



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación de una polifenoloxidasa (PPO)
en champiñones producidos en compostas
con distintos tipos de suplementos**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A
MARISOL BRIONES ULLOA



MÉXICO, DF

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Hermilo Leal Lara
Vocal	Luz del Carmen Castellanos Román
Secretario	Marco Antonio León Félix
Primer suplente	María de Lourdes Osnaya Suárez
Segundo suplente	Eleazar Martínez Barajas

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y Biotecnología,
Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

Dr. Hermilo Leal Lara
Asesor del tema

M. en B. Rebeca Ramírez Castillo
Supervisor técnico

Marisol Briones Ulloa
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de tesis ha sido posible gracias a la colaboración, apoyo y dedicación de numerosas personas. Especialmente quiero agradecer:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma máter, por darme la oportunidad de ser parte de la gran comunidad universitaria. Me siento muy orgullosa de pertenecer a la mejor universidad del país.

A la Facultad de Química por abrirme sus puertas y enseñarme a descubrir los misterios de la vida a través de la ciencia. A su personal académico y administrativo, gracias.

Al Dr. Hermilo Leal Lara por invitarme a realizar este proyecto de tesis. Gracias por compartir conmigo su conocimiento y experiencia sobre el maravilloso mundo de los champiñones. Por ser un excelente asesor. Mi admiración y respeto hacia usted.

A la M. en B. Rebeca Ramírez Castillo por involucrarte en el proyecto desde el principio, por tu valiosa colaboración y por tus consejos que enriquecieron este trabajo.

A mi jurado, gracias por sus oportunas observaciones y el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis. En especial, a la profesora Luz del Carmen Castellanos Román, quién valiosamente brindo su asesoría al inicio de esta investigación.

Al Dr. Octavio Loera Corral por guiarme en los primeros pasos de este proyecto y por su continuo interés en él. A su equipo de trabajo de la Universidad Autónoma Metropolitana, en especial al M. en C. Oscar Arce Cervantes, gracias por permitirme ser parte de tu proyecto, por compartir tus experiencias y por tu sincera amistad.

A la Dra. Carmen Wachter Rodarte y la Biol. Ma. Teresa Flores Espinosa por las facilidades y asesoría brindada en el uso del equipo del laboratorio.

A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto por recibirme amablemente en su laboratorio y permitirme desarrollar parte importante de la metodología. Gracias a su apoyo y comprensión logré salir adelante. Le agradezco profundamente su amistad en todo momento.

Más allá de lo profesional, quiero agradecer a quiénes han compartido conmigo mis sueños y me han dado su apoyo incondicional siempre.

Quiero comenzar agradeciendo a mis padres, Irene Ulloa Rivera y Luis Briones Palacios por ser mi inspiración y por estar conmigo siempre. Gracias por creer en mí y hacer posible todo esto.

A mi hermano, Luis Alfredo por ser una pieza fundamental en mi vida.

A la gente guapa, la Familia Ulloa. A cada uno, muchas gracias por ser exactamente como son, ustedes siempre le han dado ese sazón tan exquisito que tiene nuestra familia. Gracias a mi Abue Nina; mis tías Margarita, Araceli y Mariana; mis tíos Guillermo, Luis, Rubén y Gabriel; y mis fabulosos primos Luis Rubén, Zxaxil, Iván y Gabriela Isabel.

A mis amigos de toda la vida, Andrea y Carlos. Por casi 10 años hemos crecido juntos, tantas experiencias los han convertido en otra familia para mí, a la cual llegaron después Yumiko y Joaquín. Muchas gracias mis niños, por todas nuestras aventuras juntos, esto VA por ustedes.

A mis niñas QA's, gracias por ser mis compañeras de carrera y por convertirse en las mejores amigas, siempre serán mis brujitas:

Adriana Navarro, gracias por tu entrega y sinceridad y por esa gran belleza interna que te caracteriza. Te quiero mucho.

Angeles Bazán, gracias por tu entusiasmo, tu risa contagiosa, tu complicidad y tu invaluable ayuda en todo momento. Al infinito y más allá.

Silvia Armenta, gracias por tu confianza, por demostrarme tu capacidad de lucha una y otra vez y por enseñarme la alegría de la vida. Te admiro mucho.

A mis compañeros del 324, Valentina, Paola, Kasha, Sandra, Alberto y Luis, por los buenos momentos desde que llegué al laboratorio, por sus consejos y por hacer mis tardes tan divertidas, aún sin el cable de la grabadora.

A los chicos del 114 y adjuntos, gracias por regalarme momentos tan agradables y por darme ánimos cuando esas lecturas frente al espectrofotómetro parecían interminables.

A los miembros de la comunidad: Aída, Arturo, Carlos, Ileana, Mauricio, Mónica, Nancy, Paola y Pedro. Gracias por estar ahí desde el principio de este viaje.

A mis queridos amigos de Danisco y a mis fantásticos del Diplomado, porque ustedes me han enseñado hasta donde podemos llegar, si así lo deseamos.

Y a todas aquellas personas que a lo largo de mi camino he conocido y le han dado esa variedad de sabores tan deliciosa a mi vida. Muchas gracias!

Finalmente quiero agradecer, al Dr. Alfredo Y. Martínez Vázquez, gracias por caminar junto a mí, por compartir tus sueños, por dejarme ser parte de ellos y por querer lograrlos a mi lado. Gracias por ser mi compañero de vida y mi mejor amigo. Y por ser en todo y por todo mi complemento.

“Por mi raza hablará el espíritu”

DEDICATORIA

Porque gracias a ustedes, he logrado cumplir este sueño. Por ser tres grandes motivos en mi vida, les dedico este trabajo que hemos realizado con tanta pasión.

A Irene Ulloa, por ser una mujer brillante y una luchadora incansable.

A Luis Briones, por ser un gran ejemplo de entrega y dedicación.

A Alfredo Martínez, por la fe y esperanza que vive en ti.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Hongos comestibles	4
2.2 <i>Agaricus bisporus</i>	5
2.2.1 Generalidades	5
2.2.2 Ciclo biológico	5
2.2.3 Morfología	7
2.2.4 Cultivo comercial	8
2.2.5 Suplementación.....	16
2.2.6 Aporte nutrimental	18
2.2.7 Producción	20
2.2.8 Consumo	21
2.2.9 Distribución.....	22
2.3 Calidad del champiñón	23
2.3.1 Definición.....	23
2.3.2 Principales características sensoriales.....	24
2.3.3 Factores que afectan la calidad.....	26
2.3.4 Vida de anaquel	29
2.3.5 Oscurecimiento enzimático	29
2.3.6 Tratamientos poscosecha	32
2.4 Enzimas Polifenoloxidasas	36
2.4.1 Tirosinasa.....	36
3. JUSTIFICACIÓN.....	41
4. OBJETIVOS.....	42

5. METODOLOGÍA	43
5.1 Diagrama general de investigación	43
5.2 Estrategia experimental	44
5.3 Formulación de suplementos	44
5.4 Siembra	45
5.5 Muestras	46
5.6 Descripción de metodología	47
5.6.1 Preparación de muestras	47
5.6.2 Determinación de humedad	47
5.6.3 Extracción enzimática.....	48
5.6.4 Determinación de actividad enzimática	49
5.6.5 Determinación de proteína	51
5.6.6 Análisis estadístico	52
6. RESULTADOS	54
6.1 Contenido de humedad de los champiñones producidos en compostas con distintos tipos de suplementos	54
6.2 Ensayo para la determinación de actividad enzimática.....	58
6.3 Actividad específica de tirosinasa en extractos crudos de champiñones producidos en compostas con distintos suplementos	60
6.4 Actividad de tirosinasa (en base seca) de champiñones producidos en compostas con distintos suplementos	63
6.5 Relación entre el contenido de sólidos y la actividad de tirosinasa en champiñones producidos en compostas con distintos suplementos.	65
7. DISCUSIÓN	67
8. CONCLUSIONES	75
9. PERSPECTIVAS	77
10. ANEXOS	78
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

**RESUMEN**

La tirosinasa es una enzima polifenoloxidasa (PPO) responsable del oscurecimiento en frutas, vegetales y microorganismos. Siendo uno de los principales factores involucrado en el deterioro de la calidad del champiñón, el oscurecimiento oxidativo del champiñón está relacionado con la actividad enzimática de tirosinasa y el contenido de compuestos fenólicos. En la producción comercial del champiñón, el uso de suplementos adicionados a la composta es una práctica común para incrementar los rendimientos. Se ha planteado que nutrimentos como proteínas, lípidos y más recientemente los polisacáridos, contribuyen de manera importante a aumentar los rendimientos. Un factor que no ha sido investigado es como el uso de suplementos y la composición de los mismos pueden afectar la calidad de los champiñones producidos

En esta investigación, mediante un ensayo espectrofotométrico, se determinó la actividad enzimática de tirosinasa (EC 1.10.3.1), en los champiñones cosechados en los tres primeros brotes de cultivo en composta comercial suplementada con 5 distintos tipos de materiales: salvado (**S**); salvado y gluten (**SG**); salvado y aceite (**SA**); salvado, gluten y aceite (**SGA**) y un suplemento comercial elaborado con soya entera quebrada (**Rp**). Adicionalmente se utilizó composta no suplementada como testigo (**T**).

El uso de los suplementos a base de polisacáridos, proteínas y lípidos resultó en una menor actividad específica al primer brote respecto a la composta no suplementada (0.244 U mg^{-1} proteína) sugiriendo un efecto de dichos nutrimentos sobre la actividad de la enzima. Los resultados muestran también que la actividad de tirosinasa en los champiñones aumentó significativamente al avanzar el cultivo, alcanzando en todos los tratamientos una mayor actividad al tercer brote. Los niveles más altos se observaron con los suplementos **S** y **SGA**, 0.471 y 0.424 U mg^{-1} proteína, respectivamente. Otro parámetro de calidad evaluado fue el contenido de sólidos en los champiñones cosechados, encontrándose un efecto de los suplementos y el brote de cultivo. Los champiñones producidos en compostas con suplementos presentaron un menor contenido de sólidos respecto al testigo, encontrándose que conforme avanzan los brotes de cultivo aumenta el contenido de sólidos en todos los tratamientos. Además de incrementar el rendimiento, la suplementación en la composta mostró un efecto positivo sobre la calidad de los champiñones producidos ya que disminuye la actividad de tirosinasa, lo que indica una menor susceptibilidad al oscurecimiento del producto. No obstante, se observó un efecto en sentido opuesto respecto al contenido de sólidos ya que este disminuyó al suplementar la composta.



1. INTRODUCCIÓN

El oscurecimiento enzimático de *A. bisporus* es un problema severo que reduce la vida de anaquel de los champiñones. Durante los últimos años, el consumo de champiñones frescos se ha incrementado drásticamente a medida que se ha fortalecido la búsqueda de alimentos saludables. La demanda del consumidor exige productos de buena calidad y con una vida de anaquel prolongada. En Europa, los champiñones se cosechan maduros con abertura del píleo y velo roto; mientras que en América, se prefiere un producto con píleo de tamaño medio, velo intacto, estípite corta y un elevado nivel de blancura. Cualquier deficiencia en estos atributos, demerita la calidad del champiñón ocasionando pérdidas económicas para la empresa productora.

Para la comercialización del champiñón como producto fresco, es necesario mantener una cadena de frío desde el momento de la cosecha, el transporte, la distribución a las centrales de abasto hasta la venta al público. Las mayores empresas productoras cuentan con la infraestructura, organización y recursos financieros para lograr la distribución adecuada del producto; sin embargo, resulta complicado conservar el producto a bajas temperaturas, por ejemplo durante la venta directa al consumidor, principalmente en mercados y tianguis locales.

El champiñón es un producto con una tasa de respiración elevada, altamente perecedero y aún después de la cosecha, el ciclo biológico del champiñón continúa hasta la producción de esporas. Como consecuencia, ocurren diversos cambios fisiológicos en el hongo, repercutiendo directamente en la calidad del producto.

Dentro de los cambios que suceden durante el almacenamiento de los champiñones después de la cosecha, se encuentran la elongación del estípite, la abertura del píleo, la pérdida de peso y el oscurecimiento del producto. El oscurecimiento del champiñón tiene sus principales causas en el deterioro del tejido, ya sea por el proceso natural de senescencia, por daño mecánico o por ataque microbiano. Se ha demostrado que el



contenido de compuestos fenólicos presentes en *A. bisporus* y la actividad de tirosinasa, son los parámetros más importantes para determinar la susceptibilidad de los champiñones al oscurecimiento enzimático.

La suplementación con fuentes ricas de proteínas y lípidos se ha utilizado para incrementar la producción de champiñones. En investigaciones previas, se propuso el empleo de distintos tipos de suplementos a base de polisacáridos, mostrando que es posible aumentar los rendimientos. No obstante, en una investigación reciente en nuestro laboratorio (Arce, 2007), se encontró que el mayor incremento se obtuvo al mezclar polisacáridos con proteínas y/o lípidos, principalmente durante el primer brote y con un continuo declive en los brotes posteriores.

Estudios sobre la calidad de los champiñones sugieren que distintos factores del cultivo tales como cepa, calidad de la composta, condiciones ambientales y brote, influyen sobre la susceptibilidad que presentan los champiñones al oscurecimiento poscosecha. Sin embargo, hasta ahora, son pocas las investigaciones realizadas para definir una eventual influencia de estos suplementos sobre la calidad y vida de anaquel del producto. Por lo anterior, en este trabajo se propuso evaluar la actividad de tirosinasa, una enzima perteneciente a la familia de polifenoloxidasas (PPO) y principal responsable del oscurecimiento enzimático, en los champiñones producidos en compostas con distintos tipos de suplementos.

Evaluando la actividad enzimática en muestras de champiñones cultivados con los diferentes suplementos; así como, comparando la actividad de tirosinasa durante tres brotes de cultivo se podrá determinar si existe un efecto del tipo de suplemento y/o brote sobre la actividad enzimática y el contenido de sólidos. Con el análisis de los resultados obtenidos podrá conocerse la importancia de una fuente de polisacáridos (salvado de maíz), una fuente de proteína (gluten) y una fuente de lípidos (aceite) sobre la calidad del producto.



2. MARCO TEÓRICO

2.1 HONGOS COMESTIBLES

En la actualidad, se conocen 2,000 variedades de hongos comestibles en el mercado mundial. La mayoría son especies silvestres recolectadas, mientras que, alrededor de 50 son cultivadas. Entre las especies más cultivadas se encuentran *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp., *Auricularia* spp., *Volvariella volvacea*, *Flammulina velutipes*, entre otras. La mayoría de estas especies cultivadas son comestibles y poseen propiedades medicinales. Actualmente, la producción mundial supera los siete millones de toneladas de hongos comestibles cultivados frescos por año, con un valor económico aproximado superior a los treinta billones de dólares. La tasa promedio de incremento anual en la producción de hongos sobrepasa el 11%. A nivel mundial, el champiñón *Agaricus bisporus*, es el hongo comestible más importante, con un nivel de producción superior a 2 millones de toneladas métricas anuales (Martínez Carrera *et al.*, 2007).

El método para cultivar *A. bisporus* fue desarrollado en la región de París, Francia donde los cultivadores de melón descubrieron como podía propagarse este hongo e iniciaron su cultivo hacia 1650 (Royse & Schisler, 1980; Vedder, 1996).

En México, el consumo de hongos forma parte del acervo cultural de la población rural, su conocimiento y uso fue muy importante en las culturas prehispánicas, sobre todo en las mesoamericanas, de tal manera que constituyeron parte de una estrategia de subsistencia basada en el uso múltiple de los recursos naturales. En ciertas regiones del país aún persisten las recolectas realizadas con fines de autoconsumo y comercialización, así como el cultivo comercial de champiñón, setas y shiitake.



2.2 AGARICUS BISPORUS

2.2.1 GENERALIDADES

De acuerdo a la clasificación filogenética, *Agaricus bisporus* pertenece a la familia de los *Agaricaceae* de la orden de los Agaricales en el phylum de los *Basidiomycota* del reino *Fungi*. Los basidiomicetos están caracterizados por células reproductivas que producen meiosporas hacia el exterior, llamadas basidiosporas (Callac, 2007).

Los hongos del género *Agaricus* son comúnmente recolectados en la naturaleza, algunas especies son cultivables, entre las cuales *Agaricus bisporus* es la más cultivada en el mundo.

2.2.2 CICLO BIOLÓGICO

Los procesos celulares, el control ambiental y fisiológico, así como la genética conducen a la iniciación del desarrollo del cuerpo fructífero. Para *Agaricus* y otros basidiomicetos saprófitos, la fructificación es regular o exclusiva del heterocarión, también llamado micelio secundario, que surge de la cruce entre dos homocariones sexualmente compatibles. Las células diploides (basidios) formadas en los cuerpos fructíferos producen progenie meiótica (basidiosporas). Los cuerpos fructíferos son generados como órganos sexuales específicos en el micelio vegetativo (Figura 2.1).

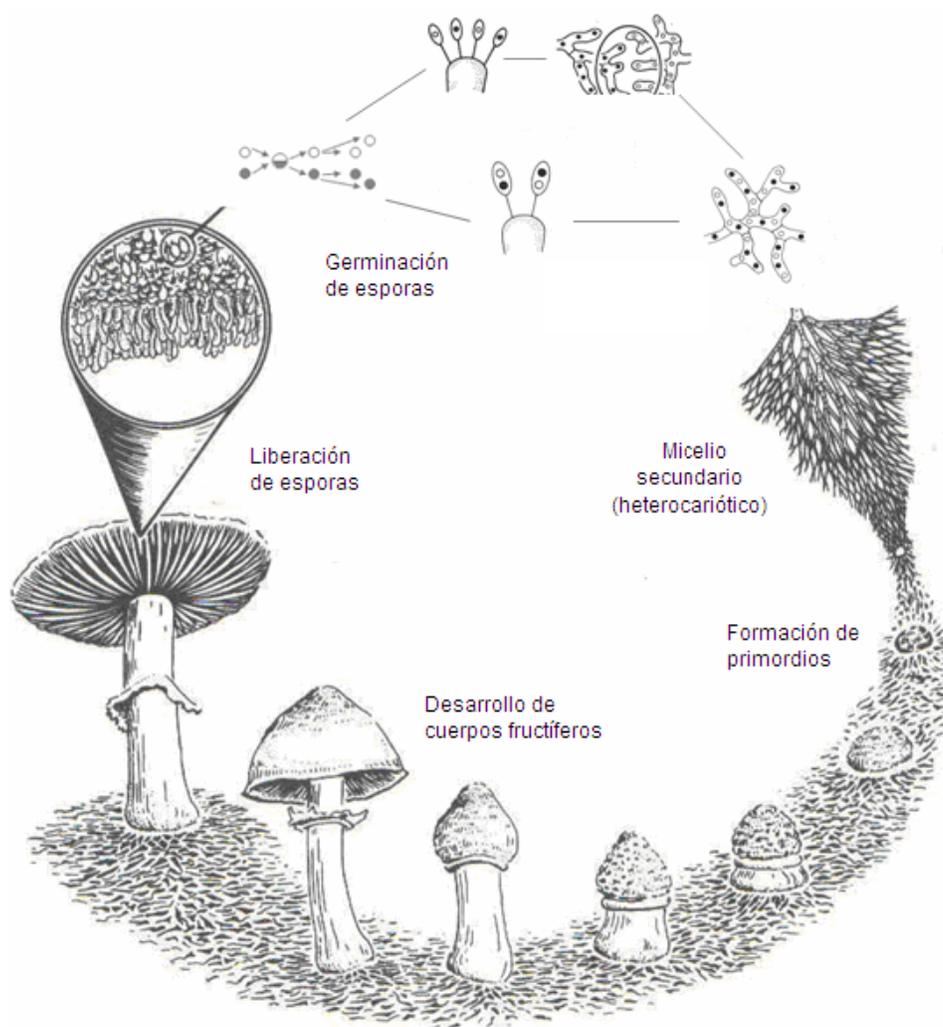


Figura 2.1 Ciclo biológico de *A. bisporus* (adaptado de Stamets, 1993).

Los puntos básicos en la morfogénesis de champiñones incluyen la germinación de basidiosporas binucleadas; no obstante, puede tener células uninucleadas y haploides en la etapa inicial. Los micelios resultantes se fusionan para dar paso a la formación de un agregado inicial (micelio secundario), derivando en la fructificación característica de la fase de reproducción sexual, dentro de la cuál hay una diferenciación celular y se establecen los primordios que básicamente contienen todos los tejidos presentes en el cuerpo fructífero maduro (Herrera & Ulloa, 1990; Wessels et al., 1993; Kües & Liu, 2000).



2.2.3 MORFOLOGÍA

Las partes fundamentales del champiñón se dividen en: **parte vegetativa** y **cuerpo fructífero** (Figura 2.2).

El **micelio** corresponde a la parte vegetativa del hongo, constituido por filamentos o hifas, el cuál se extiende por el sustrato adecuado en busca de los nutrimentos que necesita para su desarrollo (López, 1990). Los cuerpos fructíferos, también llamados esporóforos, carpóforos o basidocarpos, son las estructuras visibles conocidas comúnmente como champiñones u hongos, en donde se distinguen las siguientes partes:

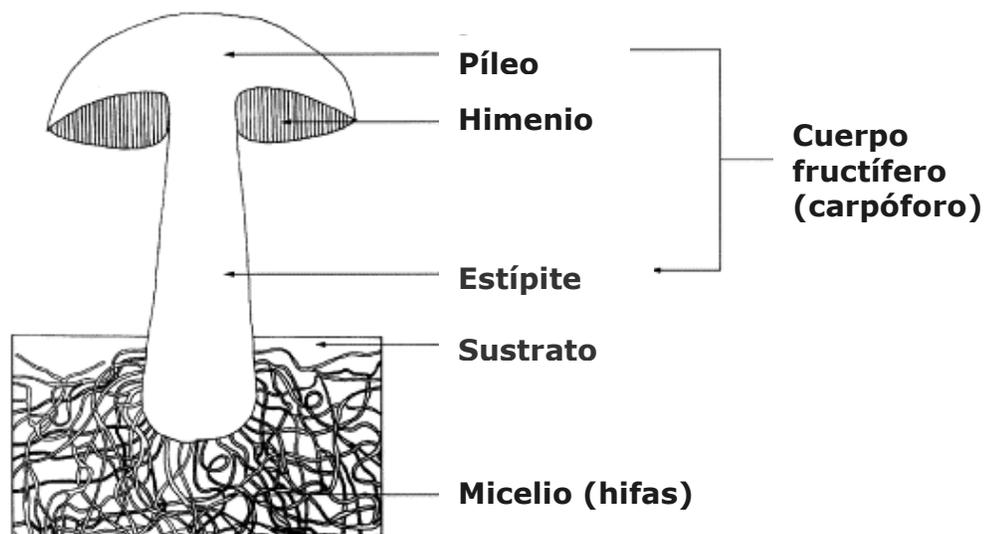


Figura 2.2 Representación de un cuerpo fructífero (Kalac & Svoboda, 2000).

Píleo: frecuentemente denominado como sombrero, es la parte más carnosa del hongo, tiene forma convexa y redondeada, su tamaño depende de la edad del hongo, puede alcanzar hasta 15 cm, aunque comercialmente no interesa que llegue a tener este tamaño.



Himenio: situado en la parte inferior del píleo, está formado por numerosas láminas o lamélas dispuestas radialmente, desde el pie hasta el borde extremo del píleo. El himenio está constituido de células estériles (cistidios) y de basidios productores de esporas. Cuando el hongo es joven, las láminas son de color rosa y van oscureciéndose paulatinamente a medida que transcurre el tiempo.

Velo: es una fina membrana formada por células flexibles, que protege a las esporas y el himenio hasta que el cuerpo fructífero se desarrolla completamente. Una vez que alcanza su completo desarrollo, el velo se rompe y sólo queda de él un pequeño trozo unido al pie, llamado **anillo**.

Estípite: también conocido como pie o pata, es la parte del cuerpo fructífero que sirve de soporte al píleo, de forma cilíndrica, a menudo más grueso por la base, por su parte inferior está unido al micelio o filamentos del hongo que crecen en el sustrato.

2.2.4 CULTIVO COMERCIAL

Debido al gran potencial del cultivo de champiñón a nivel mundial y en México, actualmente, el cultivo comercial ha mejorado gracias al avance tecnológico y científico en la industria de los hongos, a la par de la experiencia práctica de los cultivadores.

Durante el proceso de cultivo, se provee al hongo de las condiciones ambientales óptimas y nutrimentos necesarios para que se lleven a cabo cada una de las fases de su ciclo de vida. El ciclo de producción es considerado relativamente corto (60 días aproximadamente).

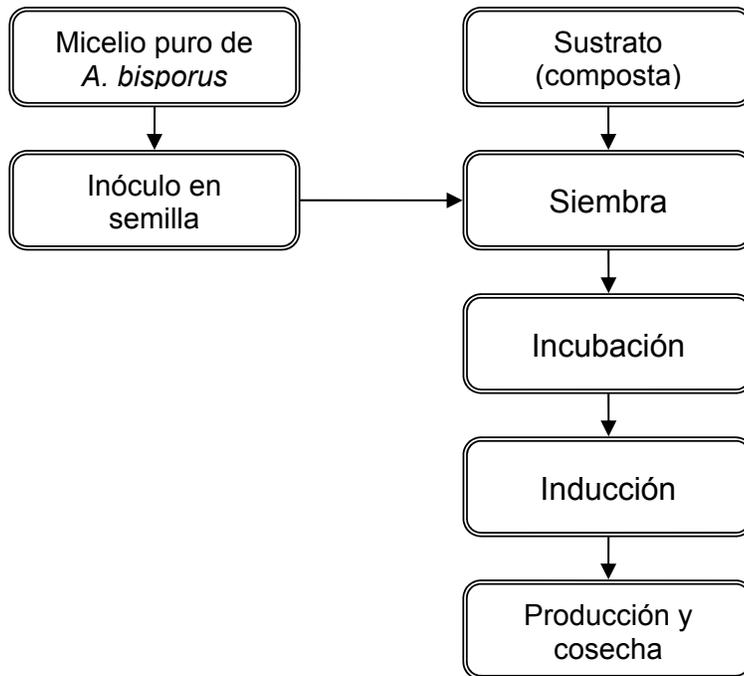


Figura 2.3 Esquema general del cultivo de champiñones (adaptado de Sánchez, 2004).

2.2.4.1 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

A. bisporus es un organismo heterótrofo estricto y saprófito, es decir, se alimenta de materia orgánica descompuesta. Para su desarrollo es necesario proporcionarle los requerimientos nutricionales adecuados. La materia orgánica es una buena fuente de carbono, principalmente celulosa y lignina. Durante el desarrollo del micelio se metaboliza en especial lignina, mientras que durante la formación del cuerpo reproductor se consume preferentemente celulosa y pentosas. Los requerimientos de proteínas se logran satisfacer con el metabolismo del complejo humus-lignina.

Para inducir la formación de cuerpos fructíferos es importante mantener un balance entre las fuentes de carbono y nitrógeno. Para *A. bisporus* la proporción óptima C/N en la composta para la fructificación está en una proporción de 14 - 16 a la siembra (García, 2007).



Los champiñones secretan diversas enzimas al medio para degradar los sustratos lignocelulósicos entre ellas peroxidasas y lacasas para la degradación de lignina y diversos tipos de glucanasas, celulasas y xilanasas para la degradación de polisacáridos complejos como celulosa y hemicelulosa (Wood & Fermor, 1981; Stoop & Mooibroek, 1999).

Algunos micronutrientes necesarios para el crecimiento de *Agaricus* son vitaminas como tiamina y biotina y minerales como fósforo, azufre, potasio, calcio, magnesio y en pequeñas cantidades cobre, zinc, manganeso y molibdeno (Gerrits, 1988).

2.2.4.2 REQUERIMIENTOS AMBIENTALES

Las condiciones ambientales deben mantenerse en óptimas para el crecimiento y desarrollo de *A. bisporus*, éstas se refieren a la humedad tanto del ambiente como del agua en la composta y en la tierra de cobertura; neutralidad del medio relacionado con el pH; y niveles de CO₂ y ventilación en el cuarto de cultivo.

2.2.4.3 COMPOSTA

El sustrato para el cultivo de *A. bisporus* es el medio más complejo usado para la producción de un hongo comestible. Las materias primas varían de acuerdo a la disponibilidad de esquilmos en la región. Para su elaboración, se emplea distintos tipos de paja de gramíneas (trigo, avena, cebada, arroz). La fuente de nitrógeno proteínico se obtiene a partir de urea o estiércol de pollo (pollinaza), los cuáles aceleran la fermentación y enriquecen el medio de cultivo. Además, se utilizan otros aditivos como cascarilla de algodón, la cual proporciona una buena oxigenación al sustrato, lográndose una adecuada fermentación aeróbica; así como yeso agrícola como regulador de pH.



Las materias primas se procesan por fermentación aerobia, con lo que se busca una transformación de los nutrientes para favorecer el desarrollo del micelio del champiñón, mediante la eliminación de carbohidratos de fácil degradación, se evita el crecimiento de microorganismos competidores y patógenos. La materia orgánica a través de una oxidación biológica a altas temperaturas forma un complejo humus-lignina rico en nitrógeno, el cuál podrá ser asimilados únicamente con las enzimas producidas por el champiñón (van Griensven, 1988; García, 2007). La composta se convierte de esta manera en un medio selectivo con los nutrientes apropiados para el desarrollo y crecimiento exclusivo del micelio de *A. bisporus*.

El proceso de elaboración de composta implica dos fases (Fernández, 2005):

Composta de fase I. Este primer proceso también se conoce como fermentación al aire libre, la paja es desbaratada y humedecida, se mantiene apilada en áreas descubiertas donde comienzan un desdoblamiento aeróbico de los sustratos, mediante la acción de poblaciones microbianas aerobias. Durante esta etapa, es necesario remover periódicamente el sustrato para obtener una fermentación lo más homogénea posible, así como humedecer eventualmente la pila para recuperar el agua perdida por evaporación y escurrimientos.

El mantenimiento de la humedad afecta directamente la estructura del sustrato, ya que va debilitando la rigidez inicial de la paja, el agua penetra lentamente en las fibras y permite la mejor absorción de los nutrientes adicionados posteriormente. Al final de la fase I, se observan cambios importantes en la composta como menor rigidez de la paja, oscurecimiento de la composta y fuerte presencia de amonio.

Composta de fase II. En esta fase ocurre una fermentación controlada en túneles especiales de pasteurización. Los propósitos de la fase II son pasteurizar la composta, reducir la cantidad de amonio presente convirtiéndolo en nitrógeno proteínico, así como desarrollar una composta selectiva para el champiñón.



Durante la pasteurización, se eliminan los microorganismos patógenos y otros que competirían con el micelio de champiñón en la asimilación de los nutrientes preparados. En esta fase se desarrollan microorganismos termófilos de los géneros *Scytalidium* y *Humicola*, además del actinomiceto *Streptomyces thermovulgaris*, cuya actividad microbiológica transforma la composta en un medio adecuado y selectivo para el crecimiento micelial del champiñón (García, 2007).

Al final del proceso, se obtiene una composta con las siguientes características (Arce, 2007):

- pH 7.3
- Humedad 66%
- Nitrógeno total 2.05%
- Materia orgánica 73%
- Cenizas 27%
- Relación C/N 14-16:1
- Libre de amoníaco residual
- Apariencia homogénea
- Color oscuro

Estas operaciones tienen la desventaja de requerir tiempo y espacio para el manejo de la composta; por ello, se han realizado estudios para producir champiñones en sustratos no composteados (SNC). A pesar de haberse obtenido buenos rendimientos para *A. bisporus*, aún es necesario reducir el costo de producción y la disponibilidad de los sustratos para hacer más competitivo el uso de esta tecnología (Sánchez & Royse, 2001).



2.2.4.4 SIEMBRA

El inóculo para el cultivo de champiñón se conoce comercialmente como *semilla*. Para la producción del inóculo, el micelio puro de la cepa se desarrolla en granos de cereales estériles (centeno, trigo, sorgo y mijo), produciéndose micelio en estado vigoroso para que logre colonizar rápidamente el sustrato. La cepa es seleccionada de acuerdo a sus características productivas como viabilidad, resistencia a enfermedades, pureza, color del píleo y textura.

En el proceso de siembra, la semilla se mezcla con la composta mecánicamente, el nivel de dosificación es alrededor del 1% del peso fresco de composta. Algunas empresas aprovechan el mezclado para adicionar el suplemento seleccionado.

2.2.4.5 INCUBACIÓN

Una vez realizada la siembra, se transporta el sustrato a las casas de cultivo donde se controla la temperatura, humedad y concentración de CO₂. Durante este proceso, conocido como incubación, sucede la colonización de la composta a partir del grano inoculado (fase vegetativa). Al inicio, se observa un ligero desarrollo del micelio en forma de pequeñas ramificaciones y dependiendo de la calidad del sustrato y el control de las condiciones ambientales, el sustrato queda completamente invadido por el micelio, lo cual ocurre, por lo general, 2 semanas después de la siembra.

2.2.4.6 INDUCCIÓN

Para estimular la producción de los cuerpos fructíferos, se cubre el sustrato con una capa de tierra de cobertura, la cual es una combinación de turba y carbonato de calcio cuya función es mantener un microambiente adecuado para el desarrollo de carpóforos.



El material de cobertura representa una reserva de agua; debe poseer una estructura porosa y suelta para favorecer el intercambio gaseoso, con escaso contenido de nutrientes, pH ligeramente alcalino (7.4) y libre de bacterias, hongos y otros organismos perjudiciales para el champiñón.

La etapa de inducción implica el paso del micelio de un estado vegetativo a un estado reproductivo. Esto se logra modificando las condiciones ambientales del cuarto de cultivo como una mayor ventilación, disminución gradual de la temperatura y humedad relativa próxima al 90%. Al inicio de la fructificación, se observan pequeños nódulos de color blanco brillante llamados primordios, los cuáles continúan desarrollándose hasta la formación de los cuerpos fructíferos.

Estudios sobre el control fisiológico de la fructificación, han descrito diversas sustancias con actividad inductora de cuerpos fructíferos en basidiomicetos como monofosfato de adenosina (AMP) y AMP cíclico (cAMP), fenoloxidasas, ésteres de sacarosa y de ácidos grasos, indol, ácido antranílico y otras sustancias de naturaleza desconocida presentes en los extractos de hongos (Kües & Liu, 2000).

2.2.4.7 PRODUCCIÓN Y COSECHA

La producción de hongos ocurre en oleadas llamadas cortes, cosechas o brotes, en las cuales el pico de cosecha se presenta aproximadamente en intervalos de siete días. La mayoría de los cultivadores realizan 3 brotes y termina el ciclo porque la producción declina rápidamente después del segundo corte y puede convertirse en foco de infección del mismo cultivo. El rendimiento generalmente se determina por los kilogramos de champiñones cosechados por metro cuadrado de composta.

Durante esta etapa es importante una adecuada ventilación con aire fresco, lo que reduce el nivel de CO₂ producido por el hongo en crecimiento; sin embargo, la circulación de aire no debe ser excesiva ya que podría reseca la epidermis del producto.



La calidad de los champiñones se determina al momento del corte para evitar mayores manipulaciones al producto. Los factores tomados en cuenta para cosecharlos son madurez y tamaño, lo que determinará la calidad del producto; adicionalmente las operaciones de los cosechadores como un buen corte y evitar mancharlos con tierra de cobertura también influirán en la calidad. Los recipientes donde son recolectados los champiñones deben ser limpios, prácticos y con paredes interiores lisas para evitar el daño del producto.

En México, los tamaños del champiñón son: chico, mediano, grande y abierto; en tanto que para Estados Unidos son: botón, chico, mediano, grande, extra grande y abierto. En ambos países se considera el champiñón abierto como de segunda calidad.



2.2.5 SUPLEMENTACIÓN

2.2.5.1 IMPORTANCIA DEL USO DE SUPLEMENTOS

En el cultivo comercial del champiñón, prácticamente todos los productores suplementan el cultivo con nutrimentos disponibles en el mercado. El uso de suplementos para el cultivo de champiñones comenzó a principios de 1960. Los trabajos de Schisler y Sinden (1962) demostraron que la adición de suplementos ricos en proteínas, durante la siembra o al aplicar la tierra de cobertura, estimulaba la producción y se lograba obtener mayores rendimientos. Sin embargo, se presentaban problemas de sobrecalentamiento y estimulación de mohos competidores.

La suplementación de la composta lograba un aumento significativo en la producción durante el primer brote, presentándose el continuo declive en cada brote sucesivo. Para resolver esto, en la década de 1970, Carroll y Schisler (1976) desarrollaron suplementos de disponibilidad retardada, lo que permitió aumentar la producción más allá de la primera cosecha, consiguiendo un incremento hasta de un 60% en la producción total. La liberación retardada de los nutrimentos se lograba mediante la encapsulación con aceite vegetal de las proteínas parcialmente desnaturalizadas con formaldehído (Royse *et al.*, 1982; Gerrits, 1988; Vijay *et al.*, 2002; Royse *et al.*, 2007).

2.2.5.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS SUPLEMENTOS

Actualmente se encuentran en el mercado, diversas marcas comerciales de nutrimentos de liberación lenta, cuyo contenido en proteína y lípidos es variable. Las materias primas para la elaboración de suplementos se basan principalmente en pastas de oleaginosas como soya y girasol. Estos suplementos son generalmente ricos en carbohidratos, proteínas y lípidos, los cuales pueden favorecer el crecimiento de mohos competidores como *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium*, ocasionando un daño en el cultivo.



Diversos autores han evaluado el efecto de la adición de suplementos durante la siembra o al colocar el material de cobertura para mejorar la producción de champiñones, pese a que se ha observado un mayor rendimiento cuando el suplemento se aplica junto con la tierra de cobertura; la adición del suplemento depende del cultivador.

2.2.5.3 DESARROLLO DE NUEVOS SUPLEMENTOS

En el desarrollo de nuevos suplementos, es importante buscar alternativas nutricionales efectivas en el incremento de la producción durante todos los brotes. Esto además, permite distribuir la producción a lo largo de todo el ciclo de cultivo, mejorando la calidad en los trabajos de cosecha y optimizando el canal de comercialización y su distribución, sin deterioro de la calidad y cantidad del producto en fresco (Beyer & Muthersbaugh, 1996).

La disponibilidad de nutrimentos es especialmente importante durante la fructificación, ya que la concentración inicial de nutrimentos disminuye al avanzar el cultivo (Petrenko *et al.*, 2004). Considerando la capacidad de *A. bisporus* para producir enzimas extracelulares lignocelulolíticas, es posible pensar en el uso de polisacáridos como ingrediente principal en la formulación de nuevos suplementos. Sin embargo, la importancia de la fuente de proteínas y lípidos requiere ser considerada al proponer nuevos suplementos. Es importante para la evaluación de suplementos decidir el nivel de suplementación y contenido de proteína a suplementar, de acuerdo a la calidad de la composta.



2.2.6 APOORTE NUTRIMENTAL

El consumo de alimentos naturales no sólo de buen sabor, sino también inocuos, nutritivos y con propiedades benéficas para la salud, representa la gran tendencia mundial de la alimentación humana en el siglo XXI (Martínez Carrera *et al.*, 2007).

Los hongos comestibles representan una fuente de proteína de buena calidad, contiene todos los aminoácidos indispensables para la vida. La fibra dietética, minerales y vitaminas que aportan y su bajo contenido de lípidos, los ha llevado a ser considerados como alimentos saludables. La composición de los hongos comestibles puede variar considerablemente de acuerdo a la especie, cepa, técnicas de cultivo (incluyendo diferentes sustratos), etapa de desarrollo y condiciones pre- y poscosecha (Beelman *et al.*, 2004).

Cuadro 2.1 Información nutrimental de champiñones blancos frescos.

Por 100 g de porción comestible	Valor ¹	Unidades
Humedad	92.4	%
Contenido energético	22 (94)	kcal (kJ)
Proteínas	3.1	g
Grasa total	0.3	g
Carbohidratos totales	3.28	g
Fibra dietética total	1.0	g
Sodio	5	mg
Cenizas	0.85	g

¹ Valores de acuerdo a National Nutrient Database, USDA & HealthTech Inc., 2007.

En general, los hongos comestibles contienen un elevado porcentaje de humedad, el contenido de materia seca se debe principalmente a las técnicas de cultivo y la etapa de madurez en la cual es cultivado. Para *A. bisporus* varía aproximadamente de 7 a 10 g de sólidos (Cuadro 2.1), de los cuales, se encuentran en mayor proporción los carbohidratos; incluyendo monosacáridos (glucosa), disacáridos (trehalosa), polialcoholes como manitol (20-30% en peso seco) y polisacáridos estructurales como



quitina, componente principal de la pared celular de los hongos y representa el mayor componente del total de fibra dietética. El contenido de quitina en *A. bisporus* es mayor en champiñones cultivados en un estado completo de madurez como sucede con *L. edodes* y *Pleurotus* spp., reconocidos como una buena fuente de fibra (Beelman *et al.*, 2004).

A. bisporus es una buena fuente de vitaminas del complejo B, especialmente riboflavina, también presenta un contenido elevado de niacina, folato y ácido pantoténico. En relación a los minerales, los champiñones proporcionan altas concentraciones de potasio, fósforo, cobre (cofactor del sistema enzimático de tirosinasa) y dependiendo del sustrato, también pueden ser una buena fuente de selenio.

Cuadro 2.2 Porcentaje de IDR por 100 g de champiñones blancos frescos.

Por 100 g de porción comestible	Valores IDR ²		Porcentaje de IDR (%)
	Valor	Unidades	
Proteína	75	g	4.0
Vitamina B1 (Tiamina)	1.5	mg	5.4
Vitamina B2 (Riboflavina)	1.7	mg	23.6
Vitamina B6 (Piridoxina)	2	mg	5.2
Niacina	20	mg	18.0
Ácido fólico	200	µg	8.0
Fósforo	800	mg	10.8

² Ingesta Diaria Recomendada y establecida por el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán para la población mexicana, de acuerdo a la NOM-051-SCFI-1994¹.

En general, los consumidores adquieren champiñones frescos porque disfrutan su sabor y aroma, la mayoría desconoce el valor nutricional y nutracéutico de los champiñones; por ejemplo, la presencia de un antioxidante natural, la ergotionina en concentraciones importantes, incluso a niveles mayores que en el germen de trigo, considerado como su principal fuente natural (Dubost *et al.*, 2007).

¹ Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI-1994. Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados.



2.2.7 PRODUCCIÓN

La producción de hongos comestibles ha ido en aumento en los últimos años, debido a una mayor aceptación de los consumidores por sus propiedades sensoriales, sus cualidades nutricionales, funcionales, y en algunos casos, medicinales; además el mejoramiento tecnológico y la difusión del cultivo comercial de hongos también han contribuido a dicho aumento (Royse, 1997). Se espera que en un futuro, incremente aún más la producción como consecuencia de una mayor demanda del mercado.

Cuadro 2.3 Producción mundial de *Agaricus bisporus* en 2006 (FAO²).

País	Toneladas
China	1,510,035
Estados Unidos	382,542
Países Bajos	245,000
España	137,764
Polonia	135,000
Francia	115,846
Canadá	80,071
Reino Unido	74,000
Otros países	615,725
Total	3,295,983

De acuerdo a Chang (1999), *A. bisporus* representa el 31.8% de la producción total de hongos comestibles y medicinales a nivel mundial, siendo el hongo comestible con mayor producción, seguido de *L. edodes* y *Pleurotus* spp. (25.4% y 14.2% respectivamente). China es el mayor productor de champiñones seguido de Estados Unidos, Países Bajos, España, Francia y Polonia (Chang, 2006).

En Latinoamérica, México es el principal productor, contribuyendo con más del 50% de la producción. La producción de hongos en México fue de 38,000 toneladas para el 2006, la mayor parte de la cual se obtuvo en los estados de México, Guanajuato, Querétaro, Jalisco, Coahuila y Veracruz (Jarquín & Cuevas, 2007).

² FAO. Food and Agriculture of the United Nations (<http://faostat.fao.org>)



La presencia de empresas productoras de hongos está concentrado principalmente en: 1) la empresa Hongos de México, S. A., que genera 45% de la producción comercial de champiñón; 2) la empresa Hongos Leben, S. A., que genera 76% de la producción comercial de setas. La Central de Abastos en el Distrito Federal, en donde se realiza la comercialización de más o menos 30% de la producción total de hongos comestibles cultivados (Martínez Carrera *et al.*, 2007).

2.2.8 CONSUMO

La demanda de hongos comestibles se ha incrementado durante los últimos años, a medida que los consumidores buscan satisfacer sus exigencias nutricionales, mediante alimentos que proporcionen beneficios saludables. En la actualidad, 55% de la producción mundial de *A. bisporus* se procesa para conservar el producto, aproximadamente el 50% de la producción se enlata mientras que el 5% se seca. El resto de la producción (45%) se consume en fresco (USDA, 2006³).

La tendencia en el consumo nacional de champiñones sigue siendo como producto fresco, ya que además de ser una alternativa relativamente barata, es la de mayor acceso para los consumidores. El consumo en fresco, es un segmento del mercado con gran potencial de crecimiento sobre el mercado procesado, principalmente por la actual tendencia a consumir alimentos mínimamente procesados. Incluso, los productos de esta especie se han diversificado, presentando opciones como el champiñón *cremini* y *portobello* (Mayett & Martínez, 2007). Actualmente, existen en el mercado diversas opciones de consumo como la presentación de champiñones enlatados (enteros, rebanados o trozos), deshidratados o congelados.

³ USDA. United States Department of Agriculture (www.usda.gov)



El consumo estimado per cápita en México es 0.38 kg, dado la consolidación e incremento del mercado de hongos frescos y envasados en el país. Sin embargo, aún es menor en relación con otros países; por ejemplo, en Europa se consumen alrededor de 3 kg de hongos por persona por año (Royse, 2007), en tanto que, en Estados Unidos el consumo se ha incrementado continuamente durante las últimas décadas, con un consumo per cápita de 1.82 kg en 2006 (USDA, 2006).

2.2.9 DISTRIBUCIÓN

En México, se estima que aproximadamente 80-90% de la producción de hongos comestibles se comercializa en el Distrito Federal, a través de la Central de Abastos, donde son escasas las bodegas con sistemas de refrigeración apropiada, para la conservación del producto, esto repercute en la calidad, disponibilidad y precios al consumidor (Martínez Carrera *et al.*, 2007).

Los hongos frescos son preferiblemente comprados en mercados públicos (67.2%), supermercados (14.7%) y tianguis (8.6%). El principal desafío para mantener la calidad y seguridad de los productos frescos, como los champiñones, es reducir lo más posible la pérdida de frescura durante todo el proceso logístico de distribuir el producto hasta su destino final (venta al consumidor).



2.3 CALIDAD DEL CHAMPIÑÓN

2.3.1 DEFINICIÓN

Como resultado de la importancia económica del comercio de *A. bisporus*, se ha dado un mayor valor a la calidad de los champiñones. La competitividad en el mercado obliga a los productores a proveer productos de mejor calidad y con una mayor vida de anaquel.

El concepto de calidad se refiere al conjunto de atributos percibidos a través de los sentidos por los humanos, logrando establecer los parámetros deseados para un determinado producto. Para el champiñón, los principales atributos sensoriales establecidos como parámetros de buena calidad son nivel de blancura, textura, grado de madurez y sabor característico, entre otros (Burton *et al.*, 2000).

Cuadro 2.4 Atributos cualitativos de los champiñones (Anantheswaran & Roy, 2002).

Atributo	Énfasis del Consumidor*	Momento del Énfasis
Blancura	3	Punto de venta
Libre de enfermedades visibles	3	Punto de venta
Grado de madurez	3	Punto de venta
Sabor	3	Al consumirlos
Aroma	3	Al consumirlos
Rigidez	3	Al consumirlos
Limpieza	3	Punto de venta
Tamaño y forma	2	Punto de venta
Valor nutritivo	1	-----
Retención de peso	De interés para el detallista	-----

* 3 = Muy Importante; 2 = Menos importante; 1 = No importante

Los consumidores juzgan la calidad de los hongos frescos de acuerdo con el grado de frescura, limpieza y blancura. Otros factores como pérdida de agua y carga bacteriana, también contribuyen indirectamente a los atributos mencionados.



2.3.2 PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS SENSORIALES

- **COLOR**

La blancura es uno de los factores más importantes de la calidad asociada a los champiñones, los consumidores prefieren un color blanco brillante. Mediante una escala monocromática de un refractómetro, se estima el nivel de blancura (L) relacionado con la percepción humana y la reflexión de la luz. Los valores van desde 0 a 100, un valor $L \geq 80$ se considera como aceptable (Gormley, 1975; Brennan *et al.*, 2000).

- **APARIENCIA**

Dentro de la categoría de apariencia, se encuentra el tamaño y forma del champiñón. Se consideran hongos de buena calidad, aquéllos con estípites cortos y velo cerrado, las láminas no deben ser visibles (Wichers *et al.*, 2005). Después de la cosecha, el champiñón continúa en crecimiento, esto se observa por una rápida elongación del estípites, expansión del píleo y por la maduración de sus esporas hasta su descarga (Ajlouni, 1991). Una escala subjetiva con siete estados de madurez fue desarrollada por Hammond y Nichols (1975). Aunque esta escala es arbitraria, el índice de madurez durante el periodo poscosecha es lineal (Burton & Noble, 1993).

- **TEXTURA**

Se relaciona con la firmeza o dureza del champiñón y se define como la resistencia a la deformación por una fuerza mecánica aplicada sobre los champiñones. Se calcula como la energía requerida para la compresión (mJ) (Noble *et al.*, 1997). Rama *et al.* (1995) determinaron la energía requerida para comprimir el tejido 1 mm, observaron una mayor suavidad en las partes laterales del píleo en comparación con la superficie y concluyen que durante el almacenamiento disminuye la firmeza (valores de 0.6 mJ hasta 0.1 mJ después de 4 días a 18°C).



- **SABOR**

El sabor resulta de una interacción compleja de compuestos químicos y la percepción de los sentidos del gusto y olfato. El sabor característico del champiñón es una mezcla de sustancias solubles incluyendo 5'-nucleótidos, glutamato monosódico, aminoácidos libres, carbohidratos solubles y polialcoholes (Tsai *et al.*, 2006). 1-octene-3-ol es el mayor componente del aroma de los hongos, además se considera un estimulante del crecimiento micelial y de la elongación del estípite (Mau *et al.*, 1992).

El deterioro del champiñón fresco, se observa por un oscurecimiento del producto, la abertura del píleo y la exposición de las láminas oscurecidas, así como el alargamiento del estípite y endurecimiento de los tejidos (Figura 2.4).



Figura 2.4 Diferentes estados de madurez de *A. bisporus* (Tsai *et al.*, 2006).



Lukasse *et al.* (2003) establecieron un modelo para predecir la calidad poscosecha de alimentos perecederos, aplicado a champiñones, relacionando los tres principales atributos: color, longitud de estípite y abertura de píleo (Cuadro 2.5). Usualmente, los champiñones que no cumplen con niveles aceptables de alguno de estos atributos, son rechazados inmediatamente por los consumidores.

Cuadro 2.5 Valores de calidad asociados a los tres principales atributos sensoriales de los champiñones frescos evaluados en un lote (Lukase *et al.*, 2003).

Valor	Color	Longitud de estípite	Abertura de píleo
0	Blanco	No crecimiento	Completamente cerrado
1	Oscurecimiento ligero	Primera señal de crecimiento	Primera señal de crecimiento
2	Oscurecimiento moderado	Crecimiento moderado	10 - 20% del lote con primeras señales de crecimiento
3	Oscurecimiento intermedio	Crecimiento intermedio de algunos estípites	20 - 50% del lote con primeras señales de crecimiento
4	Marrón	Crecimiento de la mayoría de estípites	La mayoría de los píleos abiertos
5	Intenso color marrón	Crecimiento de todas los estípites	Todos los píleos completamente abiertos

2.3.3 FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD

2.3.3.1 FACTORES PRECOSECHA

Durante el cultivo, desde la siembra hasta la formación de primordios, la calidad de los champiñones es afectada por: condiciones ambientales (temperatura, humedad, CO₂); agronómicas (cepa, composta, tierra de cobertura); y locales (naves de cultivo, bandejas). Las condiciones ambientales de temperatura, humedad relativa y niveles de CO₂ en los cuartos de cultivo permiten controlar una producción uniforme y de calidad.

Beelman *et al.* (2000) evaluaron la importancia del agua de riego sobre la calidad del champiñón. La adición de cloruro de calcio (CaCl₂) mantiene la blancura de los champiñones, particularmente, reduciendo el oscurecimiento poscosecha del producto.



Al respecto, Kukura *et al.* (1998) mostraron evidencia de que un aumento en el contenido de calcio, resulta en una mayor estabilidad de la membrana vacuolar, lo que limita la posibilidad de interacción entre la enzima PPO y sus sustratos, logrando un menor oscurecimiento de los champiñones.

La tierra de cobertura influye en la firmeza de los champiñones, van Loon *et al.* (2000) evaluaron el efecto de la osmoralidad y espesor de la capa de cobertura, sobre el contenido de sólidos en champiñones como un indicador de calidad. Además, estudios sobre la pasteurización de la cobertura sugieren una mejor calidad poscosecha de los hongos frescos y mayor eficiencia en el producto procesado.

Otro factor importante, es el nivel de CO₂, que se considera un regulador del crecimiento micelial y la morfogénesis del cuerpo fructífero.

2.3.3.2 FACTORES DURANTE LA COSECHA

Al momento de la cosecha, los champiñones pueden sufrir daños en el tejido, ocasionando un rápido oscurecimiento durante el almacenamiento, y consecuentemente, una reducción de la calidad del producto. Los champiñones que van directo al mercado en fresco, deben cosecharse con mayor cuidado (Schaper *et al.*, 1988).

Si los hongos son cosechados en etapas tempranas de madurez, éstos presentan una mejor calidad y vida de anaquel durante su almacenamiento (Beelman *et al.*, 1993). De acuerdo a la experiencia práctica, estípites de menor tamaño mejoran la vida de anaquel por lo que se ha vuelto una práctica común, cortar los estípites tan pequeños como sea posible mejorando la apariencia del producto.

Por el contrario, la abertura del píleo durante el almacenamiento es independiente del tiempo de cosecha, este efecto es influenciado principalmente por el tamaño del champiñón al ser cosechado (Braaksma, 2000).



2.3.3.3 FACTORES POSCOSECHA

Después de la cosecha, el champiñón continúa creciendo como parte de su proceso de senescencia. Durante este proceso, se observa una expansión del píleo, alargamiento del estípite y formación de esporas, esto resulta en un factor negativo de calidad y está asociado a cambios de color, textura y sabor.

Los champiñones son altamente perecederos, su tasa de respiración es relativamente elevada (200 - 500 mg CO₂/kg · h a 20°C) comparada con otros vegetales y frutas, la cuál se incrementa después de la cosecha. La respiración se mantiene por el catabolismo de carbohidratos, manitol, trehalosa y glucógeno, y proteínas solubles (Hammond & Nichols, 1975; Burton *et al.*, 1997).

En el proceso natural de maduración del cuerpo fructífero, se producen esporas. Durante la senescencia, se ha observado un incremento en la actividad de proteasas, provocando una activación de enzimas como quitina sintasa y tirosinasa, lo que resulta en ablandamiento y oscurecimiento de los champiñones (Burton *et al.*, 1995 & 1997). Para mantener el desarrollo y producción de esporas, las proteínas y polisacáridos son degradados y posiblemente movilizados a las células de crecimiento (Eastwood *et al.*, 2000).

Se han investigado reguladores de crecimiento endógenos en *A. bisporus*, Mau *et al.* (1992) demostraron el efecto del ácido octadecanoico (ODA), el cuál estimula el crecimiento micelial y la elongación del estípite. Estudios recientes sobre las citoquininas, hormonas reguladoras del crecimiento en plantas, han mostrado tener un efecto inhibitor en el crecimiento del píleo durante el almacenamiento (Wichers *et al.*, 2005).



2.3.4 VIDA DE ANAQUEL

La preferencia de los consumidores por los hongos frescos cultivados va en aumento cada día y por ello, ha surgido la necesidad de investigar sobre la conservación y manejo poscosecha de los hongos comestibles, en particular de *A. bisporus*.

Los hongos comestibles frescos son altamente perecederos y la calidad se afecta principalmente por la temperatura. Los champiñones se conservan durante 9 días a 2°C mientras que, a 18°C, la vida de anaquel se reduce a 3 días (Lukasse *et al.*, 2003).

2.3.5 OSCURECIMIENTO ENZIMÁTICO

Las reacciones de oscurecimiento en los alimentos son básicamente: reacción de Maillard, caramelización, oxidación del ácido ascórbico, las cuáles son de origen no enzimático; mientras que, el oscurecimiento enzimático ocurre principalmente como resultado de la actividad de tirosinasa, una enzima perteneciente a la familia de las polifenoloxidasas (PPO) (Fennema, 1998). Las reacciones de oscurecimiento tienen como resultado una modificación en las características sensoriales de algunos alimentos como frutas, vegetales, hongos y algunos crustáceos; como consecuencia la calidad del producto disminuye, así como su vida de anaquel lo que lleva a una depreciación económica importante del producto.

Los pigmentos pardos, producto de la polimerización de quinonas, producidas por la oxidación de compuestos fenólicos, provocan el rechazo del consumidor; sin embargo no deterioran el aroma ni el valor nutritivo del producto (Coulter, 1996).

Durante décadas, se ha realizado una extensa investigación sobre los posibles mecanismos responsables del oscurecimiento, así como las propiedades enzimáticas de las polifenoloxidasas, sus sustratos e inhibidores, y los factores químicos, biológicos



y físicos, que afectan cada uno de esos parámetros. Una vez entendidos, estos mecanismos, será posible aplicar métodos para prevenir el oscurecimiento enzimático y de esta manera extender la vida de anaquel del producto.

Soler-Rivas *et al.* (1999) demostraron que la cantidad de compuestos fenólicos presentes en *A. bisporus* y la actividad de PPO son los parámetros más importantes relacionados con la susceptibilidad del hongo al oscurecimiento enzimático.

Básicamente, el oscurecimiento inicia como respuesta a una situación de estrés, principalmente ocasionada por un daño en el tejido durante la senescencia, actividad microbiana y/o daño mecánico (membrana celular) (Beelman *et al.*, 1989; Sapers *et al.*, 1994). Se ha sugerido que el papel de tirosinasa en los champiñones como metabolito de estrés (Beelman *et al.*, 1996).

El deterioro de hongos frescos por microorganismos es causado principalmente por una bacteria *Pseudomona tolaasii* (Soler-Rivas *et al.*, 1999) y tolaisina, una toxina producida por *P. tolaasii*, la cuál presenta un efecto activador de la actividad de tirosinasa, por tanto, induce el oscurecimiento de los cuerpos fructíferos (Soler-Rivas *et al.*, 1999b; Mamoun *et al.*, 1999).

In vivo, el oscurecimiento del champiñón resulta de la oxidación de compuestos fenólicos endógenos. Los sustratos más importantes son L-tirosina y γ -glutaminil hidroxibenzeno (GHB), ambos derivados de la ruta metabólica shikimato (Jolivet *et al.*, 1995). En presencia de tirosinasa, son oxidados a sus correspondientes *o*-difenoles (3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y γ -glutaminil dihidroxibenzeno (GDHB), respectivamente). Estos compuestos son usados como sustratos para la oxidación en sus correspondientes *o*-quinonas (dopaquinona y GBQ, respectivamente), quiénes son altamente inestables y polimerizan rápidamente formando melaninas (Figura 2.5).

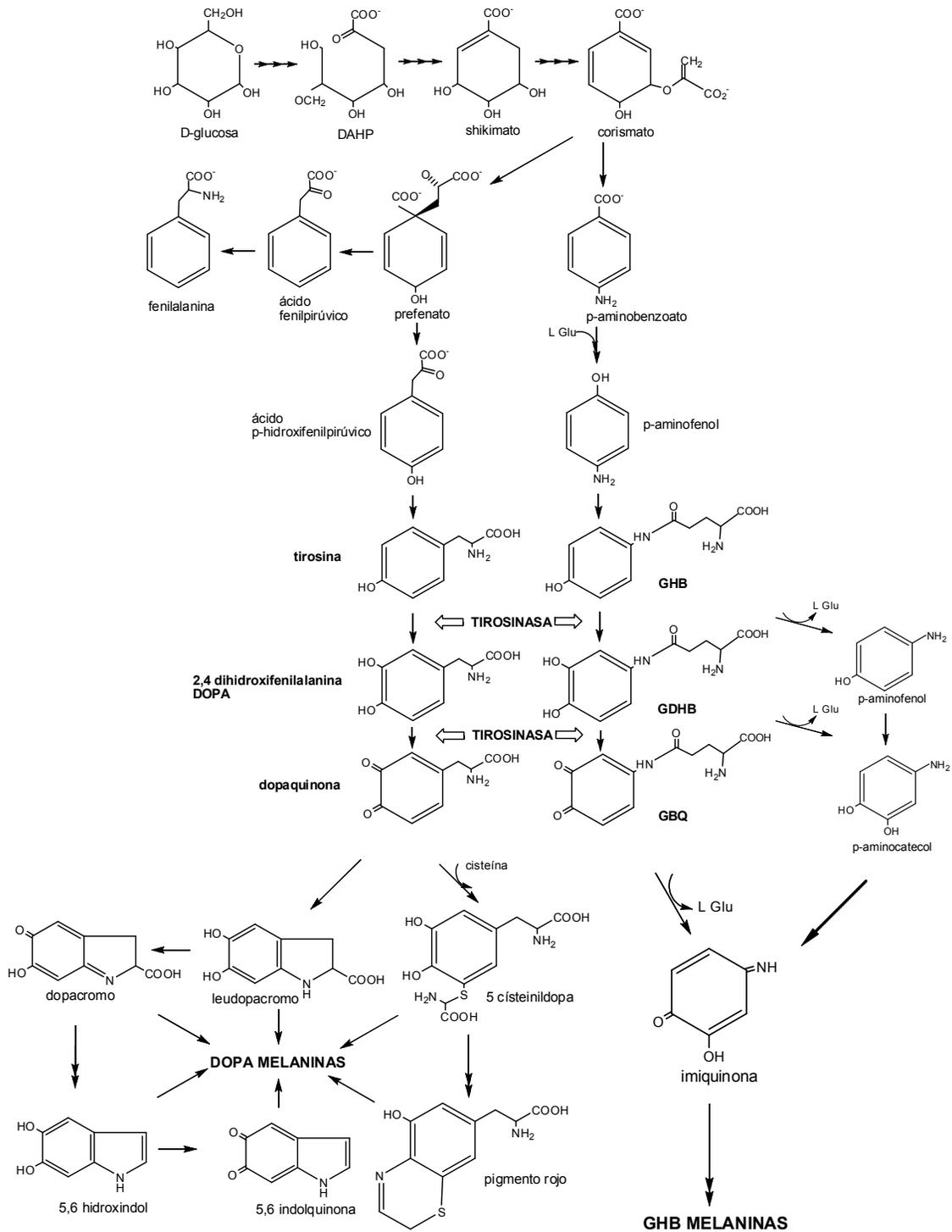


Figura 2.5 Biosíntesis de melaninas en *A. bisporus*, se origina en la ruta metabólica del shikimato derivado del ciclo de Krebs (Soler-Rivas *et al.*, 1999).



Las melaninas son compuestos coloridos cuya función biológica no ha sido definida; sin embargo, es sabido que presentan un sistema de defensa en todos los organismos así como resistencia mecánica al estrés. En los hongos, las melaninas confieren resistencia a ataques microbianos, su importancia radica en la protección contra enzimas hidrolíticas previniendo el rompimiento de la pared celular (Soler-Rivas *et al.*, 1999).

Durante el cultivo, maduración, senescencia, o bien, bajo condiciones ambientales extremas o enfermedades producidas por bacterias, el tejido del hongo sufre daños celulares que provoca la liberación de compuestos fenólicos al citoplasma mientras que el oxígeno penetra al ambiente intracelular. La tirosinasa, situada principalmente en el citosol, actúa con los sustratos iniciando la oxidación enzimática casi inmediatamente (Jolivet *et al.*, 1998).

En la industria alimentaria, el oscurecimiento enzimático es deseable para la producción ciertos alimentos (té, café, cacao), mejorando las características sensoriales (Seo *et al.*, 2003), como sucede en el proceso de fermentación del té verde para la obtención de té negro. Las quinonas son resultado de la oxidación de catequina y equicatequina y precursores de flavinas responsables de su característico sabor y color.

2.3.6 TRATAMIENTOS POSCOSECHA

Los métodos de conservación permiten controlar las causas que ocasionan el deterioro de los alimentos, retrasando la respiración y otros procesos metabólicos, así como la actividad microbiana, por lo que se logra mantener la calidad del producto y extender la vida de anaquel, haciendo posible llegar a mercados más lejanos al lugar de producción.



El retraso poscosecha de los procesos metabólicos puede ser realizado por bajas temperaturas de almacenamiento y por cambios en el microambiente gaseoso de los hongos. Otros métodos incluyen la irradiación con rayos gamma, deshidratación, congelación y esterilización térmica. Estos tres últimos tratamientos, requieren de un previo escaldado, el cuál consiste en sumergir los champiñones en agua hirviendo con 0.05% de ácido cítrico durante pocos minutos logrando inactivar ciertas enzimas, reducir la actividad microbiana y retardar el deterioro del producto.

Las condiciones recomendadas⁴ para el almacenamiento de los champiñones son:

Temperatura de almacenamiento	0°C
Humedad relativa (HR)	90%
Temperatura más alta de congelación	-0.9°C
Vida de almacenamiento aproximada	7 - 14 días
Atmósfera controlada	3 - 21% [O ₂] + 5 - 15% [CO ₂]

La conservación en frío durante el almacenamiento y distribución es necesaria para prevenir el oscurecimiento de los champiñones, las temperaturas de refrigeración (2-4°C) han resultado efectivas en reducir la actividad de PPO.

Los tratamientos poscosecha para prevenir el oscurecimiento enzimático están basados en su mayoría en el uso de agentes reductores, acidulantes, agentes quelantes, inhibidores de PPO, sales inorgánicas así como, control de temperatura y niveles de oxígeno. Es importante destacar que la mayoría de ellos están enfocados al consumo de champiñones enteros.

Los champiñones rebanados tienen una menor vida de anaquel; sin embargo, las tendencias actuales de alimentos listos para comer que demanda el consumidor, ha encaminado a una mayor investigación en tratamientos poscosecha de champiñones rebanados (Brennan *et al.*, 2000; Jacxsens *et al.*, 2001).

⁴ Características y condiciones recomendadas para el almacenamiento por tiempo largo de frutas y hortalizas frescas recopilado por Marita Cantwell (email: micantwell@ucdavis.edu)

Cuadro 2.6 Tratamientos poscosecha para mejorar la vida de anaquel de los champiñones.

TRATAMIENTO	CARACTERÍSTICAS	VENTAJAS	DESVENTAJAS	REFERENCIA
CONSERVACIÓN TEMPORAL				
Almacenamiento a baja temperatura	Relación entre la temperatura y vida de anaquel, a 0-2°C el producto se conserva aceptable durante 5-7 días.	Disminución de: Tasa de respiración y otros procesos metabólicos. Crecimiento de microorganismos. Reacciones químicas relacionadas con deterioro.	Dificultad de mantener cadena de frío durante su distribución.	Sveine <i>et al.</i> , 1967; Cameron & Chapell, 1970; Gormley, 1975
Lavado	Los hongos son lavados con H ₂ O ₂ (3-5%) y se sumergen por 20 segundos en una solución de eritorbato como inhibidor del oscurecimiento y cloruro de sodio. Otros auxiliares de lavado son <i>agentes reductores</i> (bisulfito de sodio, dióxido de azufre, ácido ascórbico), <i>detergentes</i> , <i>ácido cítrico</i> , <i>agentes quelantes</i> (EDTA, ácido aceto-acético); <i>ácidos orgánicos</i> , <i>cloro</i> , <i>retardadores de crecimiento</i> (ácido succínico, benciladenina).	Remueve residuos de tierra de cobertura. Reduce población bacteriana. Inhibe reacciones de oscurecimiento.	Incrementa carga microbiana y favorece crecimiento de bacterias debido a daños mecánicos y absorción de agua.	Mc Connell, 1991; Brenan <i>et al.</i> , 2000; Sapers <i>et al.</i> , 1999 & 2001
Atmósfera modificada	Película polimérica con baja permeabilidad al oxígeno, <i>cloruro de polivinilo</i> (PVC). Relación óptima entre la concentración de O ₂ y CO ₂ Práctica común de perforar las bolsas de PVC para prevenir un ambiente anaerobio, establecido por FDA.	Retarda la senescencia. Menor pérdida de peso. Retrasa crecimiento del píleo y disminuye actividad de tirosinasa; por tanto, menor oscurecimiento del producto.	Complicación para mantener equilibrada la atmósfera interior. Bajas concentraciones de O ₂ en el empaque, condiciones anaerobias adecuadas para el crecimiento de <i>Clostridium botulinum</i> y producción de compuestos volátiles no deseados (etanol, acetaldehído).	Gormley & MacCanna, 1967; Hammond & Nichols, 1975; Burton, 1991; Roy <i>et al.</i> , 1995; Tano <i>et al.</i> , 1999; Myong <i>et al.</i> , 2006

Cuadro 2.6 Continuación....

TRATAMIENTO	CARACTERÍSTICAS	VENTAJAS	REFERENCIA
Irradiación	Champiñones enteros son irradiados con rayos gamma a dosis 1-3 kGy. También se ha evaluado en champiñones rebanados con buenos resultados.	Reduce crecimiento microbiano. Afecta actividad de PPO. Conservan características sensoriales. No se altera integridad de las membranas	Guthrie 1984; Ajlouni, 1991; Lescano, 1994 Beaulieu <i>et al.</i> , 2002; Koorapati <i>et al.</i> , 2004
Congelación	Los champiñones son congelados a -25°C durante 2 horas, previamente son lavados con una solución de metabisulfito de sodio (3 g/L), escaldados durante 20 segundos y enfriados con agua fría por 2 minutos. Se almacenan a -20°C.	Detiene el crecimiento de microorganismos. Disminuye las reacciones de deterioro químico. Conserva la blancura del producto.	Czapski & Szudyga, 2000
CONSERVACIÓN PROLONGADA			
Esterilización comercial	Aumento de la temperatura en un envase herméticamente cerrado a temperaturas de esterilización comercial (121°C, 20 minutos).	Destrucción de microorganismos. Inactivación de enzimas como PPO.	Vivar-Quintana <i>et al.</i> , 1999
Deshidratación Secado con aire	Secado en dos etapas: a) 38 – 43°C b) 77 – 82°C Contenido de humedad 4% mínimo.	Se logra una actividad acuosa (Aw) baja, inhibiendo el crecimiento microbiano y reduce los procesos enzimáticos.	Komanowsky <i>et al.</i> , 1970; Riva <i>et al.</i> , 1991; Walde <i>et al.</i> , 2006
Liofilización	Secado mediante sublimación. Etapa previa de congelación.	Reduce las reacciones de degradación enzimática y no enzimática. Detiene el crecimiento de microorganismos.	Kompany & Rene, 1995



2.4 ENZIMAS POLIFENOLOXIDASAS

Las polifenoloxidasas (PPO) son un grupo de enzimas distribuidas ampliamente entre microorganismos, plantas y animales. Participan en procesos como pigmentación en vertebrados y oscurecimiento enzimático de frutas y vegetales, hongos y algunos crustáceos como camarones y langostas.

La tirosinasa es una enzima polifenoloxidasa (PPO), frecuentemente llamada fenolasa, catecolasa, cresolasa que presenta actividad mono y difenolasa con una amplia variedad de sustratos en hongos y plantas superiores (Ramírez *et al.*, 2003).

La lacasa, otra categoría de PPO, en presencia de oxígeno, oxida *p*-difenoles formando sus respectivas quinonas (actividad difenolasa) cuya principal importancia en el champiñón es la degradación de lignina en la composta (Bonnen *et al.*, 1994). A diferencia de tirosinasa localizada en las células del cuerpo fructífero, lacasa es una enzima extracelular, básicamente presente en el medio.

2.4.1 TIROSINASA

Las reacciones catalizadas por tirosinasa en presencia de oxígeno molecular:

- a) *orto*-hidroxilación de monofenoles, conocida como actividad monofenolasa o cresolasa [EC 1.14.18.1];
- b) oxidación de difenoles a *orto*-diquinonas, conocida como actividad difenolasa o catecolasa [EC 1.10.3.1].

Posterior a la oxidación enzimática, las quinonas producidas reaccionan espontáneamente formando pigmentos coloridos conocidos como melaninas, dependiendo de la intensidad de polimerización, se obtiene el amplio espectro de colores, desde un ligero amarillo hasta café oscuro intenso.

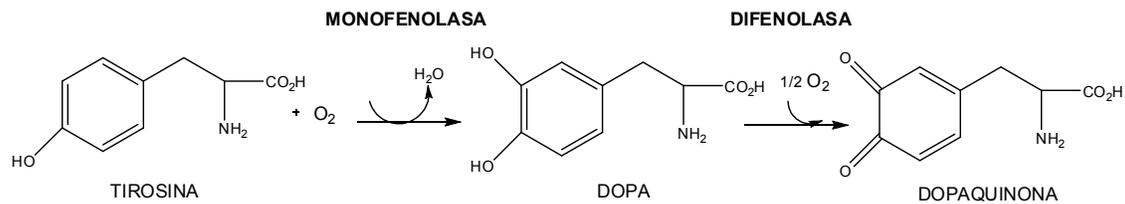


Figura 2.6 Mecanismo de reacción para la formación de o-quinonas a partir de tirosinasa por la oxidación de PPO (Mastore *et al.*, 2005).

In vivo, la tirosinasa es responsable de la biosíntesis de diversos pigmentos durante la maduración de esporas, proceso conocido como melanogénesis y en tejidos reproductivos. Numerosos estudios proponen que la tirosinasa juega un papel importante como mecanismo de defensa contra microorganismos. Tanto las o-quinonas, productos de oxidación, como las melaninas, productos de polimerización presentan gran poder bacteriostático.

2.4.1.1 DISTRIBUCIÓN

La enzima tirosinasa se encuentra distribuida en todo el cuerpo fructífero, principalmente en las láminas, estípites, píleo y epidermis (Vámos-Vigyázó, 1981; Burton, 1993).

La tirosinasa fúngica se localiza en el citoplasma o se encuentra unida a membranas subcelulares (Marusek *et al.*, 2006). En *A. bisporus*, se encuentra en compartimentos celulares distintos de los sustratos; sin embargo, al romperse las células durante la extracción o al sufrir algún daño externo los fenoles son liberados al citoplasma, donde la tirosinasa se activa comenzando la oxidación (Soler-Rivas *et al.*, 1999).



2.4.1.2 PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

La tirosinasa procedente de *Agaricus* es descrita como una enzima tetramérica, compuesta de dos tipos de cadenas polipeptídicas; dos cadenas H (43 kDa c/u) y dos cadenas L (13.5 kDa c/u). También se ha determinado que la unidad heterotetramérica H₂L₂, con una masa molecular de alrededor de 120 kDa, es la unidad mínima con presencia de actividad (Soler-Rivas *et al.*, 1999). En hongos, PPO presenta dos sitios activos donde se unen dos átomos de cobre a residuos de histidina, que pueden existir en tres estados: *deoxi* tirosinasa es la forma reducida de la enzima con Cu⁺ Cu⁺; *met* tirosinasa es la forma oxidada y contiene Cu²⁺ Cu²⁺; y finalmente, *oxy* tirosinasa es la forma oxidada con peróxido, Los tres estados participan durante la actividad monofenolasa y difenolasa de la enzima.

Espín *et al.* (2000) analizaron extractos crudos de *A. bisporus* determinando que la mayor parte de la actividad de tirosinasa (>99%) se encuentra en forma inactiva y durante la maduración del champiñón, es posible detectar niveles mayores de actividad (alrededor 7 - 8%).

La tirosinasa puede ser activada *in vitro* de diversas maneras mediante SDS o compuestos relacionados al proceso de senescencia del hongo (benzilalcohol BA y 1-octen-3-ol) resultando en un cambio conformacional de la molécula (Espín *et al.*, 2000). También se ha sugerido específicamente la participación de serinproteasas en la activación proteolítica *in vitro* de tirosinasa (Burton *et al.*, 1988).

2.4.1.3 SUSTRATOS

Los sustratos más comunes son compuestos insaturados, correspondientes a monofenoles y *orto*-difenoles, como catecol, 4-metilcatecol, ácido 3,4-dihidroxifenolacético, tirosina, L-dopa, dopamina. Para el champiñón, GHB es considerado el principal sustrato de tirosinasa, también se han identificado otros ácidos fenólicos como ácido *p*-cumárico y ácido vainillínico (Dubost *et al.*, 2007). En



manzanas, peras y papas, el principal sustrato es el ácido clorogénico, y en las cebollas el ácido procatequico.

El sustrato GHB se encuentra distribuido en los distintos tejidos del champiñón, pero la mayor concentración se localiza en las láminas > piel > estípites > píleo (Jolivet *et al.*, 1999).

2.4.1.4 INHIBIDORES

Debido al papel tan importante que juega en el proceso de oscurecimiento enzimático en los productos alimenticios, el estudio sobre los posibles inhibidores de tirosinasa continúa siendo un tema de interés para los investigadores. La inhibición enzimática está referida a compuestos quelantes del cofactor de tirosinasa, la presencia de inhibidores competitivos por el sitio activo de la enzima y agentes reductores de los productos de oxidación (Marshall *et al.*, 2000).

Los agentes quelantes, secuestradores de iones metálicos utilizados en la industria alimentaria incluyen ácido sórbico, ácidos orgánicos, polifosfatos, EDTA y monóxido de carbono.

Un importante grupo de inhibidores de PPO está constituido por compuestos estructuralmente análogos a los sustratos fenólicos, tales como L-mimosina, ácido kojico, 4-hexilresorcinol, los cuáles muestran una inhibición competitiva.

Dentro de los agentes reductores se encuentra, el ácido ascórbico, un antioxidante natural, el cuál presenta múltiples efectos sobre la actividad de PPO: quelante de cobre, reduce *o*-quinonas formadas y actúa como un inhibidor competitivo de PPO. Los sulfitos tienen una acción inhibidora específica y resultan ser efectivos para prevenir el oscurecimiento; sin embargo, su uso está restringido debido a su alta toxicidad.



Algunos otros inhibidores del oscurecimiento enzimático son acidulantes como ácido cítrico; ácidos carboxílicos como ácido benzoico y ácido cinámico; y sales inorgánicas como cloruro de calcio.

Actualmente se están investigando inhibidores de tirosinasa provenientes de fuentes naturales como extractos de *Flammulina velutipes* (Jang *et al.*, 2002); flavonoides (Wang *et al.*, 2007); y péptidos derivados de proteínas (ovoalbúmina, caseína, entre otras). Schurink *et al.*, (2007) proponen el uso de péptidos con residuos de arginina y fenilalanina más la presencia de residuos hidrofóbicos (valina, alanina, leucina) para unirse a la estructura de tirosinasa e inhibir su acción.

2.4.1.5 INTERÉS COMERCIAL

Agaricus bisporus es la mayor fuente natural de tirosinasa como producto natural y de especial interés comercial, es la actividad anticarcinogénica que presentan los pigmentos melanoideos provenientes de la acción catalítica de tirosinasa. La melanina es el principal responsable de la coloración de la piel y cabello en los humanos y protegen de la radiación ultravioleta, la cual presenta actividad mutagénica y cancerígena. Las investigaciones se han enfocado en el aislamiento y caracterización de la actividad de tirosinasa para entender la acción de los inhibidores y moduladores involucrados en la melanogénesis. El compuesto melanoideo se ha estudiado mucho en el proceso de pigmentación de la piel, pero también tiene potencial para ser usado industrialmente en algunos productos como protector solar, lentes y plásticos con protección UV y como material conductor. Se ha trabajado en su producción *in vitro* por medio de catálisis enzimática e incluso ha sido posible imitar la polimerización oxidativa de polifenoles de plantas y formar melaninas comercialmente llamadas Phytomelanins (Pezzella *et al.*, 20003).



3. JUSTIFICACIÓN

La suplementación de la composta para el cultivo de champiñones ha permitido obtener mayores rendimientos; y por ello resulta de interés conocer el efecto del uso de suplementos sobre la calidad de los champiñones producidos. En estudios previos, Mau *et al.* (1991) encontraron que la suplementación con fuentes ricas en proteínas y lípidos presenta un efecto positivo en el color y desarrollo poscosecha del producto. Sin embargo, son limitados los estudios sobre el efecto de suplementación en la calidad y vida de anaquel de los champiñones. Dado que, el oscurecimiento enzimático es uno de los principales factores que determina la calidad del producto y la actividad de PPO es el parámetro más importante en la susceptibilidad del champiñón al oscurecimiento, el presente trabajo se enfoca a evaluar la actividad de tirosinasa en champiñones cosechados con distintos tipos suplementos a base de polisacáridos, proteínas y lípidos.



4. OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto sobre la actividad de una polifenoloxidasas (PPO) en champiñones producidos en compostas con distintos tipos de suplementos.

PARTICULARES

- Determinar el contenido de sólidos de los champiñones producidos en compostas con distintos suplementos.
- Establecer la metodología para la determinación de actividad de tirosinasa, perteneciente a la familia de PPO en extractos crudos de champiñón.
- Evaluar el posible efecto del uso de distintos tipos de suplementos sobre la susceptibilidad al oscurecimiento poscosecha del champiñón.
- Correlacionar la actividad enzimática de tirosinasa con el contenido de sólidos como parámetros de calidad en los champiñones frescos.



5. METODOLOGÍA

5.1 DIAGRAMA GENERAL DE INVESTIGACIÓN

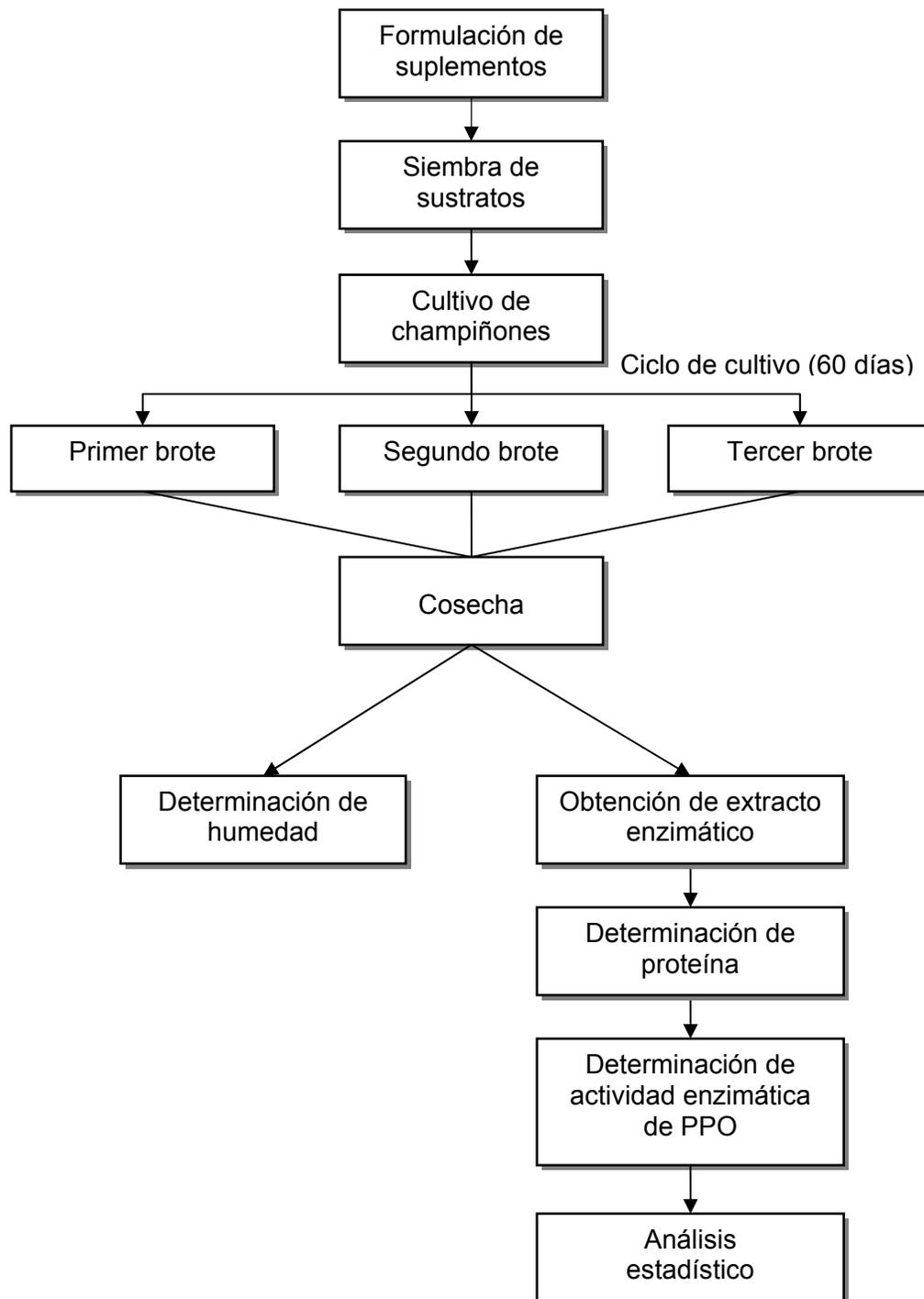


Figura 5.1 Diagrama general de investigación.



5.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para lograr los objetivos planteados, la estrategia experimental consistió en determinar la actividad enzimática de PPO en los champiñones cultivados con distintos suplementos. Los diversos suplementos adicionados a la composta fueron propuestos con el objetivo de conocer su efecto sobre la producción de champiñones, composición química y actividad enzimática de la composta (Arce, 2007); así como la evaluación de la calidad de los champiñones producidos.

5.3 FORMULACIÓN DE SUPLEMENTOS

A nivel comercial, existen distintos suplementos cuya composición química varía así como los rendimientos obtenidos. El suplemento comercial Rendiplus (Rp), a base de soya quebrada, contiene 25% de proteína y 18.1% de aceite (Arce, 2007). Los suplementos propuestos se formularon a partir de salvado de maíz, gluten de maíz y aceite de soya como materia prima. De acuerdo, al contenido de proteína y aceite de los ingredientes, se formularon mezclas entre estos materiales, con el fin de obtener composiciones similares al suplemento comercial.

Cuadro 5.1 Suplementos propuestos para el cultivo de *A. bisporus*.

Suplemento	Código	Composición
Rendiplus	Rp	Suplemento comercial
Salvado	S	Salvado de maíz
Salvado + Gluten	SG	Salvado de maíz + gluten de maíz
Salvado + Aceite	SA	Salvado de maíz + aceite de soya
Salvado + Gluten + Aceite	SGA	Salvado de maíz + aceite de soya + gluten de maíz

A continuación, en el cuadro 5.2 se muestra la composición química de los suplementos formulados y la proporción de uso para ajustar a los valores de proteína y aceite del suplemento comercial. En el caso del suplemento a base de salvado, la fuente principal de nutrimento son polisacáridos; por lo tanto, no se realizó ningún ajuste.



Cuadro 5.2 Composición química de los suplementos propuestos para el cultivo de *A. bisporus* (Arce, 2007).

SUPLEMENTO	Composición (g / 100g materia seca)				
	Cenizas	Grasa	Proteína	Extracto libre de N	Total
Rendiplus	3.4	18.1	25.0	53.5	100.0
Salvado	4.8	1.6	19.0	74.7	100.1
Salvado + Gluten (26:4)	4.5	1.8	24.9	68.9	100.1
Salvado + Aceite (5:1)	4.0	18.0	15.8	62.2	100.0
Salvado+ Gluten+ Aceite (62:21:17)	3.5	18.6	25.0	52.9	100.0

5.4 SIEMBRA

El proceso de cultivo se llevó a cabo en la empresa de Champiñones El Encinal S.A. de R.L., Estado de México. La cepa del hongo comestible *A. bisporus* utilizada fue la cepa Hauser A15 de Sylvan, la cual se prepara como inóculo propagándola en semilla de trigo estéril. Dicha cepa es un híbrido de crecimiento rápido (reduce el tiempo en incubación), produce champiñones con píleo bien definido, velo fuerte, piezas de medio y gran tamaño y provee mejor vida de anaquel (Sylvan, 2007¹). La cantidad de semilla correspondió a 30 g por unidad experimental.

Los suplementos formulados fueron preparados de acuerdo a los procedimientos de elaboración y desinfección de la empresa. La dosificación de los suplementos en la composta fue del 3.3% en peso seco.

Se prepararon bolsas de 3 kg con composta de fase II proporcionada por la empresa. La composta se prepara a partir de paja de trigo y pollinaza, alcanzando una humedad de 68% aproximadamente, después de ser sometida al proceso de fermentación y pasteurización. Para evitar contaminaciones, la siembra se realizó en una zona limpia. Se realizó la distribución homogénea de los suplementos y las semillas en la composta,

¹ Sylvan. Spawn Products (www.sylvaninc.com)



agitando vigorosamente la bolsa; de esta forma, se aseguró el perfecto mezclado de los ingredientes.

De acuerdo a la aleatorización de cada una de las unidades experimentales para los tratamientos, éstas se colocaron en el segundo nivel de un mismo estante de cultivo dentro de los cuartos de producción. Las condiciones ambientales (humedad relativa, temperatura, ventilación) fueron las mismas establecidas por la empresa para el cultivo comercial de *A. bisporus*.

5.5 MUESTRAS

Para el muestreo de champiñones se elaboró un diseño estadístico completamente al azar, con 6 tratamientos por triplicado. Los tratamientos experimentales fueron: composta no suplementada como testigo (**T**), composta con suplemento comercial (**Rp**), composta con salvado (**S**), composta con salvado y gluten (**SG**), composta con salvado y aceite (**SA**) y composta con salvado, gluten y aceite (**SGA**). En total, 18 unidades experimentales por tratamiento por brote. El periodo de cosecha fue durante 24 días, en intervalos de 8 días (3 brotes). Se recolectaron los cuerpos fructíferos en los días de mayor producción y se cosecharon aquellos champiñones con el velo totalmente cerrado. Después de la cosecha, los champiñones se mantuvieron 2 - 4°C hasta la preparación de las muestras en el laboratorio, por un periodo no mayor a 4 horas.



5.6 DESCRIPCIÓN DE METODOLOGÍA

5.6.1 Preparación de muestras

Se seleccionó exclusivamente la parte superior del píleo, excluyendo las láminas situadas debajo de éste. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta realizar las determinaciones. La actividad enzimática de tirosinasa se evaluó únicamente en el píleo, ya que a nivel comercial es la parte de mayor importancia como factor de calidad al momento de la comercialización. Dentro del cuerpo fructífero, el píleo es donde se encuentra la menor concentración endógena de GBH y GDBH, principales sustratos de la enzima en *A. bisporus* (Espín *et al.*, 1999).

5.6.2 Determinación de humedad

Fundamento

Se realizó la determinación de contenido de humedad de acuerdo a la metodología establecida en la AOAC (*Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16^a edición, 1995). El fundamento de la técnica se basa en la pérdida de agua de la muestra por efecto de la temperatura.

Procedimiento

Se pesa la muestra por triplicado (3 - 5 g) en charola de aluminio y se seca en estufa a 60°C durante el tiempo necesario hasta que dos pesadas sucesivas no registren una diferencia de 0.0001 g. Se calcula el contenido de humedad en las muestras.

Cálculos

El porcentaje de humedad se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(\text{Peso inicial} - \text{Peso seco})}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

El contenido de sólidos se determina de la siguiente forma:

$$\% \text{ Sólidos} = 100 - \% \text{ Humedad}$$



5.6.3 Extracción enzimática

Fundamento

Investigaciones anteriores sobre PPO, han encontrado diversas isoformas que presentan actividad de tirosinasa y aún no se conoce con certeza cuál es la conformación mínima con actividad de PPO (Espín *et al.*, 2000). A partir del protocolo propuesto por Juárez (2003) se realizaron algunas modificaciones para obtener el extracto crudo bajo las condiciones óptimas fisiológicas de pH, temperatura, regulación osmótica y de esta manera, prevenir algún daño en la estructura enzimática. El buffer de extracción consiste en una solución de fosfato de sodio 100 mM pH 6.5, PMSF como inhibidor de serinproteasas y sorbitol como regulador osmótico.

Procedimiento

Se pesan 3 - 5 g de tejido y se muele en mortero con hielo seco o nitrógeno líquido hasta obtener polvo fino. Se adiciona buffer de extracción en una proporción de 1 mL por gramo de tejido, a una concentración final de: PMSF 1mM, sorbitol 0.65 M y buffer de fosfato c.b.p. Se homogeneiza perfectamente y se trasvasa cuantitativamente en tubos centrífuga.

La muestra molida se centrifuga a 10 000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a 4°C y se recolecta el sobrenadante. El extracto se conserva -70°C en alícuotas hasta realizar las siguientes determinaciones.



5.6.4 Determinación de actividad enzimática

Fundamento

La tirosinasa cataliza la *orto*-hidroxilación de monofenoles (actividad monofenolasa) y la oxidación de difenoles a *orto*-quinonas (actividad difenolasa). La determinación de actividad enzimática se realiza por medio de un ensayo espectrofotométrico en los extractos de champiñones cultivados. Utilizando L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) como sustrato, la reacción es catalizada por tirosinasa, formando dopaquinona; la cual mediante transformaciones no enzimáticas deriva en dopacromo (compuesto anaranjado) y lentamente se polimeriza hasta la formación de melaninas. La actividad difenolasa (*o*-difenoloxidasas) fue determinada midiendo la acumulación de dopacromo, compuesto colorido que absorbe a una longitud de onda de 475 nm ($\epsilon=3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La reacción se lleva a cabo por triplicado, en medio acuoso a pH = 6.5 (pH óptimo de tirosinasa 6-7), durante 10 min a 37°C con un volumen final de 1 mL (Juárez, 2003). Para comprobar el método y tener un control positivo de la reacción, se evaluó la actividad de tirosinasa comercial de champiñón bajo las mismas condiciones de reacción.

Procedimiento

La reacción enzimática se lleva a cabo en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 100 mM, pH=6.5 y como sustrato para tirosinasa, se emplea L-DOPA a una concentración final de 5 mM. Comienza la reacción cuando se añade 15 - 50 μL de extracto enzimático, dependiendo del contenido de proteína en el extracto crudo. Se ajusta a cero el espectrofotómetro con blanco de referencia y se mide el incremento de absorbancia a 475 nm durante 10 minutos a 37°C.

Nota: para el blanco de referencia se adicionan todos los componentes de la reacción excepto el sustrato.



Cálculos

La velocidad inicial v (μmol L-DOPA por minuto) se calcula con la pendiente de la parte lineal de la curva usando los siguientes cálculos:

De acuerdo a la Ley de Lambert-Beer:

$$C = \frac{\Delta A}{\varepsilon l} = \frac{\Delta A \text{ min}^{-1}}{[\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}][\text{cm}]} = \text{M min}^{-1}$$

Donde ε = coeficiente de extinción molar de L-dopacromo a 475 nm ($3\ 600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

La actividad enzimática se define como los μmoles de dopacromo formados por minuto y su expresión es la siguiente:

$$A = \frac{\Delta A \text{ min}^{-1}}{(\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1})} \times \frac{1}{V_{\text{enzima}} (\text{mL})} \times V_{\text{ensayo}} (\text{mL}) = \frac{\mu \text{ moles}}{\text{min} \cdot \text{mL}} = \frac{\text{U}}{\text{mL}} \text{ Actividad enzimática}$$

Al determinar el contenido de proteína en el extracto enzimático, es posible obtener la actividad específica, como a continuación se indica:

$$A = \frac{\mu \text{ moles}}{\text{min} \cdot \text{mL}} \times \frac{\text{mL}}{\text{mg}_{\text{proteína}}} = \frac{\mu \text{ moles}}{\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{proteína}}} = \frac{\text{U}}{\text{mg}} \text{ Actividad específica}$$

Además, conociendo el contenido de humedad, es posible, calcular la actividad enzimática en la muestra seca, de la siguiente manera:

$$A = \frac{\mu \text{ moles}}{\text{min} \cdot \text{mL}} \times \frac{\text{mL}_{\text{sobrenadante}}}{\text{g}_{\text{champiñones}}} \times \frac{100 \text{ g}_{\text{champiñones}}}{\text{g}_{\text{materia seca}}} = \frac{\mu \text{ moles}}{\text{min} \cdot \text{g}_{\text{materia seca}}} \text{ Actividad en base seca}$$



5.6.5 Determinación de proteína

Fundamento

La determinación de proteína soluble por el método de Bio-Rad está basada en el método propuesto por Bradford (1976). Este método consiste en la unión del colorante ácido azul brillante de Coomassie a la solución de proteína formando un complejo proteína - colorante, lo que produce un cambio de coloración en la reacción como respuesta a la concentración de proteína. El colorante azul de Coomassie se une principalmente a residuos de aminoácidos básicos (especialmente, arginina) y aromáticos (Bio-Rad, 2007). La máxima absorbancia de una solución ácida de Coomassie se encuentra entre 465 nm y 595 nm, cuando la unión de proteínas ocurre. El colorante existe en tres formas: catiónica (roja), neutra (verde) y aniónica (azul). Bajo condiciones ácidas el colorante está predominantemente en su forma catiónica (rojo); sin embargo, cuando la proteína se une al colorante se convierte a un estado desprotonado (azul). Este método es sensible, rápido y con un mínimo de interferencias. Para realizar la cuantificación de proteínas, se compara con una solución estándar de proteína (seroalbúmina bovina) de concentración conocida. Mediante una curva patrón, se interpola la lectura de absorbancia obtenida a 595 nm de la muestra desconocida y se determina la cantidad de proteína presente en la muestra.

Procedimiento

Para la curva patrón, se realizan varias diluciones de una solución stock de ABS 1 mg/mL, en un intervalo de concentraciones de 5 µg/mL hasta 40 µg/mL en un volumen final de 800 µL. se adicionan 200 µL del reactivo Bio-Rad para obtener un volumen total de 1 mL. Se mezclan los reactivos durante 15 segundos, se mantiene la reacción por 5 minutos a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 595 nm. A partir de la ecuación de la recta obtenida de la curva patrón, se determina la concentración de proteína de los extractos crudos de las muestras, siguiendo el mismo procedimiento.



Cálculos

A partir de la ecuación de la recta, se calcula la concentración de proteína en el extracto crudo, y se representa de la siguiente forma:

Ecuación de la recta $y = mx + b$

De acuerdo a la curva patrón $A_{595\text{ nm}} = \left[\frac{\Delta A}{\text{min}} \right] \left[\frac{\mu\text{g}_{\text{proteína}}}{\text{mL}} \right] + b$

∴ la concentración de proteína se calcula mediante la siguiente ecuación :

$$\frac{\mu\text{g}_{\text{proteína}}}{\text{mL}} = \frac{A_{595\text{ nm}} - b}{\Delta A / \text{min}}$$

5.6.6 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con un análisis de varianza para un diseño de tipo factorial aleatorio con una probabilidad de $p \leq 0.01$ con el paquete estadístico SPSS para Windows Versión 11.0 (Statistical Product and Service Solutions). Se realizó la prueba de comparación múltiple de Duncan para clasificar en grupos homogéneos estadísticamente diferentes.



Material biológico

Champiñones (cepa Hauser A15) recién cosechados, cultivados comercialmente en composta fase II con suplementos.

Reactivos

Agua desionizada; albúmina sérica bovina ABS (Sigma); Bradford (BioRad); L-3,4-dihidroxifenilalanina L-DOPA (Sigma); fosfato monobásico de sodio monohidratado NaH_2PO_4 (Sigma); fosfato dibásico de sodio anhídrido Na_2HPO_4 (Fluka); fluoruro de fenilmetilsulfonilo PMSF ($\geq 98.5\%$ pureza, Sigma); sorbitol (Fluka); tirosinasa comercial de champiñón (Sigma).

Soluciones

Extracción enzimática

- Amortiguador de fosfatos pH 6.8. Se prepara una solución 0.1 M de fosfato de sodio monobásico y se ajusta pH con una solución 0.1 M de fosfato de sodio dibásico.
- Sorbitol 3 M
- PMSF 10 mM

Actividad enzimática

- L-DOPA 10 mM. Se prepara una solución de L-DOPA, cuya concentración final en el ensayo enzimático sea 5 mM. ($V_F = 1 \text{ mL}$)

Determinación de proteína

- ABS 10 mg / mL.

Equipos

EQUIPO	MARCA	MODELO
Balanza analítica	Ohaus Explorer	V10640
Potenciómetro	Conductron	pH120
Centrífuga	Beckman	J2-21 M/E
Espectrofotómetro	Beckman Coulter	DU530
Ultracongelador	Puffer Hubbard	IUF7513ABA
Vortex	Scientific Industries	GENIE 2



6. RESULTADOS

La suplementación de la composta para la producción de champiñones incrementa el rendimiento en la cosecha; sin embargo, son pocas las investigaciones sobre el posible efecto del uso de distintos tipos de suplementos sobre la calidad de los champiñones. El presente estudio determina si se presenta alguna influencia en la actividad enzimática de tirosinasa, perteneciente a la familia de las polifenoloxidasas (PPO), principal responsable del oscurecimiento del producto, debido al tipo de suplemento en la composta y/o el brote de cultivo de los champiñones. Se compararon 5 suplementos adicionados a la composta: comercial (**Rp**); salvado (**S**); salvado y gluten (**SG**); salvado y aceite (**SA**); salvado, gluten y aceite (**SGA**); además de composta no suplementada como testigo (**T**). Siendo que, el contenido de sólidos es uno de los principales parámetros de calidad, el efecto del suplemento sobre el contenido de humedad de los champiñones también fue evaluado.

6.1 Contenido de humedad de los champiñones producidos en compostas con distintos tipos de suplementos

El contenido de humedad es un parámetro de calidad importante, relacionado con la firmeza de los champiñones. Desde el punto de vista comercial, cuánto mayor sea el contenido de humedad conviene más a los productores; sin embargo, los consumidores prefieren productos con un mayor contenido de sólidos. Para determinar si existe un efecto del tipo de suplemento sobre el contenido de humedad se determinó el contenido de sólidos en los champiñones cosechados en los tres primeros brotes usando distintos suplementos.

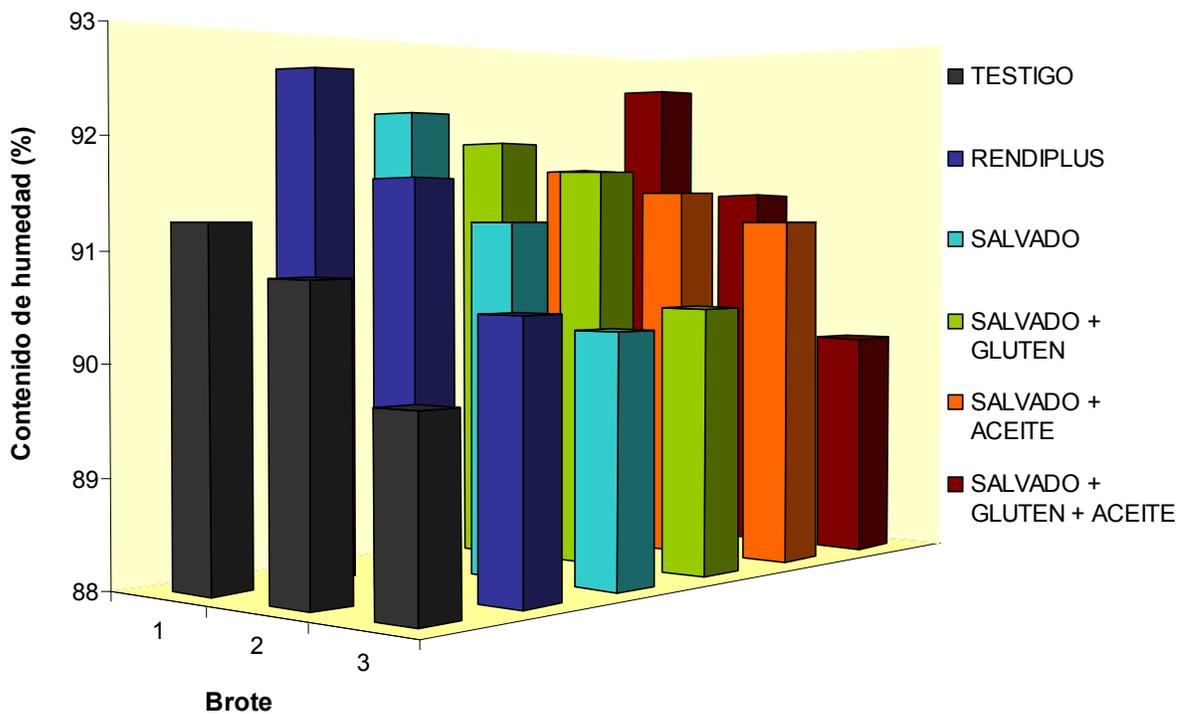


Figura 6.1 Contenido de humedad de los champiñones producidos en compostas con distintos tipos de suplementos.

El contenido de humedad de los champiñones producidos se encuentra entre 89 y 92%. De acuerdo a los resultados obtenidos, el contenido de humedad es afectado por el tipo de suplemento adicionado a la composta y el brote de cultivo.

Como se muestra en la Figura 6.1, el mayor contenido de humedad corresponde a los champiñones cultivados en composta suplementada y conforme el ciclo de cultivo progresa, se observa una disminución en el contenido de humedad independientemente del tipo de suplemento adicionado a la composta. Los champiñones producidos en composta sin suplementar presentan el menor contenido de humedad en los tres brotes lo que sugiere que al suplementar la composta se mejora la captación de agua del micelio resultando en una mayor cantidad de agua en el cuerpo fructífero; lo que indica que parte del incremento en la producción de champiñones con el uso de compostas suplementadas se debe al mayor contenido de agua en el champiñón, adicional al incremento en la biomasa.



En el Cuadro 6.1, se encuentran los valores de humedad para cada uno de los tratamientos. Al realizar el análisis de varianza (Anexo 2, Cuadro A1), se encontró una diferencia altamente significativa entre brote de cultivo y tipos de suplementos así como una interacción altamente significativa entre brotes y suplementos. Mediante la prueba de rango múltiple, se determinaron cuáles grupos mostraban dicha diferencia.

Cuadro 6.1 Contenido de humedad de champiñones producidos en compostas con distintos tipos de suplementos.

BROTE	TIPOS DE SUPLEMENTO	CONTENIDO DE HUMEDAD
		g agua / 100 g producto fresco
1	Sin suplemento	91.25 ± 0.45d
	Rendiplus	92.64 ± 0.29g
	Salvado	92.27 ± 0.55g
	Salvado + Gluten	92.01 ± 0.54g
	Salvado + Aceite	91.76 ± 0.64f
	Salvado + Gluten + Aceite	92.60 ± 0.25g
2	Sin suplemento	90.77 ± 0.31c
	Rendiplus	91.64 ± 0.25f
	Salvado	91.25 ± 0.81d
	Salvado + Gluten	91.72 ± 0.86f
	Salvado + Aceite	91.53 ± 0.42e
	Salvado + Gluten + Aceite	91.51 ± 0.58e
3	Sin suplemento	89.75 ± 0.47a
	Rendiplus	90.47 ± 0.41b
	Salvado	90.29 ± 0.46b
	Salvado + Gluten	90.46 ± 0.33b
	Salvado + Aceite	91.25 ± 0.36d
	Salvado + Gluten + Aceite	90.08 ± 0.37b

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.01$) de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Duncan.

Para el primer brote, los tratamientos **Rp**, **S**, **SG** y **SGA** muestran significativamente el mayor contenido de humedad, mientras que el tratamiento **T** presenta el menor contenido de humedad comparado con los demás tratamientos durante los tres brotes.



Los valores de humedad para **Rp** y **SGA** muestran un comportamiento similar a lo largo de los tres brotes, lo que sugiere que la presencia de la proteína y el aceite adicionados como suplemento a la composta aumenta la capacidad del champiñón para retener agua. Los tratamientos **S**, **SG** y **SA** presentan contenidos de humedad intermedios durante el ciclo de cultivo, con tendencia a disminuir su contenido en los brotes posteriores. El tratamiento **SA**, presentó la menor variación en el contenido de humedad a lo largo del ciclo de cultivo.

Los resultados anteriores se muestran en la Figura 6.2, expresados como contenido de sólidos en los champiñones frescos. El brote de cultivo está relacionado directamente con este parámetro de calidad. De forma empírica, se ha determinado que los champiñones de tercer brote presentan una vida de anaquel más prolongada comparada con los de primer y del segundo brote. Los resultados obtenidos sugieren que el contenido de sólidos está asociado con la mayor vida de anaquel que presentan los champiñones de tercer brote para el consumo en fresco, con o sin suplemento.

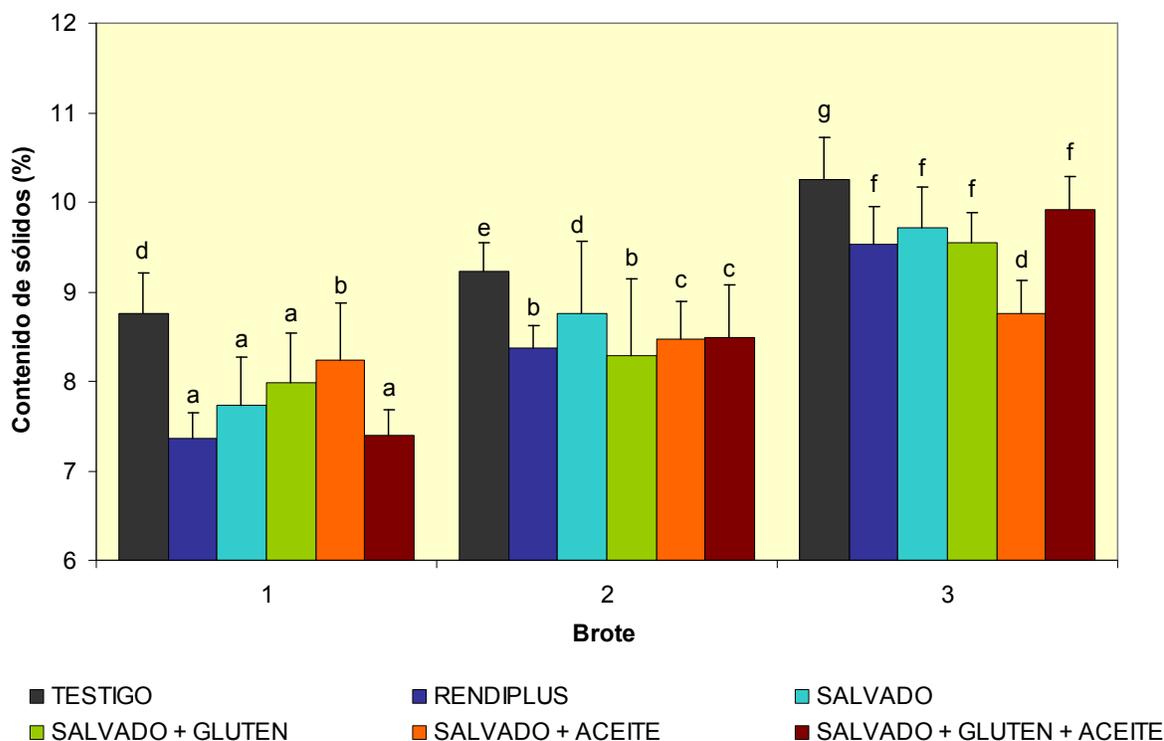


Figura 6.2 Contenido de sólidos de los champiñones producidos en compostas con distintos tipos de suplementos.



5.2 Ensayo para la determinación de actividad enzimática

Para evaluar el efecto de los distintos suplementos sobre la actividad de PPO en extractos crudos de champiñones se determinó la actividad específica. Los extractos crudos fueron obtenidos macerando tejido fresco de los cuerpos fructíferos en presencia de inhibidores de proteasas. La tirosinasa del champiñón presenta actividad mono y difenolasa, oxidando diversos sustratos mono y *orto*-difenoles. En un primer intento, se evaluó la actividad monofenolasa, a partir de fenol, la oxidación de estos compuestos resulta en la formación de quinonas inestables y en presencia de MBTH forman un complejo; sin embargo, el complejo precipita rápidamente lo que impide evaluar correctamente la actividad; además presenta una fase de inducción prolongada.

Posteriormente, se evaluaron las condiciones experimentales propuestas por Juárez (2003), usando como sustrato específico L-DOPA. La actividad difenolasa de tirosinasa se determinó a partir de la oxidación de L-DOPA (5 mM) a pH 6.5, 37°C y durante 10 minutos se midió el incremento en la absorbancia a 475 nm, debido a la formación de dopacromo, compuesto intermediario en la síntesis de quinonas.

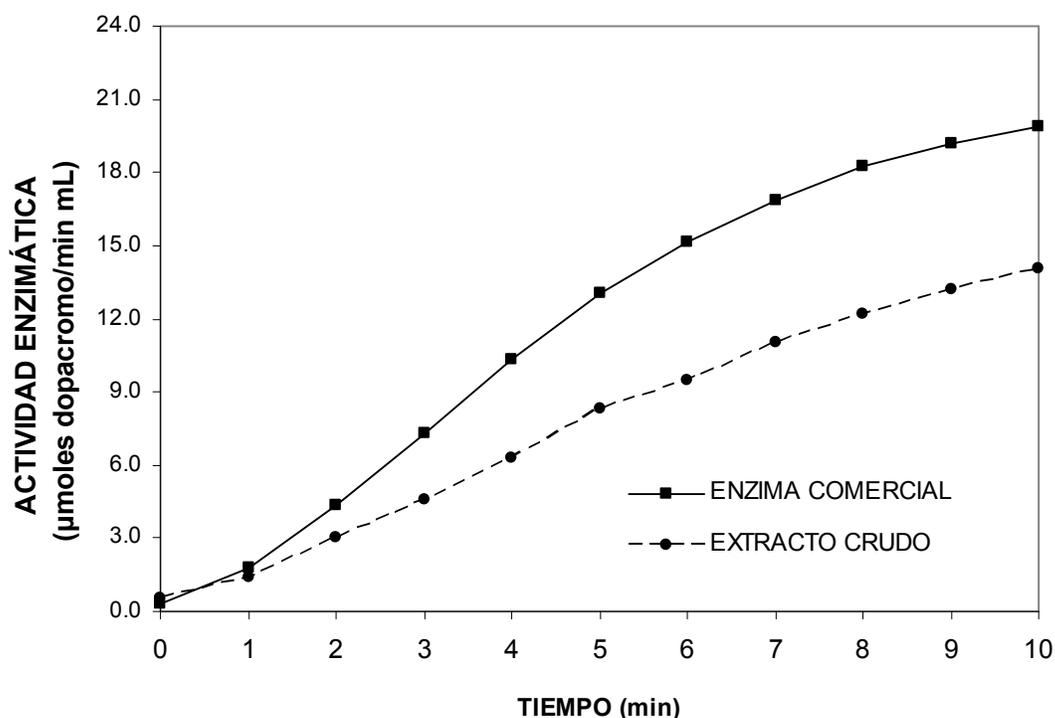


Figura 6.3 Actividad enzimática en extracto crudo de champiñón y enzima comercial.



En la Figura 6.3, se observa un incremento en la actividad debido a la formación de dopacromo a partir de enzima comercial y extracto crudo. La determinación de tirosinasa a partir de L-DOPA resultó ser un método apropiado en extractos crudos de champiñón, porque a pesar de presentar menor actividad en comparación con la enzima pura bajo las mismas condiciones, es posible estimar la actividad de tirosinasa en extractos crudos de champiñones producidos en compostas con distintos suplementos.



6.3 Actividad específica de tirosinasa en extractos crudos de champiñones producidos en compostas con distintos suplementos

Los principales factores que contribuyen al oscurecimiento enzimático en los champiñones son el contenido de compuestos fenólicos y la actividad de PPO así como pH, temperatura y oxígeno disponible en el tejido (Martínez & Whitaker, 1995). Las investigaciones sobre la suplementación para la producción de champiñones han profundizado poco en la calidad de los champiñones frescos producidos. Sin embargo, diversas prácticas durante el cultivo influyen directamente en la susceptibilidad de *A. bisporus* al oscurecimiento. Por lo anterior, se determinó la actividad de tirosinasa en extractos crudos de champiñones y se evaluó el efecto de los distintos tipos de suplementos adicionados a la composta, así como el efecto del brote de cultivo de los champiñones.

Cuadro 6.2 Actividad específica de tirosinasa de champiñones producidos en compostas con distintos tipos de suplementos.

BROTE	TIPOS DE SUPLEMENTO	ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE TIROSINASA
		U mg ⁻¹ de proteína
1	Sin suplemento	0.244 ± 0.015g
	Rendiplus	0.177 ± 0.019d
	Salvado	0.136 ± 0.013c
	Salvado + Gluten	0.189 ± 0.027e
	Salvado + Aceite	0.099 ± 0.010b
	Salvado + Gluten + Aceite	0.081 ± 0.006a
2	Sin suplemento	0.295 ± 0.023h
	Rendiplus	0.213 ± 0.032f
	Salvado	0.293 ± 0.026h
	Salvado + Gluten	0.238 ± 0.028g
	Salvado + Aceite	0.196 ± 0.018f
	Salvado + Gluten + Aceite	0.248 ± 0.017g
3	Sin suplemento	0.294 ± 0.031h
	Rendiplus	0.257 ± 0.019g
	Salvado	0.471 ± 0.058j
	Salvado + Gluten	0.237 ± 0.035g
	Salvado + Aceite	0.244 ± 0.015g
	Salvado + Gluten + Aceite	0.424 ± 0.058i

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.01$) de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Duncan.



En el Cuadro 6.2, se muestra la actividad de tirosinasa inicial de los champiñones al momento de la cosecha. De acuerdo a estos resultados, se observa un incremento en la actividad específica de tirosinasa a partir del primer brote, encontrándose la mayor actividad al tercer brote independientemente del tipo de suplemento adicionado a la composta, incluso en el tratamiento **T**, se observa la misma tendencia. Esto sugiere una dependencia del brote cultivo en la actividad enzimática.

Al realizar el análisis estadístico se encontró una diferencia altamente significativa entre brotes de cultivo y tipos de suplemento; así como una interacción entre brotes y suplementos altamente significativa ($p < 0.01$).

Para el primer brote, en la Figura 6.4, se muestra que la mayor actividad de tirosinasa corresponde al tratamiento sin suplemento **T**, para el segundo brote se observa un incremento del 20% y permanece constante al tercer brote. Para el tratamiento **Rp**, se observa un aumento significativo entre brotes, no obstante, al tercer brote la actividad de tirosinasa es similar a la actividad presentada en el tratamiento control **T** al primer brote; de igual manera sucede en los tratamientos **SG** y **SA**. Los mayores incrementos en la actividad de tirosinasa, durante el tiempo de cultivo se observa para los tratamientos **S** y **SGA**. Ambos suplementos presentan la mayor actividad enzimática al tercer brote (0.471 y 0.424 U mg^{-1} de proteína) comparada con los demás tratamientos.

Con base a lo anterior, el efecto del brote de cultivo de los champiñones conlleva a un aumento altamente significativo en la actividad específica de tirosinasa; por lo que en los últimos brotes es donde se observará una mayor actividad de PPO, lo que sugiere una mayor susceptibilidad al oscurecimiento del champiñón.

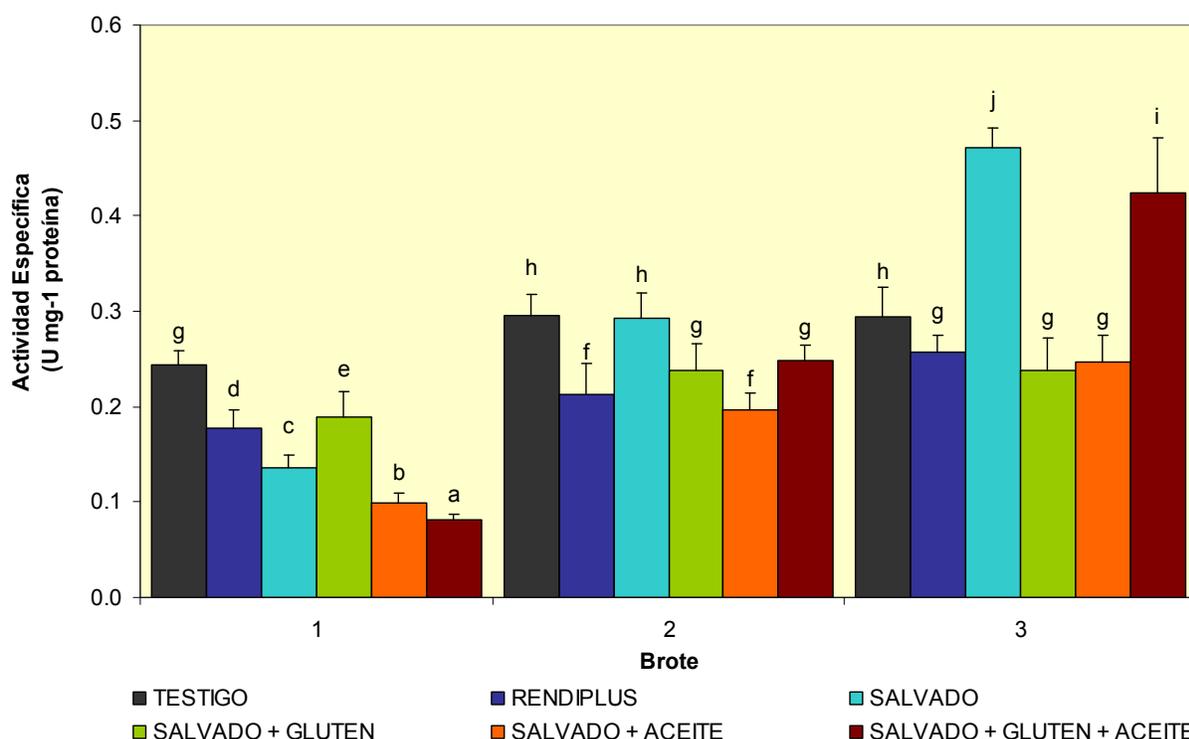


Figura 6.4 Actividad específica de tirosinasa en extractos crudos de champiñones producidos en compostas con distintos tipos de suplementos a lo largo de tres brotes de cultivo.

Por otro lado, se observa un efecto altamente significativo en la actividad de acuerdo al tipo de suplemento adicionado a la composta. Un suplemento basado únicamente en una fuente de carbohidratos (**S**) da como resultado un incremento significativo en la actividad comparado con los tratamientos que contienen proteínas (**SG**) o lípidos (**SA**) además de carbohidratos. En estudios previos se ha encontrado que la suplementación en la composta, a base de fuentes ricas en proteínas o lípidos, presenta un menor oscurecimiento y por lo tanto, mejoran la calidad del producto (Mau *et al.*, 1991).



6.4 Actividad de tirosinasa (en base seca) de champiñones producidos en compostas con distintos suplementos

Como se mostró en la sección 6.1, se encontraron diferencias significativas en el contenido de humedad de los champiñones entre brotes de cultivo y tipos de suplementos. Los valores de actividad específica de tirosinasa, se determinaron en los extractos crudos de los champiñones y es posible que la cantidad de solutos, entre estos proteína soluble, varíe en función del contenido de humedad del cuerpo fructífero. Resulta de interés, referir la actividad específica de tirosinasa en función de la base seca del tejido de champiñón, para comparar el efecto de los distintos tratamientos sobre la actividad de tirosinasa.

Cuadro 6.3 Actividad de tirosinasa (en base seca) de champiñones producidos en compostas con distintos tipos de suplementos.

BROTE	TIPOS DE SUPLEMENTO	ACTIVIDAD DE TIROSINASA
		U / g de muestra seca
1	Sin suplemento	17.5 ± 2.2e
	Rendiplus	17.8 ± 2.4e
	Salvado	11.1 ± 1.8b
	Salvado + Gluten	15.3 ± 0.6d
	Salvado + Aceite	9.9 ± 1.1a
	Salvado + Gluten + Aceite	10.0 ± 0.9a
2	Sin suplemento	25.8 ± 1.7g
	Rendiplus	13.4 ± 2.2c
	Salvado	21.5 ± 4.6f
	Salvado + Gluten	28.8 ± 3.6h
	Salvado + Aceite	17.5 ± 1.8e
	Salvado + Gluten + Aceite	18.5 ± 1.7e
3	Sin suplemento	32.4 ± 4.7i
	Rendiplus	26.1 ± 3.6g
	Salvado	52.7 ± 3.4j
	Salvado + Gluten	27.4 ± 2.4h
	Salvado + Aceite	19.0 ± 2.1f
	Salvado + Gluten + Aceite	32.2 ± 5.0i

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.01$) de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Duncan.



Al realizar el análisis estadístico, continuó presentándose una diferencia altamente significativa entre los tratamientos debida al brote de cultivo y tipos de suplementos adicionados a la composta.

Los resultados obtenidos presentan un incremento altamente significativo en la actividad de tirosinasa del primer al segundo brote, encontrándose la mayor actividad al tercer brote para todos los tratamientos, excepto **Rp**, donde la actividad disminuye durante el segundo brote e incrementa para el tercer brote. En el tratamiento control **T**, se observa un continuo incremento en la actividad, alcanzando un valor de actividad de aproximadamente 32 U g⁻¹ en muestra seca, igualmente sucede en el tratamiento **SGA**. Al tercer brote, los menores valores de actividad se encontraron en los tratamientos **SG**, **SA** y el suplemento comercial **Rp**. Por el contrario, en el tratamiento **S** se obtuvo el valor más alto de actividad (52.7 U g⁻¹ muestra seca).

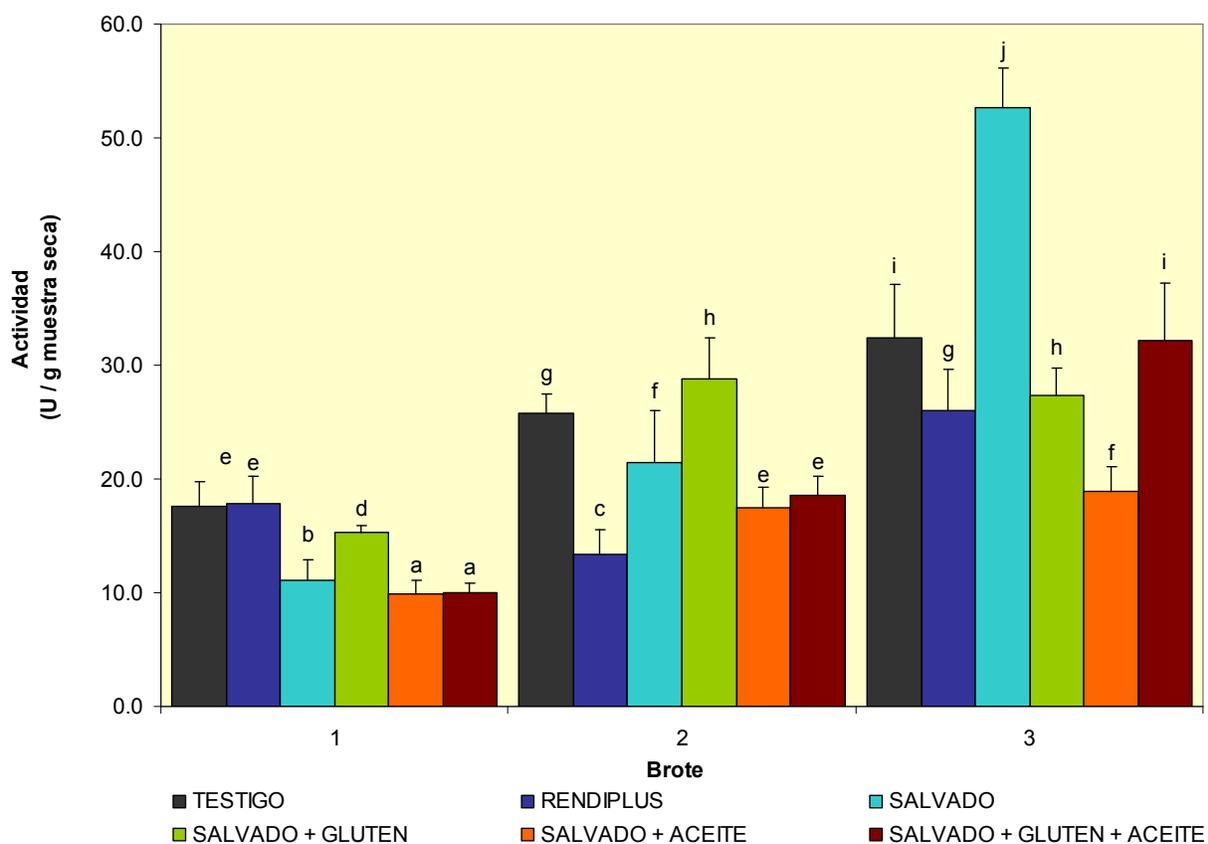


Figura 6.5 Actividad de tirosinasa (base seca) en champiñones producidos en compostas con distintos tipos de suplementos a lo largo de tres brotes de cultivo.



6.5 Relación entre el contenido de sólidos y la actividad de tirosinasa en champiñones producidos en compostas con distintos suplementos.

Previas investigaciones, han relacionado el contenido de sólidos con la calidad poscosecha del champiñón, principalmente debido a su relación con la firmeza del tejido, presentando mayor resistencia al daño mecánico y al ataque microbiano. Esto resulta interesante, desde el punto de vista de mantenimiento de calidad, ya que se busca que los champiñones cultivados mantengan una buena firmeza y sean menos susceptibles al oscurecimiento.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró una correlación altamente significativa entre el contenido de sólidos con la actividad enzimática ($R = 0.7513$, G.L. 16, $p < 0.01$). En la Figura 6.6 se observa una tendencia positiva en el incremento de sólidos y la actividad de tirosinasa independientemente de la adición de un suplemento a la composta.

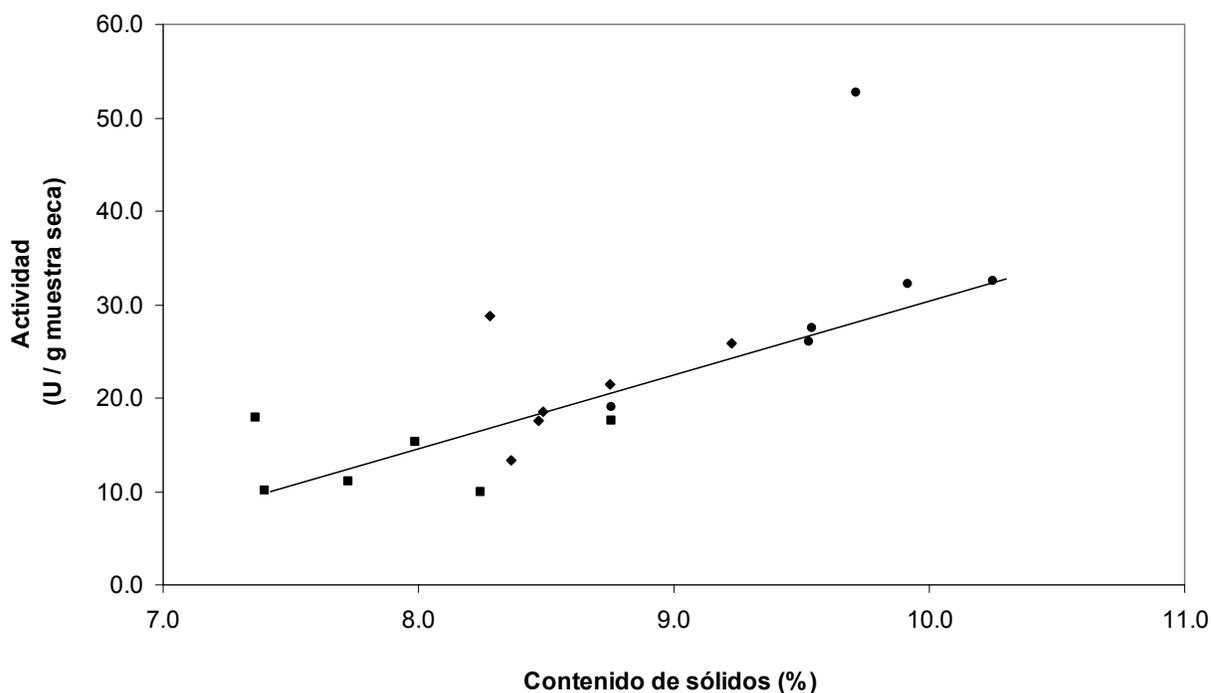


Figura 6.6 Relación entre el contenido de sólidos y la actividad de tirosinasa en champiñones producidos en compostas con distintos tipos de suplementos.



La relación sólidos/actividad de tirosinasa proporciona herramientas necesarias para determinar la calidad del champiñón al momento de ser cosechado. De acuerdo a la Figura 6.6, un alto contenido en sólidos está relacionado con una elevada actividad de PPO, lo que sugiere que son más propensos a un deterioro poscosecha. Sin embargo, dicha tendencia se encuentra influenciada significativamente por el brote de cosecha. De esta manera, los champiñones de primer brote (representados en cuadrado) presentan un bajo contenido en sólidos y la actividad de tirosinasa es menor comparada con los champiñones de tercer brote (en círculo), en los cuáles se encontró el mayor contenido de sólidos; sin embargo, la actividad enzimática presenta un aumento significativo.



7. DISCUSIÓN

La suplementación de la composta representa una alternativa para incrementar la producción de *Agaricus bisporus*. Recientemente, Arce (2007) evaluó la producción de *Agaricus bisporus*, con suplementos basados en polisacáridos. En su trabajo mostró que los suplementos basados en una fuente de polisacáridos presentan diferencias con respecto a la composta no suplementada en la producción por brote y la producción total acumulada. Observó un incremento en la producción, al combinar una fuente de polisacáridos con proteína **SG** o con aceite **SA**. Sin embargo, la mayor producción, se logró con los tratamientos ricos en proteína (25%) y lípidos (18%) **Rp** y **SGA**, lo que sugiere la importancia de una fuente simultánea de materiales ricos en proteína y lípidos para incrementar la producción durante el ciclo de cultivo.

El champiñón es un producto altamente perecedero. La importancia económica y el aumento en la demanda del comercio de champiñones frescos han llevado a los cultivadores a ofrecer productos de mejor calidad con una mayor vida de anaquel. Los consumidores consideran como factores determinantes de la calidad en los champiñones el nivel de blancura, tamaño del píleo y estípite, firmeza, sabor y aroma.

El oscurecimiento del producto ha sido un factor importante en la calidad del producto de ahí que el estudio de los factores involucrados sea uno de los objetivos principales para conservar el producto fresco por más tiempo. La tirosinasa es la enzima responsable del oscurecimiento enzimático (Martínez & Whitaker, 1995) junto con el contenido de compuestos fenólicos presentes en el champiñón. En el cuerpo fructífero, se ha encontrado la mayor actividad de tirosinasa en lamélas, estípite y piel (Zhang & Flurkey, 1997); sin embargo, en esta investigación se evaluó la actividad en el píleo superior ya que se desea conocer la actividad enzimática donde afectará en gran medida a la calidad del producto.



7.1 Ensayo para la determinación de actividad de tirosinasa

El método espectrofotométrico para determinar la actividad enzimática de una PPO es el más conveniente, sensible y rápido, ya que los productos de la reacción son compuestos coloridos. Dentro de la búsqueda para determinar las condiciones adecuadas para el ensayo, se encuentra la elección del sustrato. Los sustratos más recomendados para medir actividad de tirosinasa son ácido caféico, 4-metilcatecol o L-DOPA. La determinación de la actividad se realiza principalmente en la presencia de difenoles (actividad difenolasa) debido a la fase de inducción prolongada que presenta la hidroxilación de monofenoles (actividad monofenolasa).

Los agentes reductores como ácido ascórbico, así como inhibidores naturales presentes en algunos tejidos es una complicación que usualmente conllevan estas determinaciones. Se ha sugerido la purificación parcial de la enzima para una mejor estimación de la actividad. Sin embargo, la ventaja del extracto crudo para determinar la actividad de tirosinasa es poner en evidencia las distintas isoenzimas presentes en el champiñón. El comportamiento cinético de tirosinasa presente en el champiñón ha sido estudiado previamente (Juárez, 2003; Wang *et al.*, 2007), la oxidación de L-DOPA describe una cinética tipo Michaelis-Menten.

7.2 Efecto de la suplementación sobre la actividad de tirosinasa en los champiñones.

Como se mencionó anteriormente, después de la cosecha, los champiñones continúan desarrollándose. Los cambios observados son abertura del píleo y elongación del estípite, producción de esporas y oscurecimiento del tejido. La maduración influye directamente en la apariencia del champiñón, por lo que en conjunto, estos cambios son considerados como factores negativos de calidad.



La vida de anaquel del champiñón es relativamente corta, debido al oscurecimiento enzimático durante el almacenamiento. Las reacciones de oscurecimiento están asociadas al daño mecánico durante la manipulación, lavado, senescencia, tiempo de cosecha (brote) e infecciones bacterianas (Zhang & Flurkey, 1997).

Los resultados obtenidos al evaluar la actividad enzimática de tirosinasa en extractos crudos de champiñones cultivados con distintos tipos de suplementos indican una influencia del brote de cosecha sobre la actividad enzimática independientemente del tipo de suplemento utilizado. Se encontró una mayor actividad específica de tirosinasa para el tercer brote, en comparación con los dos primeros.

De acuerdo a lo sugerido por Carey & O'Connor (1991) la calidad del champiñón puede estar determinada por las condiciones de cultivo (cepa, calidad de la composta y suplementos, temperatura, humedad, material de cobertura, riegos, ventilación, tiempo de cultivo). Wichers *et al.* (2005) mostraron diferencias en la velocidad de crecimiento del píleo durante el almacenamiento a 18°C entre cepas comerciales y brote de cosecha.

En cuanto a la influencia en la calidad y vida de anaquel de ciertas prácticas realizadas durante el cultivo de *Agaricus*, Beelman *et al.* (1993) reportaron un mayor nivel de blancura al momento de la cosecha de champiñones de primer y segundo brote que recibieron agua de riego adicionada con cloruro de calcio. Se ha observado también la influencia del grado de maduración de los champiñones al momento de la cosecha. Estos autores mostraron que los hongos cosechados en etapas tempranas de madurez presentan una menor velocidad de oscurecimiento durante su almacenamiento, la cuál también se ve influenciada por el brote de cosecha.



La influencia del brote de cosecha sobre la calidad ha sido estudiada por diversos autores:

Bartley *et al.* (1991) encontraron que los champiñones de primer brote eran más blancos a la cosecha y permanecían con un nivel aceptable de blancura durante el almacenamiento comparados con el segundo brote, los cuáles a su vez, se oscurecían más lentamente que los del tercer brote.

De acuerdo a Beelman & Simons (1996) la actividad relativa de tirosinasa se incrementa a lo largo de tres brotes de cultivo, presentando la mayor actividad al tercero. Observaron además una reducción en los valores L (blancura) entre cada brote, sugiriendo una estrecha relación entre la actividad de PPO y el deterioro por oscurecimiento del producto.

Sapers *et al.* (2001) evaluaron la susceptibilidad a oscurecerse en champiñones tratados con H₂O₂ e inhibidores del oscurecimiento, encontrando que los champiñones de segundo brote presentaron un mayor oscurecimiento, esto se relacionaba directamente con el grado de lesión presente en el tejido después de 8 días de almacenamiento.

Las evidencias anteriores prueban la influencia del brote de cosecha sobre la calidad del champiñón, principalmente el efecto sobre el oscurecimiento y la actividad de tirosinasa. Sin embargo, las investigaciones sobre el efecto del tipo de suplemento adicionado a la composta son escasas.

Mau *et al.* (1991) evaluaron el uso del suplemento Spawn Mate II, una mezcla de carbohidratos simples y proteínas (27%) a la siembra, logrando incrementar el rendimiento de los champiñones. De acuerdo a los autores, la suplementación no afecta el contenido de sólidos, lípidos, composición de ácidos grasos y componentes de sabor (1-octec-3-ol) en los champiñones. Además observaron mejores resultados en cuanto a color para los primeros dos brotes al adicionar el suplemento al momento de la cobertura.



En esta investigación, se encontró un efecto del tipo de suplemento adicionado a la composta sobre la actividad de tirosinasa al momento de la cosecha. Para los dos primeros brotes, la actividad de tirosinasa de los champiñones cosechados con suplementos es menor con respecto al control (composta no suplementada). Al tercer brote se alcanzan las actividades más altas en los tratamientos **S** y **SGA**, mientras que la actividad enzimática de **Rp**, **SG** y **SA** es similar a la actividad mostrada por el control **T** al primer brote. Como se ha mencionado, la suplementación con nutrientes principales como polisacáridos (salvado), en combinación con aceite o gluten, incrementa el rendimiento; sin embargo, una fuente simultánea de lípidos y proteínas logra una mayor producción. El efecto sobre la actividad de tirosinasa sugiere que una fuente de polisacáridos como suplemento repercutirá en una mayor susceptibilidad al oscurecimiento enzimático debido al incremento en los niveles de actividad. No obstante, es posible que la adición de una fuente de proteínas (gluten) y/o lípidos (aceite) al suplemento basado en salvado, permita obtener champiñones con una menor actividad enzimática al momento de la cosecha, lo que eventualmente repercutirá en un menor oscurecimiento del producto durante su almacenamiento.

Burton *et al.* (1993) demostraron que la actividad de tirosinasa permanece constante en el champiñón, después de 5 días de almacenamiento a 18°C y HR 90-95%; además el contenido de compuestos fenólicos tampoco presenta ninguna variación (Beaulieu *et al.*, 2002). Sin embargo, el oscurecimiento de los champiñones continúa por lo que se postularon dos posibles explicaciones: (a) la tirosinasa es activada y (b) los sustratos interactúan con la enzima. Durante el proceso natural de senescencia del champiñón se ha visto un incremento en la actividad de proteasas, activador enzimático de tirosinasa (Burton *et al.*, 1993) y aunque no hay evidencia clara, se ha indicado que durante el envejecimiento poscosecha del tejido, ocurre una ruptura en las membranas intracelulares permitiendo una mayor interacción de los sustratos fenólicos con la enzima (Burton, 1993).



7.3 Efecto de la suplementación sobre el contenido de humedad de los champiñones.

El contenido de humedad de los champiñones es una herramienta valiosa para determinar su calidad, el contenido de sólidos presenta una correlación lineal con la firmeza del champiñón. Los consumidores prefieren champiñones con textura firme, lo que evita la menor pérdida de peso durante la cocción. De forma semejante, los procesadores de champiñón, prefieren altos contenidos de sólidos, lo que incrementa el rendimiento después de los procesos de enlatado o congelación. Por otra parte, el cultivador de champiñones busca que los cuerpos fructíferos capten la mayor cantidad de agua, lográndose un aumento en la producción total.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el brote de cosecha influye significativamente sobre el contenido de humedad de los champiñones, se observó una mayor concentración de sólidos en el tercer brote, en los tratamientos con y sin suplementos. Estas diferencias en el contenido de humedad indican una respuesta a la reducción de H₂O disponible en la tierra de cobertura y la composta en los brotes sucesivos (van Loon *et al.*, 2000). De ahí la importancia del riego durante el proceso de producción para mantener los niveles adecuados de humedad. Sin embargo, Schroeder y Schisler (1981) encontraron que la suplementación de la composta a la siembra no afecta el contenido de humedad en la tierra de cobertura. Además observaron, que el contenido de materia seca en champiñones de primer brote cultivados con suplementos era mayor que aquellos sin suplemento. Estos últimos resultados contrastan con los obtenidos en esta investigación. Los champiñones cultivados con cualquiera de los suplementos empleados presentan un contenido mayor de humedad, comparado con los champiñones de composta no suplementada. Esto sugiere que la suplementación facilita la capacidad del cuerpo fructífero para absorber el agua, principalmente del material de cobertura.



No obstante, la adición de suplementos no es el único factor que afecta el contenido de humedad, sino también se encuentra una relación con la calidad de la composta, el lugar y las condiciones de cultivo. Kalberer (1995) determinó la influencia sobre el contenido de humedad de los cuerpos fructíferos debida al material de cobertura; el potencial acuoso del sustrato y la cobertura; y el momento de cosecha del champiñón. En su trabajo sugiere que para obtener cuerpos fructíferos con un elevado contenido de sólidos, los champiñones deben ser recolectados en etapas tempranas de crecimiento y el material de cobertura debe estar aplicado en una capa delgada y con un potencial acuoso bajo.

El contenido de humedad también está asociado al rendimiento; al respecto van Loon *et al.* (2000) observaron que el aumento en la materia seca de los champiñones coincidía con el declive en el rendimiento en cada brote. Resultados fueron obtenidos por Arce (2007) en donde el menor rendimiento se presentó al tercer brote y de acuerdo a los resultados de esta investigación, dichos champiñones presentaron el mayor contenido de sólidos.

Después del primer brote, los nutrimentos en la composta disminuyen su concentración drásticamente y el uso de suplementos de liberación retardada aporta los nutrimentos necesarios para el crecimiento de los siguientes brotes. Los resultados de la determinación de sólidos muestran una disminución significativa de estos al usar suplementos en comparación con la composta no suplementada. Posiblemente, el menor contenido de sólidos en los champiñones cultivados con compostas adicionadas de suplementos está asociado con el incremento en el rendimiento, ya que éste resulta de una mayor absorción de agua del cuerpo fructífero. Los tratamientos con suplementos ricos en proteína (25%) y lípidos (18%), **Rp** y **SGA**, presentaron patrones similares en el contenido de sólidos ya que la composición química de los suplementos es muy semejante. De acuerdo a estos resultados, aparentemente, la captación de agua por el cuerpo fructífero encuentra cierta limitación con la suplementación con polisacáridos, ya que siendo el principal componente de los tratamientos **S**, **SG** y **SA**, los champiñones obtenidos presentan un mayor contenido de sólidos. Los champiñones



de composta sin suplemento, presentan los más altos contenidos de sólidos a lo largo de los tres brotes de cultivo.

7.4 Efecto de la suplementación sobre la relación sólidos / actividad enzimática en los champiñones.

Los parámetros de humedad / sólidos están más asociados a la firmeza del tejido, sin embargo, también se ha encontrado una relación estrecha con los niveles de blancura y la pérdida de peso durante el almacenamiento. Los champiñones con un menor contenido de sólidos, son más susceptibles al deterioro por pérdida de blancura y de peso durante su almacenamiento (7 días, 8°C, HR 90%), esto de acuerdo a van Loon *et al.* (2000).

Respecto a la conservación del producto, Kalberer (1990) encontró que las células del píleo de los cuerpos fructíferos con alto contenido de materia seca, presentan concentraciones elevadas de manitol. Se ha sugerido que una alta concentración de manitol está relacionada con una vida de anaquel más prolongada.

Al correlacionar los resultados de actividad tirosinasa de los champiñones y el contenido de sólidos se presenta una correlación positiva, indicando una mayor actividad de tirosinasa en champiñones con el mayor contenido de sólidos obtenido en los champiñones cultivados. Sin embargo, esta correlación posiblemente se encuentre más influenciada por el brote de cosecha, de manera que los champiñones de primer y segundo brote, que presentan una menor susceptibilidad al oscurecimiento por actividad enzimática, resultan más adecuados para el consumo en fresco, y aunque pueden ser más propensos al deterioro dado el contenido elevado de agua presente, la importancia de mantenerlos a bajas temperaturas logrará inhibir el crecimiento microbiano y el oscurecimiento. Por otro lado, los champiñones de tercer brote con el mayor contenido de sólidos, posiblemente tengan una mayor aceptación en la industria de alimentos procesados, donde el control enzimático se controla por el uso de altas temperaturas mediante el escaldado térmico.



8. CONCLUSIONES

- ✓ En este trabajo se logró conocer el efecto de la suplementación de la composta sobre la calidad de los champiñones producidos. Se determinó la actividad de tirosinasa observando una influencia del suplemento en los niveles de actividad.

- ✓ La actividad enzimática fue menor en los champiñones cultivados con algún tipo de suplemento comparada con aquellos producidos en composta sin suplementar.

- ✓ Se encontró una influencia significativa por el tiempo de cosecha, presentándose los mayores niveles de actividad en el tercer brote independientemente de la adición o no de algún suplemento.

- ✓ Dentro de los suplementos propuestos, se observó que una fuente de proteína y lípidos incrementa la producción y además disminuye los niveles de actividad, lo que probablemente derive en una menor susceptibilidad al oscurecimiento por la acción de la tirosinasa.

- ✓ Los suplementos basados únicamente en polisacáridos, presentaron una mayor actividad de la enzima lo que se refleja en una menor calidad del producto.



- ✓ La presencia de suplementos está relacionada con la capacidad del cuerpo fructífero para absorber agua del material de cobertura y composta.

- ✓ Se determinó un menor contenido de sólidos en los champiñones producidos con suplementos, comparado con el control (composta sin suplemento).

- ✓ El efecto del uso de suplementos sobre algunos de los parámetros de calidad indicó que los suplementos muestran un efecto positivo, respecto al oscurecimiento enzimático, ya que disminuye la actividad de tirosinasa, lo que indica una menor susceptibilidad al oscurecimiento del producto. No obstante, se observó un efecto en sentido opuesto respecto al contenido de sólidos ya que este disminuyó al suplementar la composta.



9. PERSPECTIVAS

Dado que se ha observado un efecto de la suplementación sobre la calidad del champiñón, se propone evaluar el efecto del uso de suplementos en compostas sobre la vida de anaquel del producto. Y resulta de interés conocer otros parámetros relacionados con el oscurecimiento enzimático, como el contenido de compuestos fenólicos y el valor de blancura. De esta manera, se podrá establecer una correlación entre actividad de PPO, contenido de fenoles (principalmente difenoles: GDHB y L-DOPA), vida de anaquel y uso de suplementos en la calidad del champiñón.

Además el tipo de suplementos no se limita a los estudiados en este trabajo, por lo que es importante conocer los suplementos comerciales utilizados por productores; así como suplementos con mayores contenidos de proteínas o lípidos para lograr comprender mejor el papel de estos nutrimentos sobre la producción y calidad de los champiñones.



10. ANEXOS

Anexo 1. Determinación de proteína por el método de Bradford

Para la determinación de proteína por el método de Bradford se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina como estándar, en un intervalo de 5 - 50 $\mu\text{g/mL}$, se midió el incremento lineal en absorbancia a 595 nm debido al aumento de concentración del ensayo.

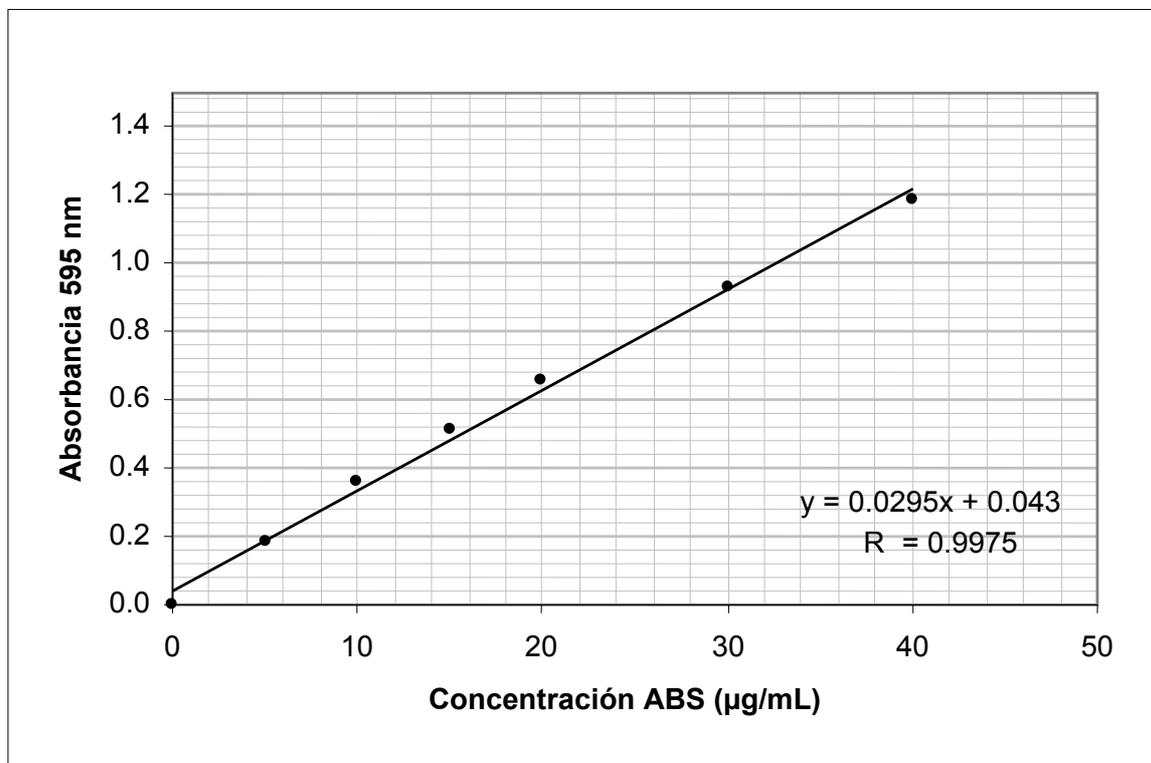


Figura A.1 Curva patrón de proteína por el método de Bradford.



Anexo 2. Análisis estadístico (SPSS para Windows, versión 11.0)

De acuerdo a los resultados obtenidos para cada una de las variables experimentales (humedad, actividad específica y actividad en base seca) se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para identificar la importancia de los tratamientos en estudio y determinar cómo interactúan entre sí. Una vez establecido si hay diferencia significativa, se realizó una prueba de rango múltiple para especificar entre que tratamientos existe esa diferencia.

Cuadro A1. Análisis de varianza para un diseño de factorial aleatorio en la determinación de humedad de los champiñones producidos en compostas con distintos suplementos.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F tablas	F calculada
BROTE	79.699	2	39.850	4.69	170.88**
SUPLEMENTO	17.500	5	3.500	3.09	15.01**
MUESTRA	2.216	2	1.108	4.69	4.75*
BROTE * SUPLEMENTO	12.072	10	1.207	2.39	5.18**
Error	33.116	142	0.233		
Total corregido	144.603	161			

** Diferencia altamente significativa $p < 0.01$

* Diferencia significativa $p < 0.05$

El análisis de varianza muestra una diferencia altamente significativa en el contenido de humedad ocasionada por el brote y tipo de suplemento adicionado en la composta, además establece una interacción altamente significativa entre brote y tipo suplemento. Para cada caso, se seleccionaron tres muestras provenientes de la misma cama de cultivo situadas azarosamente, el análisis de varianza indica una diferencia significativa para cada tratamiento, lo que sugiere un efecto en el contenido de humedad por la ubicación de las unidades experimentales en la cama de cultivo.



Cuadro A2. Análisis de varianza para un diseño de factorial aleatorio para la determinación de actividad específica de tirosinasa de los champiñones producidos en compostas con distintos suplementos.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F tablas	F calculada
BROTE	1.2684	2	0.6342	4.71	1579.5**
SUPLEMENTO	0.4025	5	0.0805	3.10	200.5**
MUESTRA	0.0092	2	0.0046	4.71	11.5**
EXTRACTO	0.0002	1	0.0002	6.75	0.40 ^{ns}
REPETICIONES	0.0004	2	0.0002	4.71	0.46 ^{ns}
BROTE * SUPLEMENTO	0.6830	10	0.0683	2.40	170.1**
Error	0.1052	262	0.0004		
Total corregido	2.4687	284			

** Diferencia altamente significativa $p < 0.01$ * Diferencia significativa $p < 0.05$
^{ns} No significativo

Al realizar el análisis de varianza para conocer el efecto de las variables en la actividad específica de tirosinasa en los champiñones producidos en compostas con distintos suplementos, se observa nuevamente una diferencia altamente significativa debida al brote, tipo de suplemento adicionado y muestras seleccionadas, así como, la existencia de una interacción altamente significativa entre el brote de cultivo y los tipos de suplementos. Dada la importancia en la reproducibilidad del método, se evaluó el efecto debido a los extractos enzimáticos y las repeticiones realizadas, se encontró que no hay diferencia significativa, es decir, el método permite obtener resultados precisos y confiables.



Cuadro A3. Análisis de varianza para un diseño de factorial aleatorio para la determinación de actividad de tirosinasa en base seca de los champiñones producidos en compostas con distintos suplementos.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F tablas	F calculada
BROTE	13070.7	2	6535.4	4.71	673.3 ^{**}
SUPLEMENTO	3812.1	5	762.4	3.10	78.55 ^{**}
MUESTRA	5.9	2	2.9	4.71	0.30 ^{ns}
BROTE * SUPLEMENTO	7072.7	10	707.3	2.40	72.87 ^{**}
Error	2106.3	217	9.3		
Total corregido	26067.6	236			

^{**} Diferencia altamente significativa $p < 0.01$

* Diferencia significativa $p < 0.05$

^{ns} No significativo

Para la actividad de tirosinasa reportada en base seca, se observó una diferencia altamente significativa debida al brote de cultivo, tipo de suplemento además de la interacción entre tiempos y suplementos altamente significativa. La muestra no presentó diferencia significativa.



11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajlouni S., **1991**. *Quality characteristics of two type hybrids of the cultivated mushrooms (Agaricus bisporus) and the improvement of their shelf life using stipe trimming and gamma radiation*. Ph.D. Dissertation, Pennsylvania State University.
- Anantheswaran R., Roy S., **2002**. *Factores que afectan la vida de anaquel de los hongos comestibles frescos*. Cap. XII. 237-258. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. ECOSUR, Limusa, México.
- Arce O., **2007**. *Alternativas de suplementación en composta para la producción de Agaricus bisporus y su efecto en las actividades enzimáticas*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Agropecuarias, UAM. México, D.F.
- Bartley C., Beelman R., Winnett J., **1991**. *Factors affecting colour of cultivated mushrooms (Agaricus bisporus) prior to harvest and during post-harvest storage*. Mushroom Science XIII: 689-692.
- Beaulieu M., D'Aprano G., Lacroix M., **2002**. *Effect of dose rate of gamma irradiation on biochemical quality and browning of mushrooms Agaricus bisporus*. Radiation Physics and Chemistry 63: 311-315.
- Beelman R., Guthrie B., Royse D., **1989**. *Influence of bacterial population on postharvest deterioration of fresh mushrooms*. Mushroom Science XII, vol. 2: 655-665.
- Beelman R., Milus M., Mau J., Ajlouni S., Simons S., **1993**. *Selected cultural and harvest practices to improve quality and shelf life of Agaricus mushrooms*. 1st International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, 177-184.
- Beelman R., Simons S., **1996**. *Influence of selected cultural factors on relative tyrosinase activity in cultivated mushrooms*. 2nd International Conference on Mushroom Biology and Mushrooms Products, 1-9.



- Beelman R., Simons S., Beyer D., **2000**. *Cultural strategies to increase yield and improve quality of fresh and processed mushroom (*Agaricus bisporus*) products*. 15th International Congress of the Science and Cultivation of Edible Fungi, vol. 2: 483-489.
- Beelman R., Royse D., Chikthimmah N., **2004**. *Bioactive components in *Agaricus bisporus* of nutritional, medicinal and biological importance*. Science and cultivation of edible and medicinal fungi. Pennsylvania State University Press University, 1-16.
- Beyer D., Muthersbaugh H., **1996**. *Nutrient supplements than influence later break yield of *Agaricus bisporus**.
- Bonnen A., Anton L., **1994**. *Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus**. Applied and Environmental Microbiology 60(3): 960-965.
- Braaksma A., **2000**. *Postharvest development of the common mushroom (*Agaricus bisporus*)*. 15th International Congress of the Science and Cultivation of Edible Fungi, vol. 2: 745-749.
- Bradford M., **1976**. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Analytical Biochemistry 72: 248–254.
- Brennan M., Le Port G., Gormley R., **2000**. *Post-harvest treatment with citric acid or hydrogen peroxide to extend the shelf life of fresh sliced mushrooms*. Technology 33: 285-289.
- Burton K., **1988**. *The effects of pre- and post-harvest development of mushroom tyrosinase*. Journal Horticultural Science 63: 255-260.
- Burton K., **1991**. *Modified atmosphere packaging of mushrooms*. Mushrooms Science 13: 683-688.
- Burton K., **1993**. *Mushroom senescence: its mechanism and control*. 1st International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, 171-176.



- Burton K., Noble R., **1993**. *The influence of flush number, bruising and storage temperature on mushroom quality*. Postharvest Biology and Technology 3: 39-47.
- Burton K., Love M., Smith J., **1993**. *Biochemical changes associated with mushroom quality in Agaricus spp.* Enzyme Microbiology Technology 15: 736-741.
- Burton K., Sreenivasaprasad S., Rama T., Evered C., McGarry A., **1995**. *Mushrooms quality and senescence*. Mushroom Science XIV, Science and Cultivation of Edible Fungi, vol. 2: 687-693.
- Burton K., Partis M., Wood D., Thurston C., **1997**. *Accumulation of serine protease in senescent sporophores of the cultivated mushroom Agaricus bisporus*. Mycology Research 101: 146-152.
- Burton K., Sreenivasaprasad S., Eastwood D., Rama T., Beecher T., Molloy S., **2000**. *The science of mushroom quality*. 15th International Congress of the Science and Cultivation of Edible Fungi, vol. 2: 507-513.
- Callac P., **2007**. *El género Agaricus*. Cultivo, Mercadotecnia e Inocuidad Alimenticia de *Agaricus bisporus*. El Colegio de la Frontera Sur, 19-36.
- Cameron I., Chapell D., **1970**. *The refrigeration storage of mushrooms before marketing*. MGA. Bull 246: 264-275.
- Carey A., O'Connor T., **1991**. *Influence of husbandry factors on the quality of fresh mushrooms (Agaricus bisporus)*. Mushrooms Science XIII: 673-682.
- Carroll A., Schisler L., **1976**. *Delayed release nutrient supplement for mushroom culture*. Applied Environmental Microbiology 31: 499-503.
- Chang S., **1999**. *World production of edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on Lentinula edodes*. International Journal of Medicinal Mushrooms 1: 291-301.
- Chang S., **2006**. *The World mushroom industry: trends and technological development*. International Journal Medicinal Mushrooms 8: 297-314.
- Coultate T., **1996**. *Food. The chemistry of its components*. Tercera edición. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.



- Czapski J., Szudyga K., **2000**. *Frozen mushrooms quality as affected by strain, flush, treatment before freezing and time of storage*. Sensory and Nutritive Qualities of Food. 65 (4): 722-725.
- Dubost N., Ou B., Beelman R., **2007**. *Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity*. Food Chemistry 105: 727- 735.
- Eastwood D., Kingsnorth C., Jones H., Burton K., **2000**. *Post-harvest quality in Agaricus bisporus. Changes in gene expression*. 15th International Congress of the Science and Cultivation of Edible Fungi, vol. 1: 137-142.
- Espín J., Soler-Rivas C., Wichers H., **2000**. *Maturation and activation of latent tyrosinase from Agaricus bisporus*. International Congress of the Science and Cultivation of Edible Fungi, vol. 1: 79-86.
- Espín J., Varón R., Fenoll L., Gilabert M., García-Ruíz P., Tudela J., García-Canóvas F., **2000**. *Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase*. European Journal of Biochemistry 267: 1270-1279.
- Fennema O., **1998**. *Química de los alimentos*. Editorial Acribia. 2a edición. España.
- Fernández F., **2005**. *Manual práctico de producción comercial de champiñón*. México.
- García A., **2007**. *Cultivo y producción del champiñón: un enfoque tecnológico. El genero Agaricus*. Cultivo, Mercadotecnia e Inocuidad Alimenticia de *Agaricus bisporus*. El Colegio de la Frontera Sur, 75-79.
- Gerrits J., **1988**. *Nutrition and compost. Cap. 2. The cultivation of mushrooms*. Darlington Mushroom, 1a edición, 29-72.
- Gormley R., **1975**. *Chill storage of mushrooms*. Journal of the Science Food and Agriculture 26: 401-411.
- Gormley R., MacCanna., **1967**. *Prepackaging and shelf life of mushrooms*. Irish Journal Agriculture Research 6(2): 255-265.



- Guthrie B., **1984**. *Studies on the control of bacterial deterioration of fresh washed mushrooms (Agaricus bisporus)*. MS, Thesis, the Pennsylvania State University.
- Hammond J., Nichols R., **1975**. *Changes in respiration and soluble carbohydrates during the postharvest storage of mushroom*. Journal of Food Science of Food and Agriculture 26: 835-842.
- Herrera T., Ulloa M., **1990**. *El reino de los hongos. Micología básica y aplicada*. Fondo de Cultura Económica, UNAM, México.
- Jacxsens L., Devlieghere F., Van der Oteen C., Debevere J., **2001**. *Effect of high oxygen modified atmosphere packaging on microbial growth and sensorial qualities of fresh-cut produce*. International Journal of Food Microbiology 71: 197-210.
- Jang M., Sanada A., Ushio H., Tanaka M., Ohshima T., **2002**. *Inhibitory effects of "enokitake" mushroom extracts on polyphenol oxidase and prevention of apple browning*. Lebens-Wiss. Technol. 35: 697-702.
- Jarquín R., Cuevas R., **2007**. *Organización y mercado: la clave para el éxito. Cultivo, Mercadotecnia e Inocuidad Alimenticia de Agaricus bisporus*. El Colegio de la Frontera Sur, 151-159.
- Jolivet S., Voiland A., Pellon G., Arpin N., **1995**. *Main factors involved in the browning of Agaricus bisporus*. Mushroom Science XIV, Science and Cultivation of Edible Fungi, vol. 2: 695-702.
- Jolivet S., Arpin N., Wichers H., Pellon G., **1998**. *Agaricus bisporus browning: a review*. Mycology Research 102: 1459-1483.
- Jolivet S., Pellon G., Gelhausen M., Arpin N., **1999**. *γ -L-[3 H]-Glutaminyl-4-[14 C]hydroxybenzene (GHB): biosynthesis and metabolic fate after applying on Agaricus bisporus*. Phytochemistry 50: 581-587.
- Juárez N., **2003**. *Caracterización de tirosinasa en champiñón (Agaricus bisporus)*. Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga, Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
- Kalac P., Svoboda L., **2000**. *A review of trace element concentration in edible mushrooms*. Food Chemistry 69: 273-281.



- Kalberer P., **1990**. *Influence of the water potential of the casing soil on crop yield and on dry matter content, osmotic potential and mannitol content of the fruit bodies of Agaricus bisporus*. Journal of Horticultural Science 65: 573-581.
- Kalberer P., **1995**. *Factors influencing the dry matter content of the fruit bodies of Agaricus bisporus*. Mushroom Science XIV, Science and Cultivation of Edible Fungi, vol. 2: 417-422.
- Komanowsky M., Talley E., Eskew R., **1970**. *Air drying of cultivated mushrooms*. Food Technologie 24(9): 1020-1024.
- Kompany E., Rene F., **1995**. *A note on the freeze drying conditions for improved aroma retention in cultivated mushrooms*. Lebens-Wiss. Technol. 28(2): 238.
- Koorapati A., Foley D., Pilling R., Prakash A., **2004**. *Electron-beam irradiation preserves the quality of white button mushroom (Agaricus bisporus) slices*. Journal of Food Science 69: 25-29.
- Kües U., Liu Y., **2000**. *Fruiting body production in basidiomycetes*. Applied Microbiology & Biotechnology 54: 141-152.
- Kukura J., Beelman R., Peiffer M., Walsh R., **1998**. *Calcium chloride added to irrigation water of mushrooms reduces postharvest browning*. Journal Food Science 63 (3): 454-457.
- Lescano G., **1994**. *Extension of mushroom (Agaricus bisporus) shelf life by gamma radiation*. Postharvest Biology and Technology 4: 255-260.
- López E., **1990**. *Cultivo del champiñón la trufa y otros hongos*. AEDOS, España.
- Lukasse L., Polderdijk J., **2003**. *Predictive modelling of post-harvest quality evolution in perishables, applied to mushrooms*. Journal of Food Engineering 59: 191-198.
- Mamoun M., Moquet F., Savoie J., Devesse C., Ramos-Guedes-Lafargue M., Olivier J., Arpin N., **1999**. *Agaricus bisporus susceptibility to bacterial blotch in relation to environment: biochemical studies*. Microbiology Letter 181: 131-136.



- Marshall M., Kim J., Wei C., **2000**. *Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods*. FAO.
- Martínez Carrera D., Morales P., Sobal M., Bonilla M., Martínez W., **2007**. *México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción – consumo de los hongos comestibles*. Capítulo 6.1, 209-224. *El cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. ECOSUR-CONACYT
- Martínez M., Whitaker J., **1995**. *The biochemistry and control of enzymatic browning*. Trends in Food Science and Technology 6: 195-200.
- Marusek C., Trobaugh N., Flurkey W., Inlow J., **2006**. *Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species*. Journal of Inorganic Biochemistry 100: 108-123.
- Mastore M., Kohlerz L., Nappi A., **2005**. *Production and utilization of hydrogen peroxide associated with melanogenesis and tyrosinase-mediated oxidations of DOPA and dopamine*. The FEBS Journal 272: 2407-2415.
- Mau J., Beelman R., Ziegler G., **1992**. *Effect of 10-oxo-trans-8-decenoic acid on growth of Agaricus bisporus*. Phytochemistry 31: 4059-4064.
- Mau J., Beelman R., Ziegler G., Royse D., **1991**. *Effect of nutrient supplementation on flavour, quality and shelf-life of the cultivated mushroom, Agaricus bisporus*. Mycologia 83: 142-149.
- Mayett Y., Martínez Carrera D., **2007**. *Tendencias de consumo y monitoreo de precios de los hongos comestibles en México*. Consumo de los hongos comestibles en México, 1-11.
- McConnell A., **1991**. *Evaluation of wash treatments for the improvement of quality and shelf life of fresh mushrooms*. MS, Thesis, the Pennsylvania State University.
- Myong K., Ko J., Sil J., Jin H., Hanna M., **2006**. *Effect of modified atmosphere packaging on the shelf-life of coated, whole and sliced mushrooms*. Swiss Society of Food Science and Technology 39: 364-371.
- Noble R., Rama T., Miles S., Burton K., Stephens T., Reed J., **1997**. *Influences of compost and casing layer depths on the mechanical properties of mushrooms*. Annals of Applied Biology 131: 79-90.



- Petrenko B., Bisko N., **2004**. *Influence of the addition of soybean supplements to the compost on the yield of Agaricus bisporus*. Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi, 353-358.
- Pezzella A., Vogna D., Prota G., **2003**. *Synthesis of optically active tetrameric melanin intermediates by oxidation of the melanogenic precursor under biomimetic conditions*. Tetrahedron: Asymmetry 14: 1133-1140.
- Rama T., Burton K., Vincent J., **1995**. *Changes of the surface texture of mushrooms during postharvest storage*. Mushroom Science XIV, Science and Cultivation of Edible Fungi, vol. 2: 729-732.
- Ramírez E., Whitaker R., Virador V., **2003**. *Polyphenoloxidase*. Handbook of Food Enzymology. Editorial Board. 509-523.
- Riva M., Schiraldi A., Cesare L., **1991**. *Drying of Agaricus bisporus mushrooms by microwave-hot air combination*. Lebens-Wiss Technologie 24(6): 479.
- Roy S., Anatheswaran R., Beelman R., **1995**. *Fresh mushroom quality as affected by modified atmosphere packaging*. Journal of Food Science 60: 334-338.
- Royse D., **1997**. *Speciality mushrooms. Consumption, production and cultivation*. Revista Mexicana de Micología 13: 1-11.
- Royse D., **2007**. *Consumo y producción de Agaricus bisporus en el mundo. Cultivo, Mercadotecnia e Inocuidad Alimenticia de Agaricus bisporus*. El Colegio de la Frontera Sur, 7-17.
- Royse D., Schisler L., **1980**. *Mushrooms: their consumption, production and culture development*. Interdiscip. Sci. Rev. 5: 324-332.
- Royse D., Schisler L., Wuest P., **1982**. *Spawning to casing in commercial mushroom production*. Penn State Handbook for commercial mushroom growers, 43-48.
- Royse D., Sánchez J., Beelman R., Davidson J., **2007**. *Re-supplementing and re-casing mushroom (Agaricus bisporus) compost for a second crop*. World Journal Microbiology & Biotechnology. Original Paper.



- Sánchez J., Royse D., **2001**. *Adapting substrate formulas used for shiitake for production of brown Agaricus bisporus*. Bioresource Technology 77: 65-69.
- Sánchez C., **2004**. *Modern aspects of mushroom culture technology*. Applied Microbiology & Biotechnology 64: 756-762.
- Sapers G., Miller R., Miller F., Cooke P., Choi S., **1994**. *Enzymatic browning control in minimally processed mushrooms*. Journal of Food Science 59: 1042-1047.
- Sapers G., Miller R., Choi S., Cooke P., **1999**. *Structure and composition of mushrooms as affected by hydrogen peroxide wash*. Journal of Food Science 64 (5): 889-892.
- Sapers G., Miller R., Pilizota V., Kamp F., **2001**. *Shelf-life extension of fresh mushrooms (Agaricus bisporus) by application of hydrogen peroxide and browning inhibitors*. Journal of Food Science 66 (2): 362-366.
- Schaper P., de Vlieger J., Van Griensven L., **1988**. *Sales*. Cap. 14. *The cultivation of mushrooms*. Darlington Mushroom, 1a edición, 423-445.
- Schisler L., Sinden J., **1962**. *Nutrient supplementation of mushroom compost at spawning*. Mushroom Science V: 150-164.
- Schroeder G., Schisler L., **1981**. *Effect of supplementation at spawning, compost moisture and casing moisture on size, yield and dry weight of mushrooms*. 11th International Scientific Congress of the Cultivation of Edible Fungi, 511-521.
- Schurink M., van Berkel W., Wichers H., Boeriu C., **2007**. *Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity*. Peptides 28: 485-495.
- Seo S., Sharma V., Sharma N., **2003**. *Mushroom tyrosinase: recent prospects*. Journal of Agriculture Food Chemistry 51 (10): 2837-2853.
- Soler-Rivas C., Jolivet S., Arpin N., Ilivier J., Wichers H., **1999**. *Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of Agaricus bisporus*. Microbiology Reviews 23: 591-614.
- Soler-Rivas C., Arpin N., Olivier J., Wichers J., **1999b**. *The effects of tolaasin, the toxin produced by Pseudomonas tolaasii on tyrosinase activities and the*



- induction of browning in Agaricus bisporus fruiting bodies*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 21-28.
- Stamets P., **1993**. *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Ten Speed Press & Mycomedia, Berkeley, CA. 553 pp.
 - Stoop J., Mooibroek H., **1999**. *Advances in genetic analysis and biotechnology of the cultivated button mushroom, Agaricus bisporus*. *Applied Microbiology & Biotechnology* 52: 474-483.
 - Sveine E., Klougart A., Rasmussen C., **1967**. *Way of prolonging the shelf life of fresh mushrooms*. *Mushroom Science* 6: 463-474.
 - Tano K., Arul J., Doyon G., Castaigne F., **1999**. *Atmospheric composition and quality of fresh mushrooms in modified atmosphere packages as affected by storage temperature abuse*. *Journal of Food Science* 64 (4): 1073-1076.
 - Tsai S., Wu T., Huang S., Mau J., **2006**. *Nonvolatile taste components of Agaricus bisporus harvested at different stages of maturity*. *Food Chemistry*.
 - Vámos-Vigyázó L., **1981**. *Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables*. *Food Science Nutrition* 15: 48-127.
 - Van Griensven L., **1988**. *History and development*. Cap. 1. *The cultivation of mushrooms*. Darlington Mushroom, 1a edición, 11-28.
 - Van Loon P., Swinkels H., van Griensven L., **2000**. *Dry matter content in mushrooms (Agaricus bisporus) as an indicator for mushroom quality*. 15th International Congress of the Science and Cultivation of Edible Fungi, vol. 2: 507-513.
 - Vedder P. **1996**. *Cultivo moderno del champiñón*. Mundi-Prensa, España.
 - Vijay B., Sharma S., Lakhanpal T., **2002**. *Effect of treating post-composting supplements with different concentration of formaldehyde on the yield of Agaricus bisporus*. 4th International Conference on Mushroom Biology and Mushrooms Products.
 - Vivar-Quintana A., González-San José M., Collado-Fernández M., **1999**. *Influence of canning process on colour, weight and grade of mushrooms*. *Food Chemistry* 66: 87-92.



- Walde S., Velu V., Jyothirmayi T., Math R., **2006**. *Effects of pretreatments and drying methods on dehydration of mushroom*. Journal of Food Engineering 74: 108-115.
- Wang Q., Qiu L., Chen X., Song K., Shi Y., Chen Q., **2007**. *Inhibitory effects of phloridzin dihydrate on the activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 15: 1668-1671.
- Wessels J., **1993**. *Fruiting in the higher fungi*. Advances in Microbial Physiology 34: 147-202.
- Wichers H., Soler-Rivas C., Danai O., Nerya O., Levanon D., **2005**. *Post Harvest Quality of *Agaricus bisporus* Mushrooms*. 5st International Conference on Mushroom Biology and Mushrooms Products, 1-10.
- Wood D., Fermor T., **1981**. *Nutrition of *Agaricus bisporus* in compost*. Mushroom Science XI. 11th International Conference on Mushroom Biology and Mushrooms Products, 63-71.
- Zhang X., Flurkey W., **1997**. *Phenoloxidases in *Portabella* Mushrooms*. Journal of Food Science 62: 97-100.