



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“CRECIMIENTO MICELIAL Y PRODUCCIÓN DE FENOLES
TOTALES DE *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (SHIITAKE)
EN DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDO”

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

CARLOS IVÁN ROMERO SALGADO

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. LUIS ANTONIO HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MEXICO, 2022





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIAS

A José Carlos, mi hijo. El principal pilar en mi vida, quien nunca permitió que me rindiera, por todo su apoyo y sus palabras de aliento en todo momento. Te amo.

Para Elvira, mi madre. Con mucho amor le dedico todo mi esfuerzo y le reconozco el sacrificio que ha hecho para apoyarme siempre. Gracias mamá.

A Martín mi padre. Gracias por confiar en mí, por tu apoyo y por cada consejo y enseñanza que me has dado.

Para mis hermanas Marisol, Karla y Esmeralda. Gracias por apoyarme en los momentos en donde el tiempo me hacía falta, por su apoyo incondicional en todo momento y por todos aquellos instantes en donde siempre encontré compañía y amor.

A mis abuelos Román y Juanita. Por sus consejos y apoyo incondicional. Gracias

"Todos se lo merecen, solo uno se lo gana"

Trueno

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor:

M. en C. Luis Antonio Hernández González por todo el apoyo, confianza y facilidades brindadas para la elaboración de este trabajo, así como como por su tiempo, conocimientos y amistad. Muchas gracias.

A mis sinodales:

Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

Dra. Ana María García Bores

Biol. Soledad Chino Vargas

Biol. Marcial García Pineda

Por sus consejos, enseñanzas, observaciones y sobre todo por el tiempo que dedicaron para que este trabajo fuera una realidad.

In memoriam



Biol. Víctor Manuel Esparza Martínez. Por su gran pasión para compartir todos sus conocimientos, por sus buenos consejos, regaños y amistad. Pero sobre todo por motivarme a nuca rendirme. Hasta pronto. DEP

ÍNDICE

	pág.
i. Índice de figuras.....	v
ii. Abreviaturas.....	vi
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1. Shiitake.....	4
3.2. Clasificación taxonómica.....	5
3.3. Morfología.....	5
3.4. Ciclo de vida.....	6
3.5. Contenido nutrimental.....	7
3.6. Propiedades funcionales.....	7
3.7. Antioxidantes.....	7
3.8. Compuestos fenólicos.....	8
4. ANTECEDENTES.....	9
5. JUSTIFICACIÓN.....	12
6. HIPÓTESIS.....	13
7. OBJETIVOS.....	13
7.1. Objetivo general.....	13
7.2. Objetivos particulares.....	13
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
8.1. Ubicación.....	14
8.2. Cepa.....	14
8.3. Variables de estudio.....	15
8.3.1. Variable independiente.....	15
8.3.2. Variable dependiente.....	15
8.4. Condiciones de crecimiento de <i>Lentinula edodes</i> en caja de Petri.....	15
8.5. Formulación de los medios de cultivo líquido.....	15

8.5.1. Fórmula original (T_0).....	15
8.5.2. Fórmula experimental 1 (T_1).....	16
8.5.3. Fórmula experimental 2 (T_2).....	16
8.5.4. Preparación de los medios de cultivo.....	16
8.6. Inoculación de los medios de cultivo líquidos.....	16
8.7. Obtención y desecación del micelio.....	17
8.8. Obtención del extracto etanólico de micelio de <i>L. edodes</i>	17
8.9. Determinación del contenido de polifenoles totales.....	17
8.10. Análisis estadístico.....	18
8.11. Diseño experimental.....	19
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
9.1. Material biológico.....	20
9.2. Producción de biomasa de <i>L. edodes</i> en medios de cultivo líquido....	20
9.3. Contenido de fenoles totales en micelio de <i>L. edodes</i>	25
10. CONCLUSIÓN.....	26
11. ANEXOS.....	27
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

i. ÍNDICE DE FIGURAS

	Contenido	pág.
Figura 1.	Cuerpo fructífero de <i>Lentinula edodes</i>	4
Figura 2.	Ciclo de vida de un basidiomiceto.....	6
Figura 3.	Estructura general de un compuesto fenólico.....	8
Figura 4.	Diseño experimental para la determinación de fenoles totales en micelio de <i>L. edodes</i>	19
Figura 5.	Desarrollo de micelio en medio EMA.....	20
Figura 6.	Comparación de la biomasa obtenida por litro de medio de cultivo.....	23
Figura 7.	Comparación de la producción micelial de <i>L. edodes</i> en medio líquido con diferentes fuentes de carbono.....	23
Figura 8.	Comparación de la media del peso seco por tratamiento.....	24
Figura 9.	Concentración de fenoles totales en micelio de <i>L. edodes</i>	24
Figura 10.	Curva patrón 1 para la determinación de EAG mg/L de las muestras.....	27
Figura 11.	Preservación y conservación de la cepa de <i>L. edodes</i> en agar EMA.....	27
Figura 12.	Crecimiento del micelio de <i>L. edodes</i> en el interior del medio de cultivo.....	28
Figura 13.	Recuperación de la biomasa desarrollada en los medios de cultivo líquidos.....	28

ii. ABREVIATURAS

°C	grados centígrados
µL	microlitro
µm	micrómetro
µmol	micromol
ANOVA	análisis de varianza
BC	bagazo de caña
Ca	calcio
CaCO ₃	carbonato de calcio
Cd	cadmio
cm	centímetro
Cu	cobre
DE	desviación estándar
EAG	equivalentes de ácido gálico
EB	eficiencia biológica
EMA = MEA	agar extracto de malta
<i>et. al.</i>	<i>Et alii</i> (y otros)
Fe	hierro
g	gramos
h	hora
JABIZ	Jardín Botánico del Campus Iztacala
K	potasio
L	litro
<i>L. boryana</i>	<i>Lentinula boryana</i>
<i>L. edodes</i>	<i>Lentinula edodes</i>
LE	<i>Lentinula edodes</i>
ME	madera de encino
mg	miligramo
Mg	magnesio

min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
Mn	manganeso
MYA	agar levadura extracto de malta
Na	sodio
nm	nanómetro
OGY	oxitetraciclina extracto de levadura y glucosa
OMYA	agar levadura extracto de malta y avena
p	peso
P	fosforo
PDA	agar papa dextrosa
PDYA	agar levadura papa dextrosa
pH	potencial de hidrógeno
PSI	libras por pulgada cuadrada
R	rendimiento
rpm	revoluciones por minuto
RS	rastrojo de sorgo
spp	especies
T ₀	fórmula original
T ₁	fórmula experimental 1
T ₂	fórmula experimental 2
TP	tasa de producción
v	volumen
WSLD	derivados de lignina solubles
\bar{x}	media
YMEA	agar extracto de malta y levadura
Zn	zinc

1. RESUMEN

Los polifenoles son metabolitos secundarios que se caracterizan por tener una estructura química de al menos un anillo aromático al que está unido uno o más grupos hidroxilo. Son compuestos que se reconocen por poseer actividad antioxidante, actuando como captadores de radicales libres.

En el presente trabajo se estudió la relación que existe en el crecimiento de micelio de *Lentinula edodes* y la concentración de polifenoles en medios de cultivo líquido empleando diferentes fuentes de carbono, glucosa (T₀), malta (T₁) y sacarosa (T₂). La determinación de polifenoles totales se llevó a cabo mediante la técnica de Follin-Ciocalteau. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con la prueba ANOVA.

El crecimiento vegetativo de la cepa se evaluó en ensayos de 30 días de incubación. El tratamiento que presentó un mayor desarrollo de biomasa fue en el que se empleó glucosa como fuente de carbono, aunque estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre las biomásas producidas en las distintas fuentes de carbono utilizadas. Sin embargo, en el contenido de polifenoles totales evaluado en el extracto etanólico del micelio deshidratado y expresado como equivalentes de ácido gálico (EAG mg/g), si existió una diferencia significativa, resultando la glucosa como fuente de carbono, la que condujo a una mayor concentración de polifenoles, presentando el valor más alto con 292.9±46.85 EAG mg/g de micelio seco.

Se concluyó que, de las fuentes de carbono utilizadas no se encontró alguna que dé un mayor rendimiento en la producción de biomasa. Por otro lado, el carbohidrato que condujo a una mayor concentración de polifenoles fue la glucosa.

Palabras clave: *Lentinula edodes*, shiitake, polifenoles, antioxidantes, cultivo líquido, micelio.

SUMMARY

The polyphenols are secondary metabolites that are characterized by having a chemical structure of at least one aromatic ring to which one or more hydroxyl groups are attached. They are compounds that are recognized for having antioxidant activity, acting as free radical scavengers.

In this research was studied the relationship that exists in the growth of *Lentinula edodes* mycelium and the concentration of polyphenols in liquid culture using different sources of carbon, glucose (T₀), malt (T₁) and sucrose (T₂). The determination of total polyphenols was carried out using the Follin-Ciocalteau method. The data obtained were statistically analyzed with the ANOVA test.

The vegetative growth of the strain was evaluated in 30 days incubation tests. The treatment that presented a greater development of biomass was the one used glucose as a carbon source, although statistically there were not significant differences between the biomass produced in the different carbon sources used. However, in the total polyphenols content evaluated in the ethanolic extract of the dehydrated mycelium and expressed as equivalents of gallic acid (GAE mg/g), there were a significant difference, resulting the glucose as a carbon source, which led to had a higher concentration of polyphenols, indicating the highest value with 292.9±46.85 GAE mg/g.

In conclusion, from the carbon sources used, it was not found any that gives a higher yield in the biomass production. On the other hand, the glucose was the carbohydrate that led to had a higher concentration of polyphenols.

Key words: *Lentinula edodes*, shiitake, polyphenols, antioxidants, liquid culture, mycelium.

2. INTRODUCCIÓN

El reino Fungi, o también llamado reino de los hongos, es un grupo de organismos diversos en su morfología, fisiología, ciclos de vida y ecología; se estima que existen más de 1.500.000 especies de hongos; sin embargo, solamente han sido descritas alrededor de 69.000, de las cuales el 14% aproximadamente son consideradas macroscópicas, de éstas aproximadamente el 7% son comestibles, 4% son medicinales y 2% son tóxicas (Aguirre *et al.*, 2014).

La demanda de los hongos comestibles ha ido en aumento año con año, dado que los consumidores han buscado alternativas naturales que les provean de alimentos diversificados y benéficos para la salud (Hinestroza *et al.*, 2008).

El cultivo de hongos comestibles es una actividad que se ha desarrollado desde hace más de 200 años en Europa con el cultivo del champiñón *Agaricus bisporus* y en Asia con el cultivo de especies como *Lentinula edodes* y *Auricularia spp* (Kang, 2005).

México es considerado como un pueblo micófago, esto hace referencia a que la mayoría de la población consume hongos provenientes de dos distintas fuentes: recolectados de campo y cultivo controlado, aunque no se ha logrado el crecimiento de todos los hongos en un ambiente controlado (Guzmán, 2008)

La historia del cultivo de hongos en México se remonta a 1933, cuando se inició con los primeros ensayos para el cultivo de champiñón por parte del señor José Leben Zdravie proveniente de Italia. Uno de los principales problemas a los que se enfrentaron, fue al desabasto de micelio para dicho cultivo, el cual se tenían que importar de una empresa estadounidense, así como también de Francia. Fue hasta 1954 cuando se funda el primer laboratorio en México dedicado a la producción de

micelio para el cultivo de hongos. En 1974 se inicia por primera vez el cultivo de *Pleurotus ostreatus*, una especie diferente al champiñón.

Posteriormente en la década de 1980 se inicia en México el cultivo del shiitake, por la empresa “Hongos Leben, S. de R. L. de C. V. ubicada en Guadalupe Victoria, Estado de México; considerando a este hongo comestible como uno de los más estudiados y cultivados durante los últimos años debido a su calidad nutricional y medicinal (Carrera *et al.*, 2006).

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Shiitake (*L. edodes*)

El nombre shiitake deriva de dos vocablos japoneses: “shii” que hace referencia a un árbol del género *Pasania* y “take” que significa hongo. Este término se utiliza comúnmente para designar a un grupo de hongos pertenecientes al género *Lentinula*, siendo los más conocidos: *L. edodes* y *L. boryana* (Chen, 2005).



Figura 1. Cuerpo fructífero de *L. edodes* (propia, 2012)

3.2. Clasificación taxonómica del shiitake

De acuerdo con Pegler, 1983 y retomado por Rivera *et.al.*, 2017 la clasificación taxonómica del shiitake es la siguiente:

Reino: Fungi

Filo: Basidiomycota

Clase: Basidiomycetes

Orden: Agaricales

Familia: Tricholomataceae

Género: *Lentinula*

Especie: *L. edodes*

3.3. Morfología del shiitake

- Pie o estípite. Mide de 3 a 5 cm de largo por 8 a 15 mm de grueso. Se encuentra unido al centro del sombrero, posee una textura fibrosa, es de tamaño corto y color café.
- Sombrero o píleo. Semiesférico, convexo, con un diámetro de 5 a 20 cm, al inicio de su desarrollo presenta un color café oscuro que conforme va madurando se torna más claro. Presenta escamas de color blanco.
- Laminillas o himenio. Adnatas, de color blanco y poseen bordes aserrados.
- Esporas. De color blanco a crema, presentan una forma ovoide u oblonga, de pared lisa y un tamaño de 5 a 6.5 μm por 3 a 3.5 μm (Hinestroza *et al.*, 2008).

3.4. Ciclo de vida del shiitake

Se desarrolla favorablemente en lugares con clima cálido, sobre madera en proceso de descomposición, por lo que se considera saprobio de pudrición blanca (Chen, 2005), donde se puede llegar a observar individuos solos o en racimo.

El ciclo de vida del shiitake comienza con la formación de basidiosporas haploides uninucleadas producidas por meiosis, las cuales son vertidas al ambiente, y bajo condiciones favorables ambientales y del sustrato, germinan; dando paso al desarrollo de micelio uninucleado haploide. Cuando dos micelios uninucleados son compatibles se unen para formar un micelio dicariótico, el cual ya es capaz de constituir primordios que darán paso a los cuerpos fructíferos donde en el envés están presentes las laminillas. En estas laminillas se desarrollan los basidios, en donde se forman las basidiosporas que al momento de madurar son esparcidas al ambiente por acción del viento y algunos insectos (Cubris, 2011. Bisen *et al.*, 2010).

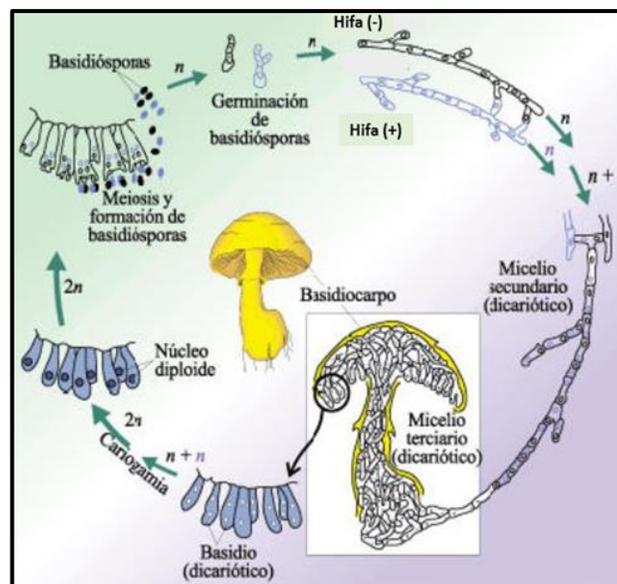


Figura 2. Ciclo de vida de un basidiomiceto (Cubris, 2011).

3.5. Contenido nutrimental

Es reconocido por su alto valor nutricional. El contenido de agua en este hongo oscila entre el 85% al 90%. Cada 100 g de shiitake deshidratado contiene de 28 a 39 calorías, 15 a 35 g de proteínas, 7.3 g de carbohidratos, 0.8 g de fibra.

Posee minerales como el Fe, Mn, K, Ca, Mg, Cd, Na, Cu, P y Zn. Además, contiene vitaminas D, C, A, E, C, B1, B2, B6 y B12 (Hinestroza *et al.*, 2008. Finimundy *et al.*, 2014. Barradas 2015).

3.6. Propiedades funcionales del shiitake

Además de sus propiedades nutrimentales también posee efectos benéficos para la salud humana. Se utiliza tanto en menores de edad como en adultos, y su uso recae principalmente en: reducir el colesterol, potencializa el sistema inmunológico, reduce la presión arterial; controla los niveles de azúcar en sangre, favorece la digestión, presenta actividad antibacterial, antiviral y antifúngica; así como también previene el cáncer (Zembron *et al.*, 2013. López *et al.*, 2013. Barradas, 2015).

También dentro de las propiedades medicinales de los hongos destaca su poder antioxidante, que ayuda a neutralizar los radicales libres que son los causantes de muerte celular y daño tisular, a su vez éstos son los precursores de enfermedades como diabetes, cáncer y cirrosis (Barradas, 2015).

3.7. Antioxidantes.

Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retardan la oxidación de otras moléculas inhibiendo la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres (Maureen y Prieto, 1999).

Los compuestos antioxidantes que se han reportado para *L. edodes* son compuestos fenólicos como el ácido trans-cinámico, ácido protocatéquico, ácido gálico, ácido ascórbico, flavonoides como la catequina, así como esteroides (Barradas, 2015).

3.8. Compuestos fenólicos

Los polifenoles o compuestos fenólicos tienen una estructura molecular que se caracteriza por la presencia de uno o más anillos fenólicos o bencénicos unido a uno o más grupos hidroxilo, los cuales protegen al organismo de los daños oxidativos (Barradas, 2015).

Estos compuestos pueden presentarse como moléculas simples, tal es el caso de los ácidos fenólicos, fenilpropanoides y flavonoides; o bien como moléculas complejas como las ligninas, melaninas, taninos y flavonoides (Alvarado, 2015).



Figura 3. Estructura general de un compuesto fenólico

4. ANTECEDENTES

Mata *et al* (2001) estudiaron las tasas de crecimiento del micelio de 11 cepas de *L. edodes* cultivadas en medios sólidos utilizando diversas formulaciones como: agar extracto de malta, extracto de malta - levadura y un medio de cultivo que contenía extracto de malta - levadura complementado con derivados solubles de lignina. Los resultados determinaron que la adición de compuestos solubles de lignina redujo significativamente las tasas de crecimiento de micelio.

García (2003) en su investigación estudió el comportamiento del crecimiento de *L. edodes* en dos distintos medios de cultivo agar extracto de malta (EMA) y agar papa dextrosa (PDA), en donde observó que los primeros 18 días del cultivo es donde se presenta una mayor producción del micelio. Los resultados obtenidos indican que el medio de cultivo PDA presenta una mejor invasión y velocidad de crecimiento.

Rodríguez y Jaramillo (2005) establecieron las características generales para implementar el cultivo de hongos medicinales como *shiitake* y *ganoderma*. Abordaron el tema desde la descripción general de la especie, pasando por la técnica de cultivo y sustratos para cada hongo; así mismo hacen mención de la importancia que tiene el conocer el origen de la semilla, indicando que el medio de cultivo sólido para estas dos especies de hongos es el EMA.

Pedrerros (2007) evaluó el crecimiento de *L. edodes* utilizando diversas mezclas de sustratos como alternativa para este cultivo, entre los que destacan: hoja de plátano, aserrín de eucalipto y aserrín de roble. Utilizando como cultivo madre una cepa de *L. edodes* en medio PDA de la empresa Biosetas Andinas. Demostró que el aserrín de roble alcanzó una eficiencia (relación entre el peso fresco del hongo y el peso seco del sustrato) del 83.6% considerándolo como un sustrato adecuado para el cultivo.

Villegas *et al* (2007) evaluaron el crecimiento de la cepa jumbo de *L. edodes* Pegler en diferentes medios agarizados, los cuales estaban compuestos de: agar levadura – extracto de malta y avena, agar levadura – extracto de malta y por último

agar levadura – papa dextrosa. Llegaron a la conclusión de que el mejor sustrato para el desarrollo del micelio es el compuesto por agar levadura – extracto de malta y avena, con un pH óptimo de entre 5 y 5.5.

Díaz (2010) analizó el crecimiento de *Pleurotus spp.* y *Hericium spp.* para conocer la relación de distintas variables con la producción de cuerpos fructíferos y contenido nutricional para ambos géneros. Se evaluó el crecimiento diario en medio de cultivo sólido (EMA) *in vitro*, en condiciones de oscuridad a una temperatura de 26°C. En el trabajo se expone que el medio de cultivo EMA es un sustrato genérico para el crecimiento de cualquier hongo. El género *Pleurotus spp.* tuvo mayor velocidad de crecimiento.

Suarez y Holguín (2011) evaluaron los medios de cultivo artificiales: PDA, OGY (oxytetraciclina, extracto de levadura y glucosa) y Sabouraud, para *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*. Determinaron que el medio PDA fue en el cual se desarrolló más rápidamente el micelio para las tres cepas, sin embargo, los tres medios de cultivo mostraron un comportamiento similar en el desarrollo de los tres tipos de hongos.

Suarez (2012) estableció la producción de biomasa de *Lentinula edodes* en medios de cultivo líquido. Encontró un rendimiento de biomasa del 90%, mientras que la producción de metabolitos secundarios mostró una alta producción.

Barradas (2015) en su trabajo evaluó el efecto de diferentes sustratos y cepas sobre los parámetros de productividad, las características fisicoquímicas, y los compuestos con actividad antioxidante en carpóforos de shiitake. Se utilizaron dos cepas y tres sustratos. Los resultados obtenidos indican una buena eficiencia biológica utilizando rastrojo de sorgo y un mayor contenido de polifenoles utilizando madera de encino, concluyendo que la cepa y el sustrato influyen en las características fisicoquímicas, así como, en los compuestos con actividad antioxidante.

Romero *et al* (2015) evaluaron tres fórmulas en la producción del hongo shiitake, utilizando una cepa de *L. edodes*, en bloques sintéticos conformados por residuos agroforestales. Los resultados demostraron un adecuado crecimiento micelial con una eficiencia biológica de 100.5% y cuerpos fructíferos con un peso aproximado entre 40 a 70 g por unidad.

Alvarado (2015) evaluó la influencia de tres medios de cultivo con diferente composición nutrimental en la producción y el contenido de polifenoles en *Pleurotus djamor*, así como su efecto en la actividad antioxidante. Los resultados mostraron un adecuado crecimiento del micelio en caja Petri, una masa de 0.80 ± 0.80 g de micelio en masa seca crecido en medio líquido y en el extracto etanólico 7.04 ± 1.12 EAG mg/g.

5. JUSTIFICACIÓN

En México el cultivo de hongos comestibles y medicinales se encuentra en un proceso de crecimiento gracias a la investigación que realizan las instituciones de educación y el sector privado. Sin embargo, la tecnología e infraestructura con la que cuentan los pequeños productores hace que el aprovechamiento de este hongo con fines alimenticios y medicinales se vea restringido, limitando de esta manera los beneficios que puede tener en la nutrición y salud de los individuos.

Los principales aportes al cultivo de hongos en condiciones controladas se centran en la obtención de micelio utilizando sustratos sólidos para el crecimiento, sin embargo, se deja de lado el aprovechamiento de la técnica en medio líquido la cual puede reducir considerablemente el tiempo de obtención de la masa micelial y aumentar significativamente la biomasa obtenida y la producción de metabolitos secundarios como los polifenoles, los cuales en la actualidad han tomado gran importancia gracias a las investigaciones acerca de los beneficios que conlleva la ingesta de antioxidantes naturales para evitar la oxidación celular que desencadena distintos procesos que culminan en patologías crónico-degenerativas.

De estos beneficios y estudios radica la importancia de dar pauta a este trabajo enfocado en la obtención de micelio que sirva como complemento dietético y como fuente natural de antioxidantes.

6. **HIPÓTESIS**

El crecimiento del micelio de *L. edodes* y la producción de compuestos con actividad antioxidante dependen de la fuente de carbono que se emplee en el medio líquido utilizado para su cultivo.

7. **OBJETIVOS**

7.1. **Objetivo general**

➤ Comparar el crecimiento de la biomasa y determinar la concentración de polifenoles en micelio de *Lentinula edodes* desarrollado en medios de cultivo líquidos con distintas fuentes de carbono.

7.2. **Objetivos particulares**

➤ Determinar cuál es la fuente de carbono más eficiente para el crecimiento micelial del shiitake.

➤ Determinar la concentración de polifenoles y su relación con la fuente de carbono utilizada.

8. **MATERIALES Y MÉTODOS**

8.1. **Ubicación**

El trabajo detallado aquí, se realizó en el Laboratorio de Microbiología Aplicada del Jardín Botánico de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-I) ubicada en Tlalnepantla Estado de México.

8.2. **Cepa**

La cepa de *L. edodes* utilizada en este trabajo, se encuentra depositada en la colección del Laboratorio de Microbiología Aplicada del Jardín Botánico de la FES-Iztacala (JABIZ); la cual se entregó etiquetada como LE en agar extracto de malta (EMA), incubada durante 15 días a temperatura ambiente.

El mantenimiento y preservación de la cepa se realizó mediante resiembras semanales en medio PDA (Agar Papa Dextrosa) del laboratorio MERCK en una proporción de 48 g/L de agua destilada, el cual se vertió en cajas Petri desechables; previa esterilización en autoclave a 121°C - 15 PSI durante 15 min (Barba C. J. & López, C. J. 2017).

Pasadas 24 h de la prueba de esterilidad se sembraron 5 fragmentos circulares de 1 cm de diámetro por caja de cultivo, los cuales se obtuvieron utilizando un sacabocados, el cual se desinfectó con alcohol al 70 % y se esterilizó en la flama de un mechero Bunsen.

Posteriormente se procedió a incubar las cajas Petri inoculadas a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en total obscuridad.

8.3. Variables de estudio

8.3.1. Variable independiente

- La variación de la fuente de carbono en las distintas formulaciones de medios de cultivo líquidos, las cuales consisten en: glucosa, malta y sacarosa.

8.3.2. Variable dependiente

- Cantidad de biomasa obtenida en medio líquido.
- Fenoles totales en el micelio obtenido en medio líquido.

8.4. Condiciones de crecimiento de *L. edodes* en caja Petri.

De acuerdo con el trabajo de Castillo, (2008) y Barradas, (2015); las condiciones ideales del crecimiento vegetativo de *L. edodes* son: 25°C en total obscuridad; cabe destacar que hay cepas que pueden resistir un amplio rango de temperatura que va de los 13 a 25°C.

8.5. Formulación de los medios de cultivo líquidos

La formulación que se utilizó es la propuesta por Suarez, (2012); así como dos composiciones experimentales sustituyendo la fuente de carbono de la fórmula original.

8.5.1. Fórmula original (T₀)

20 g de glucosa, 2.5 g de extracto de levadura y 2.5 g de peptona; así como agua destilada necesaria para preparar 1 L de medio de cultivo.

8.5.2. Fórmula experimental 1 (T₁)

20 g de malta, 2.5 g de extracto de levadura y 2.5 g de peptona; así como agua destilada necesaria para preparar 1 L de medio de cultivo.

8.5.3. Fórmula experimental 2 (T₂)

20 g de sacarosa, 2.5 g de extracto de levadura y 2.5 g de peptona; así como agua destilada necesaria para preparar 1 L de medio de cultivo.

8.5.4. Preparación de los medios de cultivo

Se disolvieron los componentes sólidos de los medios en una porción del agua destilada y se aforaron a 1L. Una vez preparados los medios de cultivo líquidos se esterilizaron a 121 °C – 15 PSI durante 15 minutos, finalizado el tiempo de esterilización se vertieron en los frascos.

8.6. Inoculación de los medios de cultivo líquidos

Para la inoculación se utilizaron mecheros Bunsen y luz ultravioleta dentro de una cámara estéril para proveer condiciones asépticas durante este procedimiento.

Cada frasco se inoculó con 3 trozos de micelio obtenidos en caja Petri, con un diámetro de 1 cm.

Posteriormente los frascos fueron llevados a incubación a una temperatura de 25°C en total obscuridad, durante un periodo de 30 días.

8.7. Obtención y desecación del micelio

Finalizado el tiempo de incubación se recuperó el micelio mediante filtración y se realizó lectura del peso fresco de cada muestra en una balanza granataria marca OHAUS modelo 700, previo lavado con agua destilada. Posteriormente se desecó de forma natural, exponiéndolo al calor solar durante 5 días. Terminando este periodo se maceró en un mortero de porcelana, se colectó la muestra y se tomó el peso seco de las mismas.

8.8. Obtención del extracto etanólico de micelio de *L. edodes*

Para la obtención del extracto etanólico, se empleó la técnica propuesta por Alvarado, (2015) y adaptada al laboratorio por M. en C. Luis Antonio Hernández González, encargado del laboratorio de Microbiología Aplicada. La cual consistió en:

Utilizando un gramo de micelio (peso seco) se realizó una extracción, para ello se emplearon 30 ml de etanol al 55%, la cual se mantuvo en agitación y baño María durante 24 horas a 25°C, una vez concluida esta acción las muestras se llevaron a centrifugar durante 5 minutos a 4500 rpm en una centrifuga clínica marca SOLVAC modelo J-600, al finalizar el tiempo se recuperó el sobrenadante.

8.9. Determinación del contenido de polifenoles totales en *L. edodes*

Los polifenoles fueron analizados en los extractos etanólicos por espectrofotometría utilizando el reactivo Follin-Ciocalteau (Alvarado, 2015).

Inicialmente se realizó una curva patrón como estándar, utilizando ácido gálico iniciando en 50 mg/L hasta 500 mg/L.

La preparación de las muestras experimentales fue la siguiente:

Se tomaron 100 μ L de cada muestra, se adicionó 1.5 mL de reactivo Follin-Ciocalteau 0.2 N, posteriormente se homogenizó y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Terminado el tiempo se adicionó 1.2 mL de solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3 10% p/v) y se procedió a incubar durante 30 min a 40°C.

Una vez concluida la incubación se llevaron al espectrofotómetro marca VELAB modelo V-5000 y se leyó la absorbancia a 765 nm.

Los resultados obtenidos se graficaron y se interpolaron en la gráfica de la curva patrón para obtener el valor de cada muestra. Los resultados se reportaron como miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco (EAG mg/g de peso seco)

8.10. Análisis estadístico

Los datos obtenidos durante la experimentación fueron comparados por el método de análisis de varianza (ANOVA) y se expresan como media y desviación estándar ($\bar{x} \pm \text{DE}$) de 16 muestras por tratamiento. Así mismo se empleó la prueba de Tukey para establecer una diferencia significativa entre los tratamientos. El nivel de confianza se estableció en 95 %, por lo que $P < 0.05$.

8.11. Diseño experimental

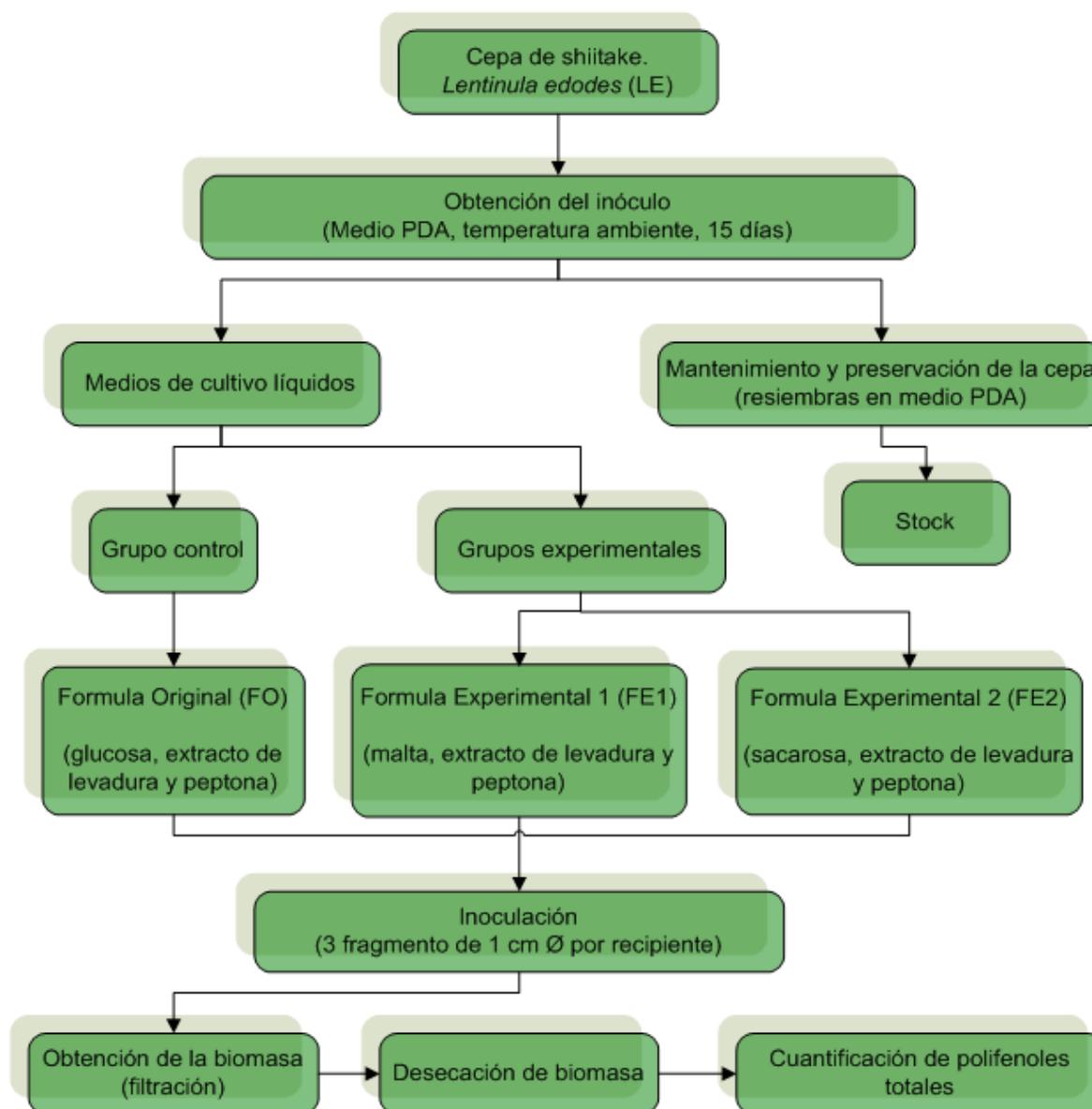


Figura 4. Diseño experimental para la determinación de fenoles totales en micelio de *L. edodes*.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Material biológico

La cepa utilizada durante la realización de este trabajo, quedó registrada en la sección de micología del herbario IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala como *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler.

Durante la activación de la cepa se pudo observar un desarrollo micelial típico, con crecimiento filamentososo, abundante y uniforme, sin la presencia de algún contaminante.

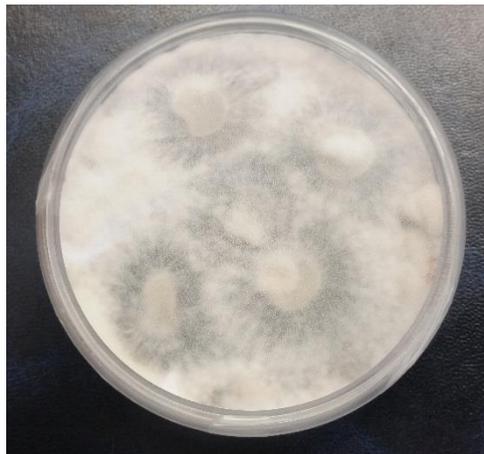


Figura 5. Desarrollo del micelio en medio EMA

9.2. Producción de biomasa de *L. edodes* en medios de cultivo líquido

Para realizar la comparación del crecimiento del micelio en los medios de cultivo líquidos, se sustituyó la fuente de carbono y se incubó durante 30 días. Este proceso se empleó dado que se logra obtener biomasa en un periodo corto, el manejo de los medios de cultivo es sencillo y al mismo tiempo la técnica permite tener un control mayor de los parámetros de crecimiento, por otro lado, la recuperación de la

biomasa es fácil en comparación de los medios de cultivo sólidos, así mismo este tipo de cultivo mejora la producción de metabolitos secundarios. Los resultados encontrados en este trabajo guardan una similitud con Mata *et al* en el 2001, quienes utilizaron extracto de malta y levadura para el desarrollo del micelio, mostrando un desarrollo similar con el utilizado en el presente. Así mismo se encuentra una semejanza con Suarez, 2012 quien también empleó extracto de levadura y peptona en las formulaciones, presentando un desarrollo similar con el descrito en este trabajo.

Cualitativamente el crecimiento del micelio en los medios de cultivo líquidos fue algodonoso, abundante y de color homogéneo, típico de un micelio tal como lo reporta Suarez en el 2012, sin embargo, existe una diferencia en el crecimiento; ya que esta autora utilizó agitación constante promoviendo la formación de cúmulos de micelio.

El desarrollo del micelio se pudo observar en la superficie de los medios de cultivo líquido, sin embargo, en algunas muestras se observó el crecimiento de fracciones de micelio formando conglomerados esféricos sumergidos en el medio. El desarrollo superficial del micelio observado en la mayoría de las muestras obedece a un crecimiento típico sin agitación. Sin embargo, en algunas muestras se obtuvo crecimiento de fracciones sumergidas de micelio lo cual se da en condiciones de agitación, dado que en este trabajo no hubo agitación, el crecimiento de estas esferas dentro del medio líquido de cultivo, se debió a que en algunos casos hubo desprendimiento de la masa hifal, lo que dio origen a otro conglomerado de hifas dentro del medio de cultivo, así mismo se observó que en algunas muestras, durante la inoculación, el trozo de micelio con el cual se realizó la siembra se depositó en el fondo del recipiente.

En la figura 5 se puede observar la biomasa húmeda de shiitake crecida en los diferentes medios de cultivo, de acuerdo a la prueba de ANOVA no existen diferencias

significativas entre los tratamientos, sin embargo se obtuvo mayor rendimiento en el T₀ con una media de 4.22 g de micelio, seguido del T₂ con 4.20 g y finalmente el T₁ en el cual se obtuvieron 4.18 g de micelio, en éste último tratamiento también se observa que la desviación estándar es mayor comparado con los otros dos tratamientos, mientras que el T₀ mostro un comportamiento más homogéneo.

Los resultados de biomasa húmeda obtenida por cada litro de medio de cultivo se pueden observar en la figura 6, en donde se aprecia que la mayor cantidad de micelio se obtuvo en el T₀ con 16.89 g/L, seguido de T₂ con 16.8 g/L y finalmente T₁ con 16.58 g/L. Los datos obtenidos en este trabajo muestran un mejor rendimiento a lo reportado por Suárez (2012), en donde indican que la biomasa obtenida fue de 10.1 g/L. Cabe destacar que esta variación puede estar influenciada por la distinta composición de los medios de cultivo líquidos, además cabe señalar que independientemente de que se trate de la misma especie de hongo, las cepas pueden presentar una diferencia en el metabolismo de los nutrientes. Se puede notar que el T₀ tuvo un comportamiento más homogéneo en comparación con T₁ donde la desviación estándar es la mayor de los 3 tratamientos. En la prueba estadística ANOVA para este rubro no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos.

En la figura 8 se observan los resultados de los pesos que se obtuvieron posteriores a la deshidratación del micelio y antes de la extracción etanólica. En donde de acuerdo a la prueba de ANOVA no existe una diferencia significativa entre los tratamientos. Sin embargo, si solo se consideran las medias, se observa que en el tratamiento T₀ se obtuvo mayor cantidad de micelio en relación al peso seco, seguido del T₁ y terminando con T₂ el cual presentó el peso seco menor en comparación con los demás tratamientos.

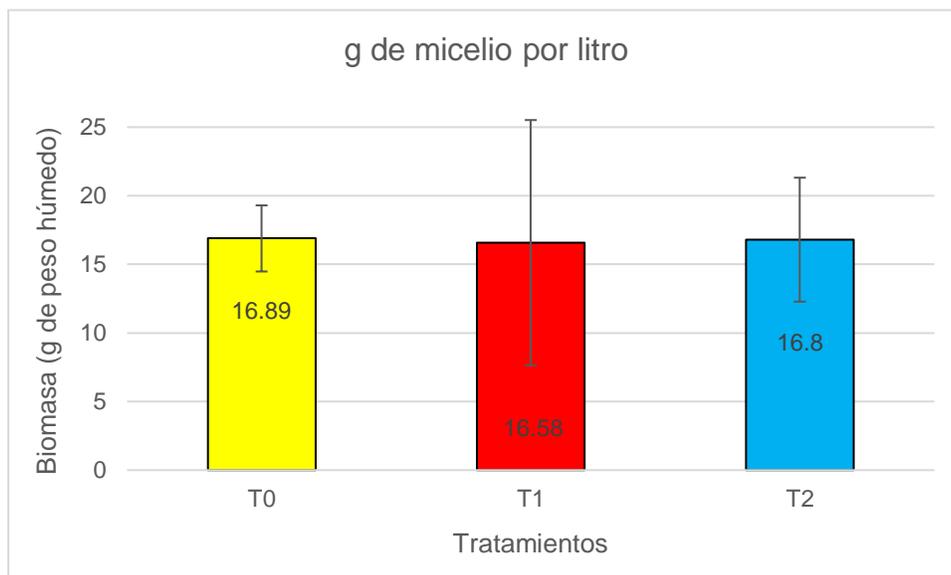


Figura 6. Comparación de la biomasa obtenida por litro de medio de cultivo. Se presenta $\bar{x} \pm DE$ de 16 muestras por tratamiento.



Figura 7. Producción micelial de *L. edodes* en medios líquidos con diferente fuente de carbono.

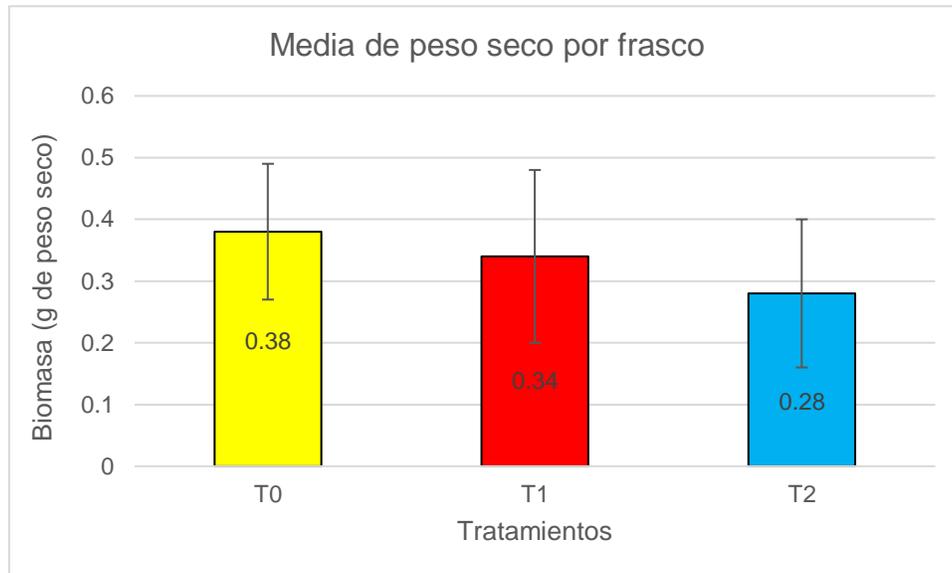


Figura 8. Comparación del peso seco de la biomasa por tratamiento. Se presenta $\bar{x} \pm DE$ de 16 muestras por tratamiento.

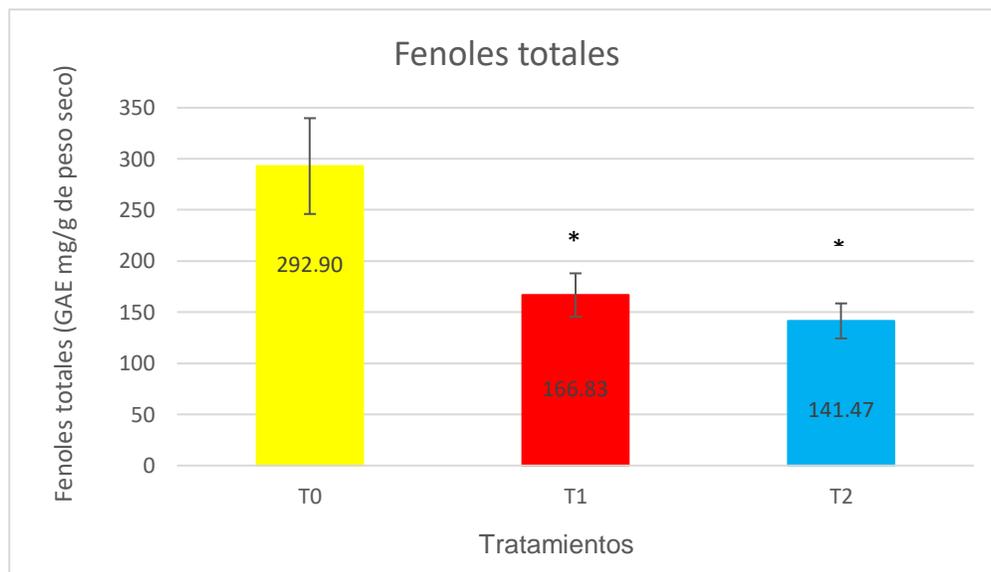


Figura 9. Concentración de fenoles totales de micelio de *L. edodes*. Se presenta $\bar{x} \pm DE$ de 16 muestras por tratamiento.

9.3. Contenido de fenoles totales en micelio de *L. edodes*

Los resultados obtenidos de fenoles totales por gramo de micelio deshidratado se pueden observar en la figura 9. En donde se puede ver que el micelio crecido en T₀ fue el que presentó mayor concentración de fenoles totales con 292.90 ± 46.85 mg/g peso seco, seguido de T₁ con 166.83 ± 21.18 mg/ g peso seco y finalmente T₂ el cual obtuvo la menor concentración con 141.47 ± 17.14 mg/g peso seco. Los valores obtenidos contrastan con lo reportado por Barradas, 2015; quien obtuvo un intervalo de 3.78 – 6.50 mg EAG, no obstante, cabe señalar que la medición de polifenoles totales se realizó en carpóforos de dos distintas cepas, crecidas en 3 diferentes sustratos. Así mismo Alvarado 2015, reporta una cantidad más alta comparada con Barradas 2015, pero menor a la encontrada en este trabajo, que va de 10.99 – 18.45 mg EAG en *Pleurotus djamor*.

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con ANOVA, lo que arrojó como resultado que si existe una diferencia significativa en la concentración de fenoles totales de acuerdo a la composición nutrimental del medio de cultivo en el que haya crecido el micelio.

10. CONCLUSIÓN

- De las tres fuentes de carbono utilizadas en el presente trabajo, no se encontró una que dé mayor rendimiento en la producción de biomasa, sin embargo, el comportamiento en el crecimiento fue bueno, ya que se obtuvo buena cantidad de micelio en los medios líquidos.
- La utilización de glucosa como fuente de carbono durante la síntesis de metabolitos secundarios dio como resultado una cantidad mayor de polifenoles comparado con las otras fuentes de carbono.
- La concentración de polifenoles en micelio de shiitake, resultó ser mayor en comparación con los trabajos cotejados en donde estos compuestos se obtuvieron de los carpóforos.
- La utilización de micelio para fines de estudio de metabolitos secundarios es factible dado el menor tiempo de obtención de la biomasa.

11. ANEXOS

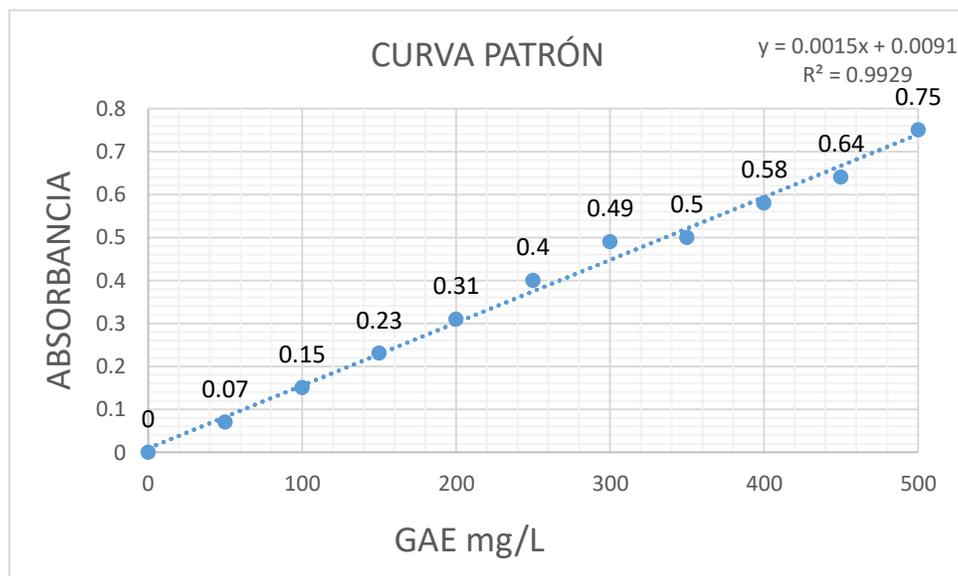


Figura 10. Curva patrón para la determinación de EAG mg/L de las muestras.



Figura 11. Preservación y conservación de la cepa de *L. edodes* en agar EMA

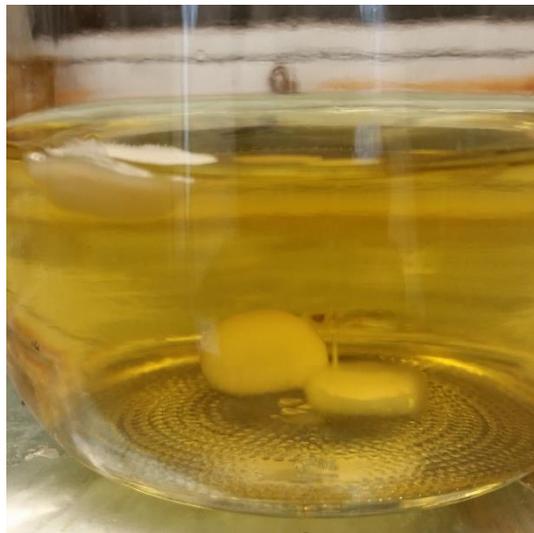


Figura 12. Crecimiento del micelio de *L. edodes* en el interior del medio de cultivo.



Figura 13. Recuperación de la biomasa desarrollada en los medios de cultivo líquidos

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, A. E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J., Valenzuela, R. (2014). *Biodiversity of fungi in Mexico*. Revista Mexicana de Biodiversidad, 85, 76-81.
- Alvarado, C. E. (2015). *Evaluación del efecto del contenido nutrimental en diferentes medios de cultivo sobre la producción y contenido de polifenoles en Pleurotus djamor (Rumph. Ex. Fr.) Boejin para determinar la actividad antioxidante*. (Tesis de licenciatura en Biología). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Tlalnepantla, Estado de México.
- Barba C. J., López, C. J. (2017). *Guía práctica para el cultivo de setas*. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. CDMX. México.
- Barradas, Z. M. (2015). *Efecto de diferentes sustratos y cepas sobre las características físico-químicas y compuestos con actividad antioxidante en carpóforos de shiitake (Lentinula edodes)*. (Tesis de Maestría en Ciencias Alimentarias). Universidad Veracruzana. Jalapa, Veracruz, México.
- Bisen, P. S., Baghel, R. K., Sanodiya, B. S., Thakur, G. S., Prasad, G. B. (2010). *Lentinus edodes: A macrofungus with pharmacological activities*. Current Medicinal Chemistry, 17, 2419-2430.
- Carrera, D. M., Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M., Martínez, W. (2006). *México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles*. ECOSUR-IE-UNAM-COLPOS. México, DF.
- Castillo, C. C. (2008). *Estudio comparativo de tres sustratos para la producción de shiitake Lentinus edodes Sing (Berg) en Yahuarcocha, Imbabura*. (Tesis de Ingeniería Agropecuaria). Universidad Técnica del Norte. Ibarra, Ecuador.
- Chen, A. W. (2005). *¿Qué es el shiitake? Mushroom grower's handbook 2: Shiitake Cultivation*. MushWorld. Seoul, Korea.

- Cubris, G. N. (2011). *Caracterización de la microbiota contaminante del cultivo de Lentinula edodes (shiitake) en diferentes residuos agroforestales*. (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Díaz, C. N. (2010). *Evaluación de la producción de dos especies de hongos comestibles silvestres, utilizando residuos agrícolas como sustrato*. (Tesis de maestría en Ciencias. Microbiología). Universidad Autónoma de Nuevo León. Linares, Nuevo León, México.
- Finimundy, T. C., Dillon, A. J., Henriques, J. A., Ely, M. R. (2014). *A review on general nutritional compounds and pharmacological properties of the Lentinula edodes mushroom*. Food and Nutrition Sciences, 5, 1095-1105.
- Gaitán, H. R., Salmones, D., Pérez, M. R., Mata, G. (2006). *Manual práctico del cultivo de setas: Aislamiento, siembra y producción*. 1ª edición, 2ª reimpresión. Instituto de Ecología A. C. Xalapa, Veracruz, México.
- García, C. I. (2003). *Experimentación de diferentes tipos de sustrato para el cultivo de L. edodes (shiitake) y su desarrollo químico-biológico*. (Tesis de licenciatura en biología). Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México.
- Guzman, G. (2008). *Diversity and use of traditional mexican medicinal fungi*. International Journal of Medicinal Mushrooms, 10(3), 209-217
- Hinestroza, L. I., López, M. A. (2008). *Aspectos relacionados con la producción de Lentinula edodes (shiitake): una seta con alto potencial alimenticio y medicinal*. Temas selectos de ingeniería de alimentos 2. Universidad de las Américas. San Andrés Cholula, Puebla, México.
- Kang, S. (2005). Preparación de spawn de shiitake principalmente con aserrín. Mushroom growers handbook 2: Shiitake Cultivation. MushWorld. Seoul, Korea.
- López, P. D., Gutiérrez, A. & Esqueda M. (2013). *Cinética de crecimiento y composición química del micelio de Lentinula edodes cultivado en medio líquido suplementado con extractos de madera de vid*. Revista Mexicana de Micología, 37, 51-59.

-
- Mata, G., Delpech, P., Savoie, J. (2001). *Selection of strains of Lentinula edodes and Lentinula boryana adapted for efficient mycelial growth on wheat straw*. Revista Iberoamericana de Micología, 18, 118-122.
 - Maureen, H. A., Prieto, G.E. (1999). *Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida*. Revista Cubana de Investigación Biomédica, 18(1), 12-4.
 - Pedreros, M. J. (2007). *Evaluación del crecimiento y producción de L. edodes (SHIITAKE), en residuos agroindustriales*. (Tesis de licenciatura de Microbiología industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
 - Pegler, D. M. (1983). *The genus Lentinula (Tricholomataceae tribe collybiaeae)*. Sydvia 36: 227-239.
 - Rivera, O., Albarracín, W., Lares, M. (2017). *Componentes Bioactivos del Shiitake (Lentinula edodes Berk. Pegler) y su impacto en la salud*. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica, 36(3), 67-71.
 - Rodríguez, V. N., Jaramillo, L. C. (2005). *Cultivo de hongos medicinales en residuos agrícolas de la zona cafetalera*. CENICAFE. Caldas, Colombia.
 - Romero, A. O., Martínez, G. M., Damián, H. M., Ramírez, V. B., López, O. J. (2015). *Producción de hongo shiitake (Lentinula edodes Pegler) en bloques sintéticos utilizando residuos agroforestales*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 6(6), 1229-1238.
 - Sanchez, V. J., Royse, D. J. (2001). *La biología y el cultivo de Pleurotus spp*. El Colegio de la Frontera Sur. San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México.
 - Suarez, A. C. (2012). *Utilización de la fermentación líquida de Lentinula edodes (shiitake), para la producción de metabolitos secundarios bioactivos y evaluación de su potencial empleo en un alimento funcional*. (Tesis de Magister en Ciencias y Tecnología de alimentos). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
 - Suarez, A. C., Holguín H. M. (2011). *Evaluación de medios de cultivo sintéticos y cereales para la producción de semilla de setas comestibles*. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 1(5), 130-140.

- Villegas, V., Pérez, A. M., Arredondo, C. (2007). *Evaluación del crecimiento de Lentinula edodes en medios de cultivo sólidos para la producción de micelio como inóculo*. Revista Colombiana de Biotecnología, 9(2), 56-63.
- Zembron, L. A., Gajewski, M., Naczek, M., Siatkowski, I. (2013). *Effects of shiitake (Lentinus edodes) extract on antioxidant and inflammatory response to prolonged eccentric exercise*. Journal of Physiology and Pharmacology, 64(2), 249-254.