suplementación de extractos de madera de vid. Se evaluaron las cepas IE-245 e IE-105 de *L. edodes* y tres medios de cultivo base para la producción de biomasa. La combinación con mayor producción se eligió como control y base para formular dos tratamientos (T1: suplementado con los cuatro extractos y T2: suplementado con los extractos acuoso y etanólico). La producción de biomasa no varió significativamente entre los tratamientos ($P > 0.05$), después de 21 días de cultivo. La máxima producción de biomasa predicha por el modelo logístico se observó en T2 (16.57 g L^{-1}) y la mínima en el control (10.78 g L^{-1}). Las μ_m para el control, T1 y T2 fueron 0.052, 0.146 y 0.133 días^{-1} , respectivamente. El control presentó la R^2 más baja (0.86), mientras que T2 la más alta (0.94). Se encontraron diferencias ($P < 0.05$) entre el control y T1 en contenido de grasa cruda, así como entre el control y los tratamientos (T1 y T2) en los valores de proteínas y carbohidratos totales.

Palabras clave: shiitake, cultivo sumergido, producción de biomasa, composición proximal.

Received 14 August 2012; accepted 29 March 2013.

Recibido 14 de agosto 2012; aceptado 29 de marzo 2013.

Autor para correspondencia: Martín Esqueda
esqueda@ciad.mx

Introducción

Lentinula edodes (Berk.) Pegler “shiitake” es un hongo comestible y medicinal reconocido por su perfil nutrimental. Representa un buen aporte de fibra (Stamets, 2000), carbohidratos, proteínas (Wasser, 2005), vitaminas y minerales (Çağlarimak, 2007). Además se le atribuyen distintas propiedades medicinales como la anticancerígena, inmunomoduladora (Yap y Ng, 2001), antibacteriana (Hearst *et al.*, 2009) y antifúngica (Kitzberger *et al.*, 2007). De *L. edodes* se obtienen distintos metabolitos con actividad biológica, los cuales son cada vez más aceptados.

Entre los productos con actividad inmunomoduladora obtenidos de este basidiomiceto destaca el lentinan, un β -(1-3)-D-glucano ramificado que forma parte de la pared celular (Murata *et al.*, 2002); LEM, un complejo activo compuesto principalmente de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos (Kojima *et al.*, 2010); y AHCC, una preparación que contiene polisacáridos, minerales y aminoácidos (Aviles *et al.*, 2008); todos presentes en el micelio. La derrama económica generada a escala mundial por suplementos alimenticios, a base de micelio y fructificaciones de hongos medicinales se estima en 5-6 billones de dólares anuales (Lull *et al.*, 2005).

Debido a sus características *L. edodes* es el segundo hongo comestible cultivado a nivel mundial (Kitzberger *et al.*, 2007). La mayor parte de la producción mundial se obtiene utilizando formulaciones sintéticas con base en viruta de encino suplementada (Chang y Miles, 2004). No obstante, debido a la inaccesibilidad del encino en algunas áreas y al riesgo ecológico que representa su aprovechamiento, en las últimas décadas se ha buscado sustratos alternativos que generen rendimientos altos y productos de buena calidad (Gaitán-Hernández y Mata, 2004; Özçelik, y Pekşen, 2007; Philippoussis *et al.*, 2007). Entre los sustratos no

convencionales evaluados destaca la madera proveniente de la poda de la vid, ya que genera eficiencias biológicas cercanas al 100% en periodos cortos de producción (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006). En México se cultivaron ca. 28,000 ha con vid en el 2011, de las cuales se obtuvo una producción de ca. 281,000 t de uva (SAGARPA, 2011). Esta actividad genera más de 250,000 t de desechos lignocelulósicos anualmente, derivados de la poda de la vid (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006).

Recientemente la técnica de cultivo sumergido de hongos medicinales ha tomado gran relevancia, ya que permite dirigir los cultivos hacia la obtención de productos de interés, los tiempos de producción son cortos y se produce una cantidad alta de biomasa en un espacio reducido (Feng *et al.*, 2010). Uno de los principales retos del cultivo sumergido de *L. edodes* son los bajos rendimientos. Algunos estudios se han enfocado en la obtención de productos de *L. edodes* por fermentación líquida, logrando rendimientos de 6-12.5 g L⁻¹ de biomasa mediante distintos procedimientos biotecnológicos (Feng *et al.*, 2010; Turlo *et al.*, 2008; Tomati *et al.*, 2004). El crecimiento radial de *L. edodes* se incrementó con la suplementación del medio con extractos polares de tallos de maíz (Beltrán-García *et al.*, 2002). Asimismo, la producción de distintas enzimas oxidativas y biomasa de *L. edodes* aumentaron, complementando el medio de glucosa-peptona con una combinación de extractos acuoso, etanólico, toluénico y clorofórmico de madera de vid (Harris-Valle *et al.*, 2007).

Debido al riesgo del cloroformo y tolueno en la elaboración de nutracéuticos, el objetivo de este trabajo fue evaluar si únicamente la suplementación con extractos polares (acuoso y etanólico) de madera de vid potencian la generación de biomasa de *L. edodes* en cultivo sumergido.

Materiales y métodos

Cepas, medios y condiciones de cultivo

Se trabajó con las cepas IE-105 e IE-245 de *L. edodes*, depositadas en la colección de cepas del Instituto de Ecología (INECOL) Xalapa, Veracruz. Se evaluaron tres medios de cultivo base: 1) Medio de Glucosa-Peptona (GP), el cual se preparó con 40 g L⁻¹ de glucosa y 10 g L⁻¹ de peptona. 2) Medio de Lomberh *et al.* (2002) modificado (L), con 40 g L⁻¹ de glucosa, 3 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0.5 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O, 1 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 1 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 2 g L⁻¹ de peptona, 2 g L⁻¹ de extracto de levadura y 10 mL L⁻¹ de solución traza, la cual se preparó con: 0.4 g L⁻¹ MnCl₂·4H₂O, 0.2 g L⁻¹ de ZnCl₂, 0.8 g L⁻¹ de FeCl₃·6H₂O y 0.1 g L⁻¹ de CuSO₄·5H₂O. 3) Medio de Kirk *et al.* (1976) modificado (K), 2 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0.5 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O, 0.1 g L⁻¹ de CaCl₂, 2 g L⁻¹ de NH₄NO₃ y 40.9 g L⁻¹ de glicerina.

En las fases experimentales se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 mL, con 50 mL de medio de cultivo. Cada uno se inoculó con dos discos de 1 cm de diámetro de agar colonizado con micelio de *L. edodes*. La producción de biomasa para el análisis proximal se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de medio de cultivo. Los matraces se inocularon con 8 discos de 1 cm 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 con oscuridad, a 120 rpm y 25 °C por 21 días.

Obtención de extractos de madera de vid

Los extractos se obtuvieron con base en el protocolo de Harris-Valle *et al.* (2007). Se utilizó madera de poda de *Vitis vinifera* var. superior de un mismo lote de producción, proveniente de La Costa de Hermosillo, Sonora. La madera se molió en un molino eléctrico a un tamaño de partícula de 1-2

mm. Los extractos se obtuvieron de ca. 120 g de madera de vid, utilizando un equipo soxhlet con los distintos solventes: Tolueno (ET), cloroformo (EC), etanol (EE) y agua (EA) de manera individual en reflujo constante por ca. 3 h y de forma consecutiva, siguiendo el orden de menor a mayor polaridad. Posteriormente, se concentraron utilizando un rotavapor y finalmente se secaron con flujos de aire, a excepción del extracto acuoso que se liofilizó.

Evaluación de los extractos

Partiendo de una concentración de los extractos de madera de vid previamente registrada por Harris-Valle *et al.* (2007), se realizaron distintos experimentos en donde se aplicó un gradiente de concentraciones de extractos al medio de cultivo (datos no mostrados). 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. Los valores de biomasa se registran en base seca.

Selección de la cepa y medio de cultivo base

En esta etapa se evaluó la interacción de los tres medios base con 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 sólo del medio base sin la aplicación de extractos. De estos tratamientos se determinaron los parámetros de una cinética de crecimiento y la composición proximal de dicha biomasa.

Determinación de la cinética de crecimiento

De los tratamientos seleccionados 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. Posteriormente, se llevó a peso constante en un horno a 40 °C por 48 h y se pesaron para la obtención de biomasa. 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, X_0 es la biomasa inicial, μ_M es la velocidad específica de crecimiento máxima (días⁻¹) y X_M es el máximo nivel de biomasa (g L⁻¹). Esta ecuación ajusta los valores experimentales al menor valor de la suma del cuadrado del error en función de los parámetros mencionados anteriormente (Viniestra-González *et al.*, 2003). El ajuste de las curvas de las cinéticas de crecimiento se realizó con el paquete estadístico Origin8 (OriginLab, Northampton, MA).

Composición química del micelio

El análisis proximal del micelio se realizó de acuerdo a las siguientes técnicas: minerales totales (AOAC No. 7.0009; AOAC 1990), grasa cruda (AOAC No. 7.060; AOAC 1990) y proteína (Nx4.38), utilizando el equipo de combustión Leco FP-528 (AOAC No. 990.30; AOAC 1990). Los carbohidratos totales se calcularon por diferencia.

Diseños experimentales y análisis estadístico

La evaluación de los extractos de madera de vid se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía a un nivel de $P < 0.05$, con seis repeticiones por tratamiento. Para la selección de la cepa y el medio de cultivo base se aplicó un ANOVA a un nivel de $P < 0.05$, en un diseño completamente al azar con arreglo factorial, con cinco 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, con tres repeticiones por tratamiento. Cada matraz representa una unidad

experimental. En 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 cada uno de los parámetros se realizaron tres repeticiones de tres matraces distintos. 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 $P < 0.05$. Se utilizó el paquete estadístico NCSS 2007 (Hintze, 2007).

Resultados y discusión

Extractos de madera de vid

El rendimiento de los extractos se muestra en la Tabla 1. El EA fue el de mayor rendimiento (3.58 %) ($P < 0.05$), seguido de EE, ET y EC, el último con 0.4 %. Este comportamiento fue similar a lo obtenido por Harris-Valle *et al.* (2007), quienes utilizaron los mismos solventes con la madera de vid como materia prima. Rosales y González (2003), obtuvieron rendimientos menores para extractos acuosos de *Pinus* spp., con respecto a extractos con etanol al 50 %. Lo anterior indica que la cantidad de extractos del material de poda de vid puede ser similar entre lotes distintos, pero variable según la

Tabla 1. Rendimiento de los extractos de madera de vid obtenidos con distintos solventes en reflujo constante por 3 h

Extracto	Rendimiento (%)
EA	3.58±1.20 ^a
EE	2.22±0.84 ^b
EC	0.40±0.23 ^c
ET	0.88±0.34 ^c

Los valores son los promedios ± desviación estándar de 6 repeticiones. EA: extracto acuoso, EE: extracto etanólico, EC: extracto clorofórmico, ET: extracto toluénico. Distinta literal indica diferencias significativas ($P < 0.05$).

polaridad del solvente.

Evaluación de los extractos para potenciar la producción de biomasa

Con la suplementación al medio de cultivo con las combinaciones de los cuatro extractos de madera de vid, se logró producir hasta 11.8 g L⁻¹ de micelio, mientras que la suplementación con combinaciones de los extractos polares (acuoso y etanólico) produjo hasta 9.5 g L⁻¹. El grupo control con medio de glucosa-peptona (GP) produjo la menor cantidad de biomasa (4.5 g L⁻¹). Con la suplementación tanto con los cuatro extractos como con los extractos polares se superaron los rendimientos obtenidos por Harris-Valle *et al.* (2007) de ca. 7 g L⁻¹, en una suplementación del medio GP con una combinación de los cuatro extractos.

Existen estudios sobre la potenciación de la producción de biomasa en distintos basidiomicetos incluyendo *L. edodes*, mediante la aplicación de 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 pueden promover el desarrollo de *L. edodes*.

Así mismo, estos autores sugieren que los compuestos que potencian la producción de biomasa son flavonoides y fenólicos. Reverberi *et al.* (2004) mencionan que además de los compuestos fenólicos, los compuestos lipídicos pueden favorecer la producción de biomasa en algunos basidiomicetos.

Contrariamente, Harris-Valle *et al.* (2007) observaron que con la suplementación del medio GP con extractos lipofílicos de madera de vid (clorofórmico y toluénico), la producción de biomasa no se incrementó significativamente, mientras que con extractos polares sí. Los extractos polares de madera de vid contienen cantidades considerables de compuestos fenólicos (Karvela *et al.*, 2009). El conocimiento actual sugiere que el aumento en la producción de biomasa está influenciado por la composición

y la polaridad de los compuestos presentes en dichos extractos.

En el presente estudio se demostró que una suplementación con extracto acuoso y etanólico de madera de vid al medio de cultivo GP, incrementa la producción de biomasa más del doble con respecto al control. Lo último es relevante para el costo-beneficio, aunado a que cloroformo y tolueno son cuestionables en un proceso de producción de alimento. Estos resultados proporcionaron la base para establecer dos tratamientos, T1: suplementación con los cuatro extractos y T2: suplementación con los extractos polares (acuoso y etanólico). El criterio de selección para las concentraciones de los extractos se basó en la máxima producción de biomasa con las concentraciones aplicadas.

Selección de la cepa y medio de cultivo base

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos a partir de la interacción de dos cepas de *L. edodes* con tres medios de cultivo base. La interacción del medio K e IE-245 fue la que generó menor cantidad de biomasa (3.73 g L⁻¹) y la mayor producción en medio GP e IE-105 y medio L e IE-245, con

Tabla 2. Producción de biomasa de *L. edodes* en cuatro medios de cultivo base a 25 °C, pH 5.5, 120 rpm por 21 días en oscuridad

Cepa	Medio	Biomasa (g L ⁻¹)*
IE-245	L	8.79±0.86 ^a
IE-105	GP	5.67±0.34 ^b
IE-105	L	5.53±0.52 ^b
IE-245	GP	5.27±0.35 ^b
IE-105	K	3.90±0.58 ^c
IE-245	K	3.73±0.49 ^c

Los valores son los promedios ± desviación estándar de 5 repeticiones. *Biomasa en base seca. Diferentes literales indican diferencias (P<0.05). L: Medio de Lomberh *et al.* (2002) modificado; GP: Medio glucosa-peptona; K: Medio de Kirk *et al.* (1976) modificado.

5.67 y 8.79 g L⁻¹ respectivamente. Esta última resultó más productiva ($P < 0.05$) que las demás y se tomó como control para suplementarse con los extractos de madera de vid. Los rendimientos bajos observados en el medio K pueden deberse a la utilización de glicerina como fuente de carbono, ya que el hongo tiene que gastar más energía para sintetizar azúcares destinados a pared celular.

Por otro lado, la alta productividad de la interacción medio L e IE-245 puede deberse a la composición del medio, ya que tiene distintas fuentes de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono (Lomberh *et al.*, 2002), lo cual favorece el desarrollo de *L. edodes*. Con la misma cepa, Gaitán-Hernández *et al.* (2006) registraron una eficiencia biológica de 93.2%, en cultivo sólido con madera de vid.

Cinética de crecimiento

En la Figura 1 se muestran las cinéticas de crecimiento de los dos tratamientos formulados y su control. Al día 18, T1 y T2 fueron diferentes ($P < 0.05$) al control, registrando *ca.* 11.5 g L⁻¹ de biomasa. Aunque al final del proceso de fermentación no se observaron diferencias entre los tratamientos ($P > 0.05$), la producción de biomasa se acelera con los extractos. Así, al día 15 de la fermentación, T1 y T2 alcanzan la biomasa que el

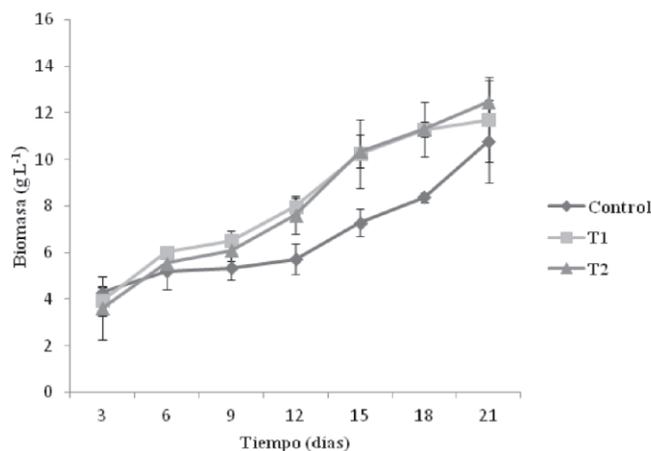


Figura 1. Cinéticas de crecimiento de *L. edodes* en cultivo sumergido a 25 °C, pH 5.5, 120 rpm en oscuridad. Las barras representan la desviación estándar con 3 repeticiones.

control produce al día 21. Los datos experimentales de producción de biomasa para el control, T1 y T2 fueron de 10.74, 11.71 y 12.48 g L⁻¹ respectivamente.

En la Tabla 3 se presentan los parámetros de la cinética de crecimiento según el modelo logístico aplicado. Se observa que T2 mostró un mayor valor de X_M (16.5 g L⁻¹), seguido de T1. El control no se ajustó al modelo logístico, lo cual impidió la predicción de X_M ; ello puede deberse a la variabilidad de los datos. El valor de X_M que se muestra en la tabla para el control es el valor experimental. 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, el cual presentó la R^2 más baja (0.86), mientras que T2 presentó la R^2 más alta (0.94).

La falta de ajuste del control al modelo logístico utilizado y las R^2 del control y T1 de 0.86 y 0.89 respectivamente, pueden deberse además de la variabilidad de los datos, a la morfología del micelio producido. Feng *et al.* (2010) mencionan que el comportamiento de la cinética de crecimiento de una morfología filamentosa se explica bien por el modelo logístico, mientras que el tipo pellet por un modelo cinético de raíz cúbica. Esta producción filamentosa es más deseable en procesos a gran escala, porque tiende a ser exponencial. En el presente trabajo se obtuvieron dos tipos de morfología, para el control y T1 de tipo pellet, mientras que en T2 filamentosa. Las condiciones de cultivo fueron las mismas para control, T1 y T2, por lo tanto las diferencias morfológicas pueden atribuirse a la composición del medio de cultivo. Debido a que los extractos polares son ricos en compuestos fenólicos y su degradación por distintas enzimas oxidativas generan especies reactivas de oxígeno (Harris-Valle *et al.*, 2007), el crecimiento filamentoso podría ocurrir como respuesta al estrés oxidativo. Los valores experimentales fueron menores que los valores predichos por

Tabla 3. Parámetros de la cinética de crecimiento de *L. edodes* en cultivo sumergido a 25 °C, pH 5.5, 120 rpm por 21 días en oscuridad

Tratamientos	X_M (g/L)	Y (x/s)	μ_M (días ⁻¹)	R ²
Control	10.74	0.26	0.05	0.86
T1	14.05	0.35	0.14	0.89
T2	16.57	0.41	0.13	0.94

X_M : Biomasa máxima; Y: Rendimiento (biomasa/sustrato); μ_M : Velocidad específica máxima de crecimiento; R²: Adecuación del modelo a los datos experimentales.

el modelo, lo cual puede deberse a que no se alcanzó una fase estacionaria. El modelo logístico explicó mejor el comportamiento de T2.

Con la aplicación de extractos polares al medio de cultivo (T2), se logró producir hasta 12.48 g L⁻¹ de micelio. Resultados similares fueron registrados por Tomati *et al.* (2004), con una producción de *ca.* 12.5 g L⁻¹ de biomasa en medio de cultivo suplementando con aguas residuales del procesamiento de la aceituna. Este residuo es rico en compuestos fenólicos al igual que los extractos polares de madera de vid, lo que puede explicar los altos rendimientos de biomasa. Turlo *et al.* (2008) lograron producir 10 g L⁻¹ de biomasa de *L. edodes*, utilizando un medio de cultivo complejo compuesto por glucosa, un residuo del proceso de producción de etanol a partir de azúcares, un subproducto de la obtención de almidón a partir de maíz y KH₂PO₄.

Feng *et al.* (2010) produjeron hasta 6.9 g L⁻¹ de micelio de *L. edodes* en forma de pellet y *ca.* 9 g L⁻¹ en forma filamentosa, mediante una optimización del medio de cultivo a los 9 y 6 días de fermentación, respectivamente. La suplementación con extractos de madera de vid al medio GP incrementó *ca.* 100 % la producción de biomasa, mientras que la suplementación al medio L *ca.* 14 %. Esto puede deberse a que el medio L es rico en nutrientes y el hongo no asimila óptimamente los extractos.

Composición química del micelio producido

En la Tabla 4 se muestra la composición proximal de la biomasa. El porcentaje de cenizas fue similar entre los tratamientos (P>0.05). El menor contenido de grasa cruda fue en el control (6.3%) y el más alto en T1 (8.7%). El valor de proteína más elevado se presentó en T2, mostrando diferencias con el control (P<0.05), el cual exhibió el valor más bajo. El contenido de carbohidratos totales osciló entre 64.5-70.6%.

En T1 se determinó un mayor valor de grasa cruda en la biomasa, lo cual puede deberse a que se adicionó con una combinación de los cuatro extractos de madera de vid, dos de los cuales son lipofílicos (clorofórmico y toluénico). Los valores de grasa cruda obtenidos en el presente trabajo superan a los citados para cuerpo fructífero, los cuales oscilan de 1.8-5% (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006; Stamets, 2000). *L. edodes* presenta 0.94-1.68% de ácidos grasos insaturados (en base seca), con cantidades altas de ácido linoléico (Chang y Miles, 2004), lo cual está asociado con sus beneficios hacia la salud. En el presente estudio se observaron valores de proteína mayores que los determinados para fructificaciones; contrariamente, en los carbohidratos totales fueron menores. Gaitán-Hernández *et al.* (2006) registraron valores de proteína de 12.3-15.1% y de carbohidratos totales de 76.6-82.2% en fructificaciones de la misma cepa (IE-245). Las diferencias de proteínas de T1 y T2 con respecto al control,

Tabla 4. Composición proximal de biomasa de *L. edodes* producida en cultivo sumergido a 25 °C, pH 5.5, 120 rpm por 21 días en oscuridad

Tratamientos	Cenizas	Grasa cruda	Proteína*	Carbohidratos totales
Control	4.31±0.12 ^a	6.31±0.73 ^a	18.62±0.74 ^a	70.61±0.28 ^b
T1	4.10±0.08 ^a	8.73±0.88 ^b	22.66±1.72 ^b	64.49±2.09 ^a
T2	4.15±0.03 ^a	7.67±1.14 ^{a,b}	23.38±0.91 ^b	64.77±2.39 ^a

Los valores son los promedios ± desviación estándar de 3 repeticiones (expresados en base seca). * N X 4.38. Distinta literal en la misma columna indica diferencias significativas (P<0.05).

puede deberse a la presencia de aminoácidos libres o proteínas en los extractos de madera de vid. Las proteínas encontradas en *L. edodes* están compuestas por 18 distintos aminoácidos entre los que se encuentran los esenciales para el humano (Turlo *et al.*, 2008).

Existe poca información sobre la composición química del micelio de *L. edodes* en cultivo sumergido. En un estudio reciente se produjo micelio de *L. edodes* enriquecido con vitamina B₁₂ donde se sugiere su consumo por personas con deficiencias en la ingesta de esta vitamina (Turlo *et al.*, 2008). En términos generales se conoce que el basidioma de *L. edodes* es rico en proteínas y carbohidratos, y bajo en grasa (Chang y Miles, 2004).

En este trabajo se estudiaron los parámetros de una cinética de crecimiento y se analizó la composición proximal de la biomasa producida en medio líquido suplementado con extractos de madera de vid. Ahora es importante analizar los metabolitos bioactivos de *L. edodes* en presencia de estos extractos. Así como determinar los parámetros de cinética de crecimiento utilizando el medio GP, ya que es un medio económico donde se observó un incremento importante en la producción de biomasa con los extractos.

Agradecimientos

Al Instituto de Ecología A.C., por proporcionar las cepas evaluadas. A la M. en C. Karla G. Martínez-Robinson por su apoyo con el análisis proximal; M. en C. Rosina Cabrera Ruiz y Dra. Mayra de la Torre por las cinéticas de crecimiento y Biól. Georgina Vargas Rosales por su asistencia técnica.

Literatura citada

- AOAC, 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist, 15th edn. AOAC International, Arlington.
- Aviles, H., P. O'Donnell, J. Orshal, H. Fujii, B. Sun, G. Sonnenfeld, 2008. Active hexose correlated compound activates immune function to decrease bacterial load in a murine model of intramuscular infection. *The American Journal of Surgery* 195: 537-545.
- Beltrán-García, M.J., A. Orozco, I. Samayoa, T. Ogura, 2001. Lignin degradation products from corn stalks enhance notably the radial growth of basidiomycete mushroom mycelia. *Revista de la Sociedad Química de México* 45: 77-81.
- Çağlarımak, N., 2007. The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. *Food Chemistry* 105: 1188-1194.
- Chang, S., P. Miles, 2004. *Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environment Impact*. CRC Press. Florida.
- Feng, Y.-L., W.-Q. Li, X.-Q. Wu, J.-W. Cheng, S.-Y. Ma, 2010. Statistical optimization of media for mycelial growth and exopolysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies. *Biochemical Engineering Journal* 49: 104-112.
- Gaitán-Hernández, R., M. Esqueda, A. Gutiérrez, A. Sánchez, M. Beltrán-García, G. Mata, 2006. Bioconversion of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potencial of viticulture residues. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 432-439.
- Gaitán-Hernández, R., G. Mata, 2004. Cultivation of the edible Mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) in pasteurized wheat straw – Alternative use of Geothermal energy in México. *Engineering Life*

- Science 45: 230-237.
- Harris-Valle, C., M. Esqueda, A. Sánchez, M. Beltrán-García, E. Valenzuela-Soto, 2007. Polar vineyard pruning extracts increase the activity of the main lignolytic enzymes in *Lentinula edodes* cultures. Canadian Journal of Microbiology 53: 1150-1157.
- Hearst, R., D. Nelson, G. McCollum, B. Millar, Y. Maeda, C. Goldsmith, P. Rooney, A. Loughrey, J. Rao, J. Moore, 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.
- Hintze, J., 2007. NCSS 2007. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA. www.ncss.com.
- Karvela, E., D.P. Makris, N. Kalogeropoulos, V.T. Karathanos, 2009. Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols. Talanta 79: 1311-1321.
- Kirk, T. K., W.J. Connors, G. Zeikus, 1976. Requirements for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi. Applied Environmental Microbiology 32: 192-194.
- Kitzberger, C., A. Smânia, R. Pedroza, S. Ferreira, 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., J. Akaki, S. Nakajima, K. Kamei, M. Tamesada, 2010. Structural analysis of glicogen-like polysaccharides having macrophage-activating activity in extracts of *Lentinula edodes* mycelia. Journal of Natural Medicines 64: 16-23.
- Lomberh, M.L., E.F. Solomko, A.S. Buchalo, B. Kirchoff, 2002. Studies of medicinal mushrooms in submerged cultures. In: Sánchez, J.E., G. Huerta y E. Montiel (eds.), Mushroom Biology and Mushroom Products. UAEM, Cuernavaca. pp. 367-377.
- Lull, C., H. Wichers, H. Savelkoul, 2005. Antiinflammatory and Immunomodulating Properties of Fungal Metabolites. Mediators of Inflammation 2: 63-80.
- Murata, Y., T. Shimamura, T. Tagami, F. Takatsuki, J. Hamuro, 2002. The skewing to Th1 induced by lentinan is directed through the distinctive cytokine production by macrophages with elevated intracellular glutathione content. International Immunopharmacology 2: 673-689.
- Özçelik, E., A. Pekşen, 2007. Hazelnut husk as a substrate for the cultivation of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*). Bioresource Technology 98: 2652-2658.
- Philippoussis, A., P. Diamantopoulou, C. Israilides, 2007. Productivity of agricultural residues used for the cultivation of the medicinal fungus *Lentinula edodes*. International Biodeterioration and Biodegradation 59: 216-219.
- Reverberi, M., F. Di Mario, U. Tomati, 2004. β -Glucan synthase induction in mushrooms grown on olive mill wastewaters. Applied Microbiology and Biotechnology 66: 217-225.
- Rosales, M., R. González, 2003. Comparación del contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. Madera y Bosques 9: 41-49.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2011. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Última consulta 27 de julio de 2012.
- Stamets, P., 2000. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. 3ra ed. Ten Speed Press. Berkeley, Toronto.
- Tomati, U., M. Belardinelli, E. Galli, V. Iori, D. Capitani, L. Mannina, S. Viel, A. Segre, 2004. NMR characterization of the polysaccharidic fraction from *Lentinula edodes* grown on olive mill waste waters. Carbohydrate Research 339: 1129-1134.
- Turlo, J., B. Gutkowska, F. Herold, W. Krzyczkowski, A. Błażewicz, R. Kocjan, 2008. Optimizing vitamin B₁₂ biosynthesis by mycelial cultures of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. Enzyme and Microbial Technology 43: 369-374.
- Wasser, S., 2005. Shiitake (*Lentinus edodes*). In: Encyclopedia of Dietary Supplements. Marcel Dekker, Inc. New York. U.S. pp. 653-664.
- Yap, A.-T., M.-L. Ng, 2001. An improved method for the isolation of Lentinan from the edible and medicinal shiitake mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetidaeae). International Journal of Medicinal Mushrooms 3: 9-19.

