



**UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

MAESTRÍA EN QUÍMICA APLICADA

TEMA:

**PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS A PARTIR DE HONGOS
COMESTIBLES *LENTINULA EDODES* A DIFERENTES CONDICIONES DE
POTENCIAL DE HIDRÓGENO (pH).**

AUTOR:

Ing. María Fabiola Heredia Cali

DIRECTOR TFM: Ing. Juan Diego Valenzuela Cobos, PhD.

MILAGRO, MARZO DE 2022

ECUADOR

ACEPTACIÓN DE TUTORÍA

Por la presente hago constar que he analizado el proyecto de grado presentado por la maestrante Ing. María Fabiola Heredia Cali, para optar al título de Magister en Química Aplicada y que acepto tutoriar a la maestrante, durante la etapa de desarrollo del trabajo hasta su presentación, evaluación y sustentación.

Milagro a los 07 días del mes de febrero del 2022.



Ing. Juan Diego Valenzuela Cobos. PhD

C.I 0927981670

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

El autor de esta investigación declara ante el comité académico del Programa de Maestría en Química Aplicada de la Universidad de Milagro, que el trabajo presentado es de mi propia autoría, no contiene material escrito por otra persona, salvo el que esta referenciado debidamente en el texto; parte del presente documento o en su totalidad no ha sido aceptado para el otorgamiento de cualquier otro Título de una institución nacional o extranjera.

Milagro a los 18 días del mes de marzo de 2022.



Ing. María Fabiola Heredia Cali

C.I 0912976446

CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR para a la obtención del título de **Magister en Química Aplicada** otorga al presente trabajo de **Titulación** las siguientes calificaciones:

MEMORIA CIENTÍFICA	(60)
DEFENSA ORAL	(36,6)
TOTAL	(96,6)
EQUIVALENTE	(EXCELENTE)



PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL

Delia Noriega Verdugo, MSc.



DIRECTOR/A TFM

Juan Valenzuela Cobos, PhD.



SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

Ana Echavarría Vélez, PhD

DEDICATORIA

*Un día fue un sueño, hoy se convierte en realidad, este trabajo está dedicado a Dios, por darme
fortaleza y permitirme llegar a culminar este proyecto.*

A mi hijo Kenny David, por ser la fuente de inspiración, y el horizonte en mi vida.

A mi familia, por su apoyo constante e incondicional.

AGRADECIMIENTO

Este proyecto de tesis se complementa con la colaboración de personas que aportaron en un momento determinado. De quién a veces uno no espera una ayuda, ahí están las personas de buen corazón que sin conocerte extienden sus manos, gracias Dios, por darme la oportunidad de conocer estas lindas personas.

Mi agradecimiento a mi tutor, Ing. Juan Diego Valenzuela Cobos, PhD, quién estuvo al frente de este proyecto, gracias a sus conocimientos y apoyo durante todo el proceso, por su guía, paciencia, y dedicación.

A la Facultad de Ingeniería Química, de la Universidad de Guayaquil, a sus docentes, Ing. Mirella Bermeo, Ing. Luis Bonilla, y de manera especial al Ing. José Baquerizo.

A mis padres Ana Cali y Jorge Heredia, a mis hermanos: Nancy, Isabel y Jorge Luis, a mis sobrinos, por su apoyo constante, por siempre confiar en mí.

A mi amigo de universidad, Ing. Manuel Ruíz, por su apoyo moral y guía, llegando justo en la culminación del proceso.

GRACIAS A TODOS

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Doctor.

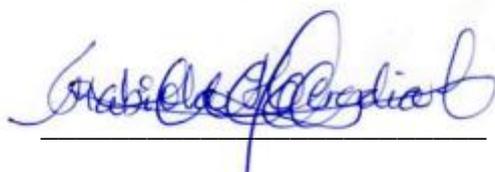
Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Mediante el presente documento, libre y voluntariamente procedo a hacer entrega de la Cesión de Derecho del Autor del Trabajo realizado como requisito previo para la obtención de mi Título de Cuarto Nivel, cuyo tema fue...**PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS A PARTIR DE HONGOS COMESTIBLES *LENTINULA EDODES* A DIFERENTES CONDICIONES DE POTENCIAL DE HIDRÓGENO (pH)**... y que corresponde a la Dirección de Investigación y Postgrado.

Milagro, 18 de marzo del 2022.



Ing. María Fabiola Heredia Cali

CI: 0912976446

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	3
EL PROBLEMA.....	3
1.1 . PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.1.1 Problematización.....	3
1.1.2 Delimitación del problema.....	3
1.1.3 Formulación del problema.....	3
1.2. OBJETIVOS.....	4
1.2.1. Objetivo General.....	4
1.2.2 Objetivo Específico.....	4
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	5
CAPITULO II.....	6
MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. GENERALIDADES DE LOS HONGOS COMESTIBLES.....	6
2.2. Taxonomía de los hongos comestibles.....	7
2.3 Clases de hongos comestibles.....	8
2.4 Ciclo sexual basidiomycetes.....	9
2.5 Importancia de los hongos.....	10
2.6 Morfología del hongo <i>Lentinula edodes</i>	11
2.6.1. Sombrero.....	12
2.6.2. Himenio.....	12
2.6.3. Anillo.....	12
2.6.4. Pie	12
2.6.5. Volva.....	12
2.6.6. Micelio.....	13

2.7 Propiedades biológicas del hongo.....	13
2.7.1. Propiedades antioxidantes.....	14
2.7.2. Propiedades antimicrobianas.....	14
2.8 Composición nutricional.....	14
2.9 Componentes de los medios de cultivo.....	15
2.9.1. Carbono.....	15
2.9.2. Nitrógeno.....	15
2.10 Técnicas de cultivo.....	16
2.10.1 Cultivo tradicional.....	17
2.10.2 Fermentación por estado sólido.....	17
2.10.3 Fermentación por estado líquido.....	18
2.11. Selección del microorganismo.....	20
2.12. Selección del sustrato.....	20
2.13. Compuestos bioactivos del Shiitake.....	20
2.13.1. Eritadenina.....	21
2.13.2. Lentinan.....	21
2.13.3. Ergosterol.....	22
2.13.4. Quitina y Quitosano.....	23
2.13.5. Polisacáridos.....	23
2.14. Condiciones óptimas para cultivar exopolisacáridos.....	24
2.15. Selección de la cepa.....	24
2.16. Medios de Cultivos.....	25
CAPITULO III.....	26
3.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	26

3.1 Materiales.....	26
3.1.2. Reactivos.....	26
3.1.3. Equipos.....	27
3.2. Cepas, medios y condiciones de cultivo.....	27
3.2.1. Cepa.....	27
3.2.2. Inoculación de la cepa.....	27
3.2.3. Conservación de la cepa y precultivo.....	27
3.3. Preparación del medio de cultivo.....	27
3.3.1. Condiciones operativas del cultivo.....	28
3.4. Producción de la biomasa.....	28
3.5. Producción de exopolisacáridos.....	28
3.6. Descripción de flujo gramas de las técnicas empleadas para la determinación del medio de cultivo.....	29
3.7. Descripción de flujo gramas para la producción de biomasa de <i>Lentinula edodes</i>.....	30
3.8. Descripción de flujo gramas para la producción de exopolisacáridos de <i>Lentinula edodes</i>.....	31
CAPITULO IV.....	32
4.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1. Determinación del medio de cultivo.....	32
4.2. Producción de biomasa.....	33
4.2.1. Producción de biomasa de <i>Lentinula edodes</i> cepa XX12.....	33
4.2.2. Producción de biomasa de <i>Lentinula edodes</i> cepa XY01.....	34
4.2.3. Tablas comparativas de producción de biomasa.....	35
4.2.4. Gráficos comparativos en producción de biomasa de las cepas <i>Lentinula edodes</i> XX12.....	36

4.2.5. Gráficos comparativos en producción de biomasa de las cepas <i>Lentinula edodes</i> XY01.....	37
4.2.6. Relación de muestras en la producción de biomasa en cepa <i>Lentinula edodes</i> XX12.....	38
4.2.7. Relación de muestras en la producción de biomasa en cepa <i>Lentinula edodes</i> XY01.....	39
4.2.8. Relación de valores en la producción de biomasa en cepa <i>Lentinula edodes</i> cepa XY01.....	40
4.3. Producción de exopolisacáridos a partir de hongos <i>Lentinula edodes</i> evaluados a diferentes concentraciones de pH.....	41
4.3.1. Producción de exopolisacáridos a partir de <i>Lentinula edodes</i> XX12.....	41
4.3.2. Producción de exopolisacáridos a partir de <i>Lentinula edodes</i> XY01	42
4.3.3. Tablas comparativas de producción de exopolisacáridos.....	43
4.3.4. Gráficos comparativos de producción de exopolisacáridos a partir de <i>Lentinula edodes</i> XX12.....	44
4.3.5. Gráfico comparativo de producción de exopolisacáridos a partir de cepa <i>Lentinula edodes</i> XY01	45
CAPITULO V.....	46
5.1 Conclusiones.....	46
5.2 Recomendaciones.....	46
5.3 Referencias Bibliográficas.....	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.....	8	
Taxonomía del <i>Lentinula edodes</i>		
Cuadro 2.....	20	
Compuestos activos del shiitake		
Cuadro 3.....	33	
Producción de biomasa a partir de hongos <i>Lentinula edodes</i> cepa XX12 evaluadas a diferentes concentraciones de pH		
Cuadro 4.....	34	
Producción de biomasa a partir de hongos <i>Lentinula edodes</i> , cepa XY01 evaluadas a diferentes concentraciones de pH		
Cuadro 5.....	35	
Producción de biomasa XX12		
Cuadro 6.....	35	
Producción de biomasa XY01		
Cuadro 7.....	36	
Valores comparativos de biomasa de <i>Lentinula edodes</i> XX12		
Cuadro 8.....	37	
Valores comparativos de biomasa de <i>Lentinula edodes</i> XY01		
Cuadro 9.....	38	
Diferenciación de biomasas XX12		
Cuadro 10	39	
Diferenciación de biomasa XY01		
Cuadro 11.....	40	
Relación de pesos de biomasa <i>Lentinula edodes</i> XY01.....		41

Cuadro 12.....	42
Producción de exopolisacáridos a partir de <i>Lentinula edodes</i> XX12	
Cuadro 13.....	43
Producción de exopolisacáridos a partir de <i>Lentinula edodes</i> XY01	
Cuadro 14	44
Valores comparativos de exopolisacáridos de <i>Lentinula edodes</i> XX12	
Cuadro 15	45
Valores comparativos de exopolisacáridos de <i>Lentinula edodes</i> XY01	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	8
Shiitake cultivado en Quito	
Figura 2.....	10
Ciclo sexual basidiomicetes	
Figura 3.....	11
Partes del hongo	
Figura 4.....	21
Eritadenina	
Figura 5.....	22
Estructura básica del Lentinan	
Figura 6.....	23
Estructura del Ergosterol	
Figura 7.....	32
Tasa de crecimiento micelial	
Figura 8.....	36
Producción de biomasa de <i>Lentinula edodes</i> XX12.	
Figura 9.....	37
Producción de biomasa de <i>Lentinula edodes</i> XY01	
Figura 10.....	40
Relación de pesos de biomasa de <i>Lentinula edodes</i> XY01	
Figura 11.....	44
Producción de exopolisacáridos de <i>Lentinula edodes</i> XX12	
Figura 12	45
Producción de exopolisacáridos de <i>Lentinula edodes</i> XY01	

RESUMEN

Los hongos *Lentinula edodes* son originarios de Asia, actualmente se cultivan en varias regiones desde Europa hasta América Latina, estos macromicetos son de gran importancia a nivel nutricional por sus componentes bioactivos que mantiene en su composición, en la parte medicinal se destaca en el área farmacológica por sus propiedades biológicas como: antioxidante, antitumorales inmunomoduladoras, antihistamínica, antiinflamatorio, antivirales y hepatoprotectores, también es empleado en el área cosmética.

En el área ambiental se destaca por sus biomoléculas que actúan como adsorbentes en la eliminación de gérmenes en los caudales residuales que desembocan hacia los ríos evitando así la contaminación del ambiente.

El objetivo de esta investigación es mediante la producción de biomasa obtener mayor cantidad de biomoléculas a partir de diferentes concentraciones, realizando un estudio efímero en su proceso de acuerdo a sus concentraciones las cuales varían dependiendo de varios factores.

Se realiza el proceso considerando la fermentación por estado líquido que se caracteriza por ser la ideal para obtener mayor cantidad de biomasa y exopolisacáridos.

Palabras claves: biomoléculas, fermentación, biomasa, bioactivos, macromicetos.

ABSTRACT

The *Lentinula edodes* mushrooms are native to Asia, currently they are cultivated in several regions from Europe to Latin America, these macromycetes are of great importance at a nutritional level due to their bioactive components that they maintain in their composition, in the medicinal part they stand out in the pharmacological area. Due to its biological properties such as: antioxidant, immunomodulatory antitumor, antihistamine, anti-inflammatory, antiviral and hepatoprotective, it is also used in the cosmetic area.

In the environmental area, it stands out for its biomolecules that act as adsorbents in the elimination of germs in the residual flows that flow into the rivers, thus avoiding environmental contamination.

The objective of this research is through the production of biomass to obtain a greater amount of biomolecules from different concentrations, carrying out an ephemeral study in its process according to its concentrations, which vary depending on several factors.

The process is carried out considering liquid state fermentation, which is characterized as being ideal for obtaining a greater amount of biomass and exopolysaccharides.

Keywords: biomolecules, fermentation, biomass, bioactives, macromycetes

INTRODUCCIÓN

Lentinula edodes más conocido en China como Shiitake, durante muchos años ha sido considerado uno de los alimentos más apetecidos por la cultura asiática y varios países del mundo, especialmente por su sabor característico. El shiitake ocupa el segundo lugar después de *Agaricus bisporus* como el hongo comestible más consumido en todo el mundo. (Gaitán-Hernández et al., 2014).

Estos compuestos, llamados nutraceuticos de hongos, al exhibir sus cualidades ya sea medicinal o tónicas y tienen un inmenso potencial como suplementos dietéticos para su uso en la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades humanas. Chang & Miele. (2004).

En la actualidad los estudios realizados a estos macromicetos han demostrado variedad en sus propiedades destacándose en sus actividades biológicas como: antioxidante, antiinflamatorio, antihistamínica, antitumorales, inmunomoduladores, antivirales y hepatoprotectores, por lo cual es empleado en el área: medicinal, farmacéutica, cosmética.

Así también los componentes bioactivos obtenidos a partir de los cuerpos corpóforos, mantienen propiedades ricas en: componentes cuya determinación indica aptos para su obtención y mantenimiento de sus propiedades como: bioadhesivos, probióticos, gelificantes, espesantes, bioadsorbentes, emulsionantes y estabilizadores.

En la actualidad el cultivo de macrohongos, ha revolucionado la ciencia con la obtención de ciertos componentes a partir de la obtención de su biomasa donde se caracteriza ciertos compuestos que servirán de gran utilidad para ser empleados en la eliminación de bacterias, contribuyendo al beneficio del medio ambiente.

Actualmente la contaminación ambiental ocasionada por el sector industrial, donde su efluente en la mayoría de los casos no tiene un mecanismo de tratamiento de aguas en buenas condiciones, ha provocado que este caudal lleve consigo materiales tóxicos perjudiciales para el ciclo biodegradación de los efluentes a nivel industrial, provocando el deterioro de la biodiversidad que se

encuentra en el entorno. De tal manera es empleado en su proceso de purificación en el tratamiento de aguas residuales captando con sus macromicetos los iones metálicos pesados que llevan en composición las aguas residuales de las diferentes empresas, ayudando al equilibrio de la biodiversidad del ambiente.

El objetivo de este trabajo es evaluar la producción de la cantidad de biomasa obtenida a partir de los diferentes medios de cultivo utilizados, de acuerdo a los parámetros de pH, y evaluar el crecimiento del micelio.

CAPÍTULO 1

EL PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1.1 PROBLEMATIZACIÓN

La naturaleza continuamente viene siendo afectada por las constantes contaminaciones provocadas por el hombre especialmente producidas por las vertientes de las fábricas hacia las desembocaduras de sus efluentes, evitando de esta manera el crecimiento normal de la biodiversidad de su entorno.

En la actualidad el desarrollo industrial, ha ocasionado la contaminación de los efluentes que se eliminan al mar, provocando esto que se mezclen toda clase de elementos tóxicos , empleando las industrias métodos convencionales para suplir sus necesidades y en muchos de los casos emplean procesos costosos, con resultados poco favorables, sin poder captar la mayor cantidad de iones metálicos pesados o en su efecto sin poder atrapar los elementos iónicos de menos peso, debido a este inconveniente se realiza el estudio de los elementos bioadsorventes.

1.1.2 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Las cepas de los hongos *Lentinula edodes* recolectadas desde el cepario Fungi Andino, son cepas de tipo comercial, serán valorados en su producción para la obtención de exopolisacáridos, considerando evaluar las condiciones de pH, para obtener la mayor cantidad de biomasa.

1.1.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

- ¿Es factible obtener una apreciable o suficiente cantidad de biomasa del hongo *Lentinula Edodes* a partir de un medio de pH?
- ¿A qué cantidad de pH se obtendría la mayor cantidad de exopolisacáridos?

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo General

Evaluar la producción de biomasa de extractos de exopolisacáridos de cultivos sumergidos de las cepas *Lentinula edodes*.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar la cinética de crecimiento de extractos de exopolisacáridos de cultivos sumergidos de las cepas *Lentinula edodes*.
- Determinar la composición química de extractos de exopolisacáridos de cultivos sumergidos de las cepas *Lentinula edodes*.

1.3. JUSTIFICACIÓN

El impacto ambiental causado en el agua de los ríos a causa del material tóxico eliminado hacia las vertientes residuales sigue en aumento provocando en el hombre alteraciones en la salud. En la actualidad la degradación del ambiente es causa de varias enfermedades para el ser humano, en especial si es ocasionada desde los efluentes industriales. La comunidad científica se ha visto en la necesidad de realizar investigaciones con el fin de precautelar la seguridad ambiental realizando estudios acerca de la toxicidad de los efluentes industriales, para la cual ha creado varios métodos de extracción de metales como: precipitación química, intercambio iónico, osmosis inversa, filtración, tratamiento electroquímico, tecnologías de membrana, y recuperación por evaporación, resultando estos procedimientos muy costosos y no muy eficaces, de acuerdo a estos inconvenientes surgidos en los procesos de tratamientos de aguas residuales, se ha realizado estudios de acuerdo a la necesidad de resaltar con un método que abarque el procedimiento del tratamiento de la absorción de metales pesados por medio de cuerpos biodegradables. El método de la adsorción de metales pesados por medio de biomateriales resulta más conveniente para tratar los efluentes industriales, ante los métodos convencionales con los que venían trabajando, ofreciendo ventajas como: no se emplea o se minimiza químicos, utiliza menos tiempo de proceso, evita la formación de lodos, atrapa la mayor cantidad de elementos tóxicos desde un mínimo de peso molecular.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. GENERALIDADES DE LOS HONGOS COMESTIBLES

GENERALIDADES

China es considerada el país de origen del hongo *Lentinula edodes*, admitido como la fuente principal de alimento más apetecido por la cultura asiática, además de resaltar sus propiedades nutritivas y sabor, así también sus propiedades curativas. China es también el líder de las exportaciones de hongos cultivados. (Boa, 2005)

Lentinula edodes más conocido con el nombre japonés como Shiitake, seta negra, es un hongo comestible nativo del este de Asia, apetecido por su sabor exquisito en los países del norte, es el hongo de mayor consumo en el mundo ocupa el segundo lugar, antecedido por el champiñón blanco (*Agaricus bisporus*) cuya producción es muy costosa, haciendo su comercialización imposible para productores medianos o pequeños.

En la antigüedad era conocido como activador de la fuerza vital, proporcionador de la longevidad, ayuda a restablecer el sistema inmune.

Los hongos son organismos heterótrofos que deben obtener todos sus requerimientos nutritivos del sustrato. En este sentido, se diferencian de las plantas superiores autótrofas, que obtienen agua y nutrientes inorgánicos del suelo y sintetizan compuestos orgánicos en las hojas a través de la fotosíntesis (Chang & Miles, 2004)

Su reproducción es asexual, pertenece al reino Fungi, su división es basidiomicota, pertenece al orden de los agaricales. Está constituido por filamentos en forma de hilos a los que se denominan Hifas, éste enlazado de hifas forma el cuerpo del hongo llamado pie o, el micelio es la parte de las hifas que se encuentra en la parte interna de la tierra y que después darán origen a los primordios los que formado por sus partes como el píleo (sombrero) es la parte más consumida, el estipe (tallo) es separado no es comercializado, posee alto contenido de fibra.

Los hongos *Lentinula* que se producen en regiones tropicales o subtropicales se cultivan en edificios con temperatura controlada o en áreas montañosas donde la temperatura es más baja, o la fructificación es estacional y sigue un período de baja temperatura.(Chang & Miles, 2004)

Los hongos producen enzimas que degradan los materiales lignocelulósicos para su propio crecimiento. y fructificación. Esto demuestra la impresionante capacidad de los hongos para la "biosíntesis", que es diferente de la "fotosíntesis" de las plantas verdes. Los hongos no solo pueden convertirse en alimentos nutritivos y ricos en proteínas, sino que también pueden proporcionar productos nutricionales y farmacéuticos. (Chang & Miles, 2004)

El (*Lentinula edodes*), es conocido por en su composición por poseer mayor cantidad de proteínas y vitaminas que los vegetales, por lo cual es recomendado en la dieta diaria para el consumo, es reconocido por sus propiedades biológicas en la determinación de metabolitos como productos de actividad alta, utilizados en medicina para contrarrestar diferentes tipos de cáncer, excelente reductor del colesterol y preventor de enfermedades cardiovasculares.

En la actualidad en nuestro país no se desarrolla su producción en volumen, sus propiedades no han sido aprovechadas, en la investigación medicinal no han tenido éxito.

2.2. TAXONOMÍA DEL HONGO *LENTINULA EDODES*

Conocido a nivel mundial como Shiitake su nombre común, *Lentinula edodes* su nombre científico, también se lo conoce con diferentes nombres. En los EE. UU. también se conoce como el hongo de la selva negra. En Francia, se conoce como lectina. En China es conocido como Xiang-gu, hongo fragante, dong-gu el hongo de invierno y hua-gu el hongo flor.

Durante mucho tiempo, el shiitake fue conocido como *Lentinus edodes* (Berk) Singer, especialmente entre los cultivadores de hongos. En 1975 Pegler propuso que esta especie se transfiera a *Lentinula*. La justificación de la transferencia se basó en estudios microscópicos. El género *Lentinula* es momomítica (un tipo de micelio), por lo que las especies de este género no contienen hifas dimíticas en

la pulpa del hongo que se ve en el género *Lentinus*. Según el autor (Handbook, 2005).

La taxonomía del *Lentinula edodes* está determinada por Pegler, 1983 de acuerdo a la siguiente tabla:

Cuadro 1. Taxonomía del *Lentinula edodes*

Reino	Fungi
División	Bacidiomycota
Clase	Bacidiomycetes
Subclase	Agaricomycetidae
Orden	Agaricales
Familia	Agaricaceae



Fuente: autor

Figura 1. Shiitake cultivado en Quito

2.3. CLASES DE HONGOS COMESTIBLES

En nuestra dieta diaria hemos consumido una variedad de hongos nutricionales desde la época de la prehispanica, ya sea por su textura, su agradable sabor.

Entre las principales especies cultivadas y comercializadas tenemos los champiñones blancos, el portobello, shiitake y el huitlacoche. Se conoce que la mejor temporada para ser cultivados son la época de las lluvias.

Entre los más cultivados a nivel mundial tenemos ocho tipos de especies las cuales son: champiñones, portobellos, senderillas, girgolas, shiitake, trufas, huitlacoche.

Los hongos se encuentran clasificados según su taxonomía en cinco grupos los cuales detallamos a continuación: Basidiomycota, Chytridiomycota, Ascomycota, Zygomycota y Deuteromycota. Su reproducción es sexual de todos ellos, excepto para la especie Deuteromycota siendo de reproducción asexual produciendo conidios.

En los Chytridiomycota incluye la unión de gametos, así también los Zygomycetes su sexualidad esta representa por la fusión de los gametos produciendo las zigosporas.

2.4. CICLO SEXUAL BASIDIOMYCETES

Los hongos *lentinula edodes* pertenecen al grupo basidiomycetes, siendo su reproducción sexual. Donde los basidios tienen como función la producción de las esporas sexuales (basidioesporas), en un proceso normal de reproducción las basidioesporas se reproducen formando micelios haploides uninucleados también denominados micelio primario, después de cierto tiempo se origina la plasmogamia, dando origen este evento a un micelio dicariótico también llamado micelio secundario, y es donde se parte para obtener el cuerpo fructífero o basidioma, formando un conjunto de hileras compuestas por los basidios dando lugar al himenio.

Las células de los microorganismos al inicio son dicarióticos, enseguida estos tienden a fusionarse los dos núcleos celulares conocida este proceso como Cariogamia, enseguida tendremos un solo núcleo diploide.

Los basidiomycetes son células haploides (n) que al desarrollarse liberan un micelio haploide (n), este tiene que ser compatible para poder germinar y origina un micelio dicariótico ($n+n$). (véase Figura 2). En esta nueva célula el núcleo se convierte en carga genética diploide ($2n$), mediante el proceso de cariograma.

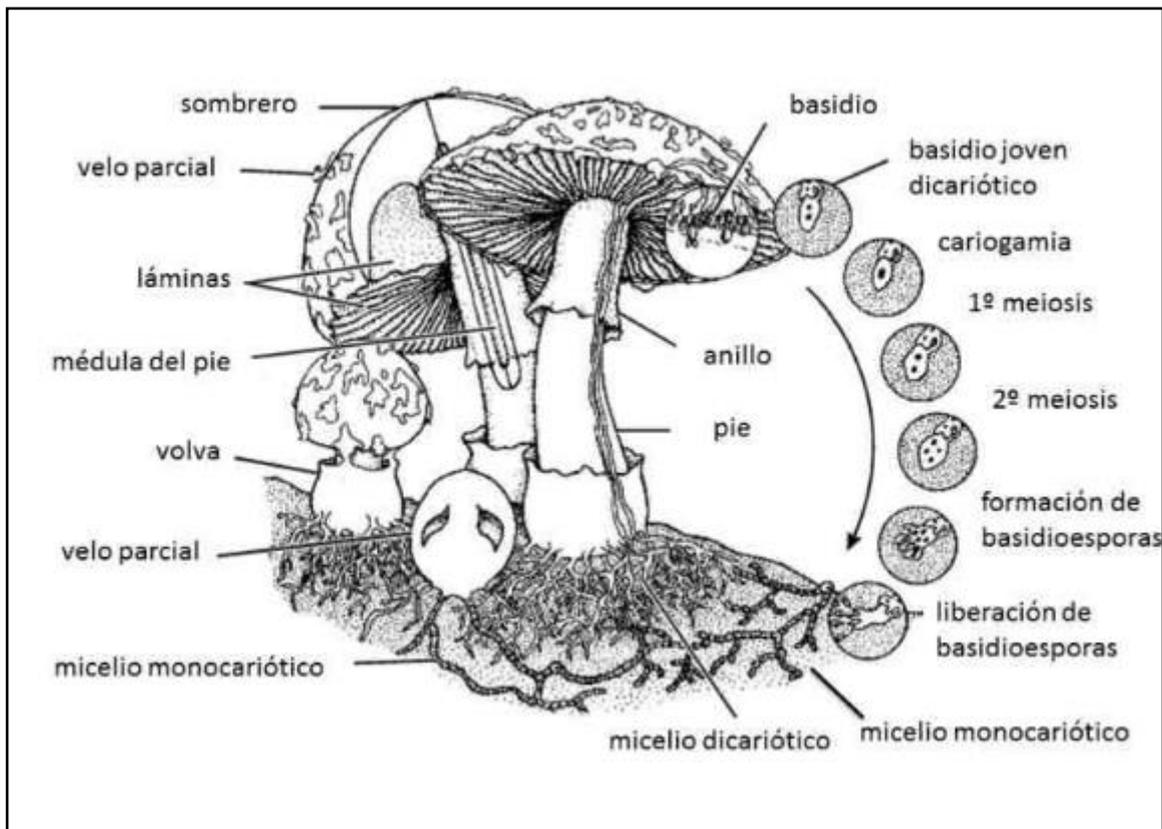


Figura 2. Ciclo sexual Basidiomycetes

2.5. IMPORTANCIA DE LOS HONGOS

Los macromicetos son fundamentalmente considerados como alimento nutracéutico para el ser humano por sus propiedades nutritivas, el valor en carbohidratos y grasas es bajo y se mantiene, así también su valor en proteínas. Por sus propiedades organolépticas excepcionales pasa a formar parte fundamental en la preparación de los alimentos. En la medicina están también considerados de vital importancia debido a su composición en la obtención de biomoléculas que tienen diferentes propiedades medicinales favorables para el buen funcionamiento del cuerpo humano.

Los hongos aportan un papel fundamental en la calidad del medio ambiente, contribuyendo con la eliminación de la materia orgánica producida por cierto material vegetal en descomposición de la misma naturaleza, especialmente los residuos agroindustriales que es eliminado al ambiente de las empresas alimenticias en la mayoría de los casos son incinerados, arrojados a los basureros, esteros, donde el principal desecho es la lignita material orgánico de

difícil descomposición. Según el autor (Pazmiño, 2013)

Se considera a la lignita como uno de los compuestos más complejos según su composición y heterogeneidad, de acuerdo a esta clasificación no es posible determinar una regla definida para su estado.

El uso excesivo de pesticidas en la agricultura para el control de insectos y enfermedades tiene efectos nocivos sobre el suelo, el agua, el medio ambiente y la salud humana, por este motivo es necesario desarrollar programas de control biológico mediante la utilización de microorganismos como hongos, bacterias y virus. (Rodríguez Valencia et al., 2005)

2.6. MORFOLOGÍA DEL HONGO *LENTINULA EDODES*

Los hongos macromicetos forman setas con dos únicas clases son: Basidiomycetes. De acuerdo a su estructura el shiitake se encuentra constituido por las siguientes partes que a continuación detallamos:

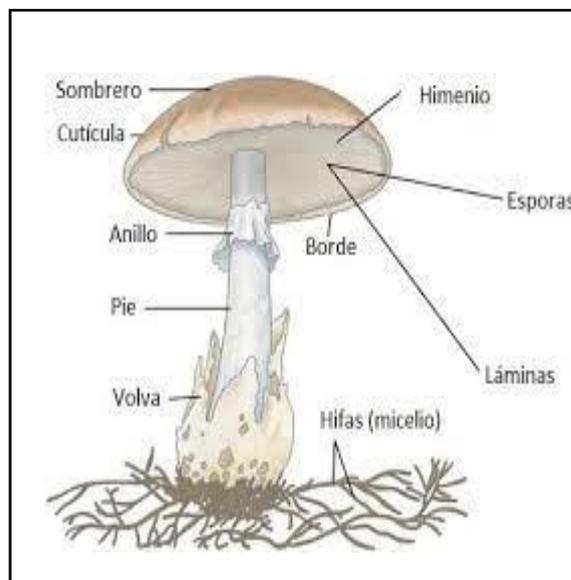


Figura 3. Partes del hongo.

2.6.1. Sombrero (píleo)

Los macrohongos constan de cubierta en la parte superior siendo su parte principal del hongo donde se lleva la reproducción sexual de la especie, tiene un diámetro que oscila entre 5 y 15 cm consta de una serie de laminillas las que contienen las esporas sustancia reproductora, es de forma convexa durante la mayor parte de su desarrollo, tiende a aplanarse o a comprimirse al llegar a la mayor etapa de su maduración. Su cutícula presenta una coloración distinta que va desde pardo a café oscuro. De acuerdo a las investigaciones según (Kuhar et al.,2013) se hallaron diferentes clases de píleos: cónicos, convexos, planos o campanulados.

2.6.2. Himenio

Es una membrana que se encuentra en la parte inferior del sombrero compuesta por un grupo de hileras que llevan en su interior las esporas microscópicas, reproductoras de la especie.

2.6.3. Anillo

Está formado por una película en forma de velo que cubre el sombrero en su etapa de formación luego este se fracciona y cae en forma de velo.

2.6.4. Pie

Es la parte que da firmeza y sirve de soporte al píleo, está formado por una serie de filamentos microscópicos que llevan en su interior el material principal de nutrición.

2.6.5. Volva

Es una capa fina que rodea la parte inicial del cuerpo fructífero del hongo, este crece desde su origen para su protección, a medida que crece este se rompe y se aloja en diferentes partes del hongo en diversas formas en el sombrero queda en forma de verrugas, debajo de sombrero sobre el pie se forma como un anillo sobre el pie y al finalizar este se forma como una capa de protección como una volva.

2.6.6. Micelio

Es el cuerpo del hongo, también conocido como micelio. El mismo que se encuentra formado por un grupo amplio de filamentos microscópicos llamados hifas.

2.7. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL HONGO

Shiitake es considerado un excelente constituyente en el área farmacológica, por el contenido de sus biomoléculas donde se ha resaltado en los polisacáridos, siendo utilizados en la parte farmacológica para la obtención de ciertos medicamentos para tratar enfermedades del ser humano, especialmente enfermedades crónicas como el cáncer. *Lentinula edodes* es uno de los hongos comestibles más populares en todo el mundo y contiene importantes componentes medicinales como lentinan, ergosterol y eritadenina, según el autor (Kim et al., 2020).

El shiitake en la formación de su pared celular se encuentra constituido por glucanos, quitina y proteínas. Sus componentes como polisacáridos; β -glucanos como el Lentinan, determina al shiitake como un elemento importante por sus propiedades medicinales, nutricionales y funcionales.

Lentinula edodes considerado un componente eficaz en la medicina, por poseer las moléculas bioactivas que mantiene sus propiedades para la regeneración de la salud del ser humano. Demostrando mediante los estudios realizados a los componentes en su composición, están formados por los siguientes elementos:

Estudios clínicos recientes han demostrado que la quimioinmunoterapia con lentinan prolonga la supervivencia de los pacientes con cáncer gástrico avanzado, en comparación con la quimioterapia sola. Según (Ina, K. 2012)

De acuerdo a las investigaciones realizadas se ha constatado que los hongos poseen actividad antibacteriana, en base a su composición de moléculas que forman sus cuerpos fructíferos y mantienen diferentes pesos moleculares.

Además de los carbohidratos, los hongos medicinales consisten en otra clase de compuestos terapéuticos derivados del metabolismo secundario. Estos

constituyentes como los fenoles y flavonoides se sintetizan para protección, contra insectos, virus y bacterias; como resultado muchos de ellos son ideales para inhibir el crecimiento microbiano. De acuerdo a ,(Khatua et al., 2019)

2.7.1. Propiedades antioxidantes

Según estudios realizados por (Ramírez Anguiano, 2009) La mayoría de los hongos que más comúnmente se consumen como *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Boletus edulis* y *Lentinula edodes* siempre están clasificados dentro de los hongos con propiedades antioxidantes más elevadas en comparación con otras especies menos comunes.

El bioactivo ergosterol que actúa como antioxidante se encuentra en mayor proporción en los hongos que en otros alimentos como: el hígado, legumbres, yema de huevo, truchas, etc. *Lentinula edodes* es uno de los hongos que presenta uno de los valores más altos de contenido de este bioelemento, con un valor de (1.98-2.09 mg/g ps)

2.7.2. Propiedad antimicrobiana

Es una propiedad muy importante donde la mayoría de los bioactivos que se encuentran en la composición del *Lentinula edodes* actúan como antibacterianos y fungicidas. Los extractos aislados del *Lentinula edodes* se hayan conectados a ciertas bacterias como *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Lactobacillus* y *Porphyromonas*.

2.8. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL

Lentinula edodes se caracteriza por ser un nutrimento con excelentes propiedades, contiene mayor cantidad de proteínas, gran cantidad de aminoácidos y fibra dietética. En los hongos se encuentran moléculas medicinales compuestas por polisacáridos, terpenoides, esteroides y lípidos, estos participan en el mecanismo del cuerpo humano, así como en la estabilidad del sistema inmunológico. Mediante experimentos realizados se ha extraído biomoléculas de su composición, los cuales son utilizados como material farmacológico por sus propiedades medicinales que posee, así también son utilizados en la parte industrial como adsorbentes de metales pesados en efluentes industriales.

Los macromicetos de shiitake son fuente indispensable como complemento de los alimentos para todas las personas, en su composición presentan un alto contenido en proteína, fibra dietética, vitaminas especialmente la B y la C, también es rico en minerales como: K, Na, P, Zn y Mg. Tiene un alto porcentaje de agua en un 80 % a 90 % de su contenido, y de fibra contiene de 8% a 10%, bajo en grasa total, mantiene una alta proporción de 72% a 85% de ácidos grasos poliinsaturados de acuerdo al contenido total de grasas.

2.9. COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los requisitos nutricionales como: carbono, nitrógeno, minerales y oligoelementos y vitaminas) y los parámetros ambientales (temperatura, humedad, oxígeno-aire, luz y valor de pH) son consideraciones importantes en cultivo de shiitake.

En la mayor parte de hongos medicinales, en su producción de biomasa las fuentes de carbono más utilizadas son glucosa, maltosa, galactosa y lactosa.

Mediante ensayos realizados en laboratorio, se ha demostrado los principales componentes necesarios para llevar a cabo un cultivo entre ellos tenemos:

2.9.1. Carbono

El compuesto de carbono proporciona energía para el hongo, además de proporcionar los átomos de carbono que constituyen el esqueleto de las moléculas orgánicas que forman las células. Estas moléculas orgánicas incluyen los lípidos de las membranas, los polisacáridos de las paredes celulares, los ácidos nucleicos y las proteínas.(Chang & Miles, 2004)

2.9.2. Nitrógeno

Forma parte de los aminoácidos que componen las proteínas, purinas, pirimidinas y algunas vitaminas; el nitrógeno se encuentra formando parte del polisacárido quitina, que es un componente de la pared celular de muchos hongos. El nitrógeno es adaptado a los medios para ser empleado en diferentes formas, es así que se adapta de acuerdo a las características del medio como: Ciertas especies pueden crecer bien con nitrato como fuente de nitrógeno; otras

especies no pueden utilizar nitrato, pero el ion amonio sirve como fuente de nitrógeno. Luego, hay otras especies que no pueden utilizar ni el nitrato ni el ion amonio y requieren un compuesto orgánico que contenga nitrógeno. En algunas especies, el requerimiento de nitrógeno orgánico es para un aminoácido específico.(Chang & Miles, 2004)

Siendo factible utilizar para su producción de cultivo de hongos cualquiera de los siguientes componentes que contienen nitrógeno: nitrato, ion amonio, así también los compuestos orgánicos nitrogenados.

Los hongos también requieren elementos principales distintos del carbono y el nitrógeno. Por ejemplo, el azufre, el fósforo, el potasio y el magnesio cumplen las mismas funciones generales que en las plantas superiores, y estos elementos se suministran comúnmente en los medios como sales (por ejemplo, sulfato de magnesio y fosfato de potasio). Igualmente, importante, aunque solo se requieren en cantidades mínimas, son los denominados elementos menores. Incluidas en una solución de oligoelementos que está presente en varios medios están las sales que contienen los elementos calcio, cobre, hierro, manganeso, molibdeno y zinc.(Chang & Miles, 2004)

2.10. Técnicas de cultivo

El proceso de obtención de los cuerpos fructíferos es sencillo, empleando sustratos económicos y de fácil adquisición. Los métodos de obtención se clasifican en tradicional y el cultivo con bloques sintéticos, al realizar el cultivo con aserrín, normalmente representa el 80% de la cantidad total de medios de cultivo (Pire D, Wright & Alberto E,2001). Siendo el cultivo tradicional, un método que requiere de tiempo para dar resultados en la obtención de sus bioactivos, es decir necesitamos de ciertas etapas de tiempo en días para su producción y sus procesos de purificación no son sencillos.

De acuerdo a (Chang & Miele, 2004), se debe realizar un enfoque lógico y sistemático que involucre datos de observación y experimentales, y su evaluación científica, para las diversas fases del cultivo de hongos.

Lentinula edodes es un hongo que es utilizado como alimento, a su vez por sus propiedades medicinales ha sido estudiado para obtener de este macromiceto

componentes medicinales, pero su cultivo tarda mucho tiempo con respecto a otros hongos de su especie, debido a este inconveniente se ha realizado métodos de estudios para una mejor producción de cultivo, así nace varias estrategias de cultivo estudiadas. En donde mencionaremos las características de varias técnicas de cultivo.

2.10.1. Cultivo Tradicional.

Esta clase de técnica involucra la utilización de un medio orgánico, para la obtención del cuerpo fructífero a partir del cuerpo original, se debe evaluar una mínima cantidad de variables a calcular donde se considera el crecimiento micelial.

Esta técnica consiste en hacer reaccionar el micelio obtenido se coloca sobre los troncos de material vegetal u otros sustratos. Cuando ya han colonizado estos sustratos se traspasan a madera o a bolsas con aserrín, donde se conserva la humedad alta necesaria para el desarrollo del micelio y la desintegración del sustrato. De acuerdo al shiitake puede ser cultivado en fundas plásticas con contenido vegetal como el aserrín y otros desechos agroindustriales. Considerando que el método de cultivo tradicional contiene varias desventajas de acuerdo al nivel industrial y económico, en relación a la explotación del cuerpo fructífero para la obtención de compuestos bioactivos. Podemos anotar como las desventajas de este método el extenso periodo de tiempo de obtención del crecimiento, elevados precios en el método de purificación, además la discontinuidad en la calidad del producto final. En esta técnica se dificulta el control de ciertas variables como pH, el oxígeno y concentración del sustrato.

Este proceso de obtención presenta varias desventajas, ocasionando el estudio de otros métodos biotecnológicos como son: fermentación por estado líquido (FEL) y fermentación por estado sólido (FES).

2.10.2. Fermentación por Estado Sólido

En este tipo de técnica empleadas en los macromicetos se elimina en su totalidad el estado líquido durante el proceso, este método se realiza en un medio sólido como son: el salvado, bagazo, pulpa de papel. El proceso del cultivo de hongos en fermentación en medio sólido convierte a los residuos lignocelulósicos en

soporte o alimento para la generación de productos con alto valor agregado. Además de generar compuestos bioactivos (por ejemplo, enzimas, polisacáridos, vitaminas), por lo cual se considera una actividad rentable (Ríos et al.,2017)

El sustrato utilizado en el proceso de FSS, contiene la suficiente cantidad de líquido para mantener la humedad necesaria para el crecimiento y desarrollo de las biomoléculas.

Factores que afectan el proceso de fermentación en estado sólido son: tratamiento del sustrato, tamaño de la partícula, contenido de humedad, actividad del agua del sustrato, temperatura del cuerpo de fermentación, tasa de consumo de oxígeno, tasa de evolución del dióxido de carbono.

2.10.3. Fermentación por Estado Líquido

Las fermentaciones líquidas de *L. edodes* se han utilizado para fines diversos como son el estudio de la morfología del hongo en la fermentación, la formación de pellets, la producción de exoproteínas, la determinación de las bioacciones del producto biotecnológico, de acuerdo a las investigaciones realizadas por: (Suárez Arango & Nieto, 2013)

Como se conoce las propiedades biológicas características de este macromiceto como son: antioxidante, antimicrobiana, contra fitopatógenos, perfeccionamiento de vitaminas B12, el avance en métodos en la producción elevada de bioactivos tal es el caso de los polisacáridos.

Es el método más sencillo, para obtener bioactivos, durante este método se mantiene la densidad de líquido (agua) y de sólido, siendo estos los alimentos que servirán para desarrollo del macromiceto, este método es el más utilizado a nivel industrial por ser económico, poder controlar el mayor número de variables durante el proceso con respecto a la FES, la obtención del producto final es más fácil de recuperar. En este tipo de cultivo el microorganismo se desarrolla flotando en el medio de cultivo, cuando se trabaja con hongos miceliales, estos están propensos a constituir esferas de micelios de tamaño pequeño, denominada “pellets” esto es cuando se mantienen con agitación, caso contrario crecen en la superficie. Durante este proceso de FEL, el microorganismo se

presenta de una forma típica, se presenta o comprende varias fases como son: fase de latencia, entre otras.

Se conoce, un tercer método para obtener un cultivo puro es un cultivo de tejidos de un cuerpo fructífero. Se puede usar cualquier porción de un cuerpo de fructificación joven para establecer un cultivo de tejido, pero es preferible tomar tejido de la parte superior del estípite, ya que esta área es una región de rápido alargamiento celular. Los cuerpos fructíferos en una etapa anterior a la formación de esporas están compuestos por células somáticas de idéntica estructura genética; por lo tanto, no habrá variación genética debido a la segregación en los cultivos de tejidos obtenidos de estos cuerpos fructíferos. Si se toma tejido de una cepa de hongos o de una cepa de alto rendimiento, el cultivo puro derivado de este será confiable y estable en rendimiento. (Chang & Miles, 2004)

Principales fases de cultivo de hongos son:

- (1) Establecimiento de un cultivo fructífero,
- (2) Preparación del desove,
- (3) Preparación del compost,
- (4) Desarrollo del micelio y
- (5) Fructificación. (Chang & Mieleles)

Entre los macromicetos sometidos a estudios por fermentación por estado líquido tenemos los siguientes:

- *Agaricus*
- *Flammulina*
- *Grifola*
- *Pleurotus*
- *Lentinula*

Podemos establecer de acuerdo a los estudios realizados que la producción de bioactivos desarrollados por estos macromicetos empleando el método de FEL, dependerá en parte de su composición de la cepa, del hongo y del metabolito, y en especial de las condiciones óptimas de cultivo.

2.11. Selección del microorganismo

Es de vital importancia la selección de la cepa a ser tratada, al ser tratada directamente en su composición original, de esto dependerá el rendimiento de su función.

2.12. Selección del sustrato

El sustrato debe ser analizado desde su contenido en la calidad de sus propiedades químicas en su contenido de polisacáridos como lignina, celulosa y hemicelulosa, el objetivo del sustrato además de suministrar nutrientes a la cepa, además sirve como anclaje para las células.

Tamaño de la partícula del sustrato. – es esencial la selección del tamaño de las partículas mientras es más pequeña tiene mayor área de acceso al ataque microbiano, siendo un factor aceptable.

2.13. Compuestos bioactivos del shiitake

De *L. edodes* se obtienen distintos metabolitos con actividad biológica, los cuales son cada vez más aceptados. (López-Peña et al., 2013)

Se encuentra una variedad de compuestos bioactivos en el estudio de los metabolitos fúngicos, por la presencia de compuestos como polisacáridos, triterpenos, flavonoides, esteroides y ácidos grasos entre otros (Chegwin C, Nieto I, 2004). Recientes estudios han determinado que los polisacáridos del shiitake logran inhibir la oncogénesis, debido a su actividad antitumoral directa hacia diferentes tumores.

Detallamos en el siguiente cuadro, algunos de los derivados de los metabolitos analizados, su componente químico al que pertenece su utilidad, su acción que ejercen en los organismos de las personas.

Cuadro 2. Compuestos activos del Shiitake.

COMPUESTO	GRUPO FUNCIONAL	BIOACCIÓN
Eritadenina	Derivado aciclico de la adenosina	Hipolipidémico, reduce los niveles de colesterol en la sangre por excreción
Lentinan	Polisacárido	Antibacterial, Antiviral, Inmunoactivo
Emitanina	Polisacárido	Inmunoactivo
Quitina	Ácidos Nucleicos	Antiviral
Ergosterol	Triterpeno	Provitamina D-2

Fuente: Rivera ,2017

2.13.1. Eritadenina

Metabolito aislado por primera vez del hongo *Lentinula edodes* en el año 1969 por Chibata, y en 1970 por Rokujo, fueron ellos quienes propusieron su denominación de origen como lentinacin y lentysine. Entre sus propiedades posee actividad antiviral y capacidad reductora del colesterol.

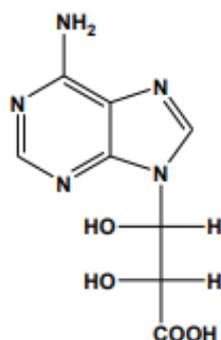


Figura 4. Eritadenina

Uno de los metabolitos más importantes del Shiitake es la eritadenina, la cual disminuye la concentración del colesterol en el cuerpo al modificar el procesamiento hepático de los lípidos. (Arce-Torres et al., 2020)

2.13.2. Lentinan

El Lentinan es un constituyente de la pared celular y se extrae tanto del micelio

como de los cuerpos reproductores(Rodríguez Valencia et al., 2005)

El lentinan es un polisacárido aislado de *L.edodes* que se caracteriza por su actividad antitumoral debido a que posiblemente activa una respuesta inmune en el huésped, por lo cual ya se utiliza en el tratamiento de diferentes enfermedades cancerígenas(Arce-Torres et al., 2020)

Entre las propiedades del lentinan tenemos que es un polisacárido β -(1-3) β -(1-6)-D glucano con una distribución de triple hélice que contiene moléculas de glucosa con enlaces β -(1-3) en la parte central y enlaces β -(1-6) que presentan glucosa en las cadenas laterales. El modelo de las moléculas de glucosa en estructura de hélice es estudiado y ratificado, y se lo considera como muy importante para la actividad biológica.(Campuzano et al., 2020)

En el interior de la fibra de los shiitake se encuentran los compuestos bioactivos β -glucanos, son los encargados de estimular la respuesta inmune, presentan la propiedad de hipoglucémicos, antioxidantes y anticancerígenos. Poseen beneficios medicinales como: incrementan la producción de insulina, participan en la disminución del colesterol LDL.

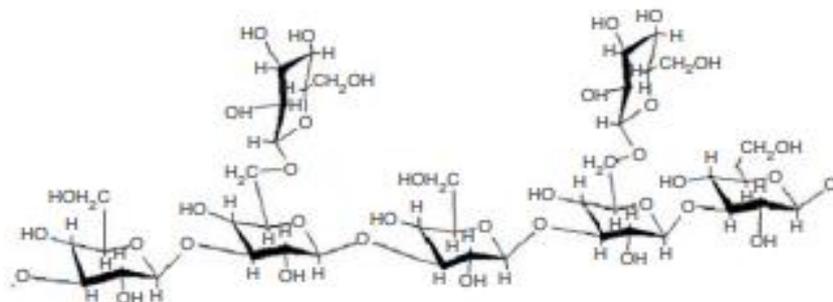


Figura 5. Estructura básica del Lentinan

2.13.3. Ergosterol

El shiitake dentro de su estructura tanto en el estípite y el píleo, contienen en su interior ergosterol, el mismo que es el pionero de la vitamina D.

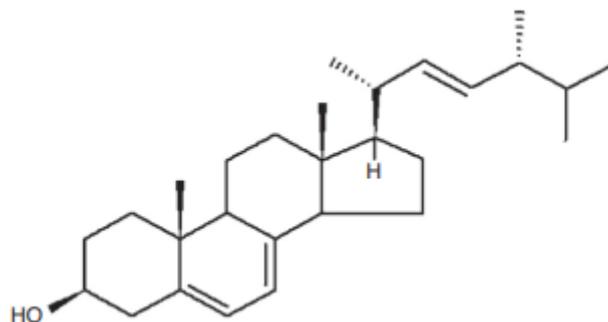


Figura 6. Estructura del Ergosterol

El ergosterol es también el compuesto precursor de la vitamina D2 (ergocalciferol) porque cuando se produce la exposición de los hongos a la luz, los rayos UV producen la fotólisis de este compuesto dando lugar a una amplia variedad de productos de fotoirradiación y principalmente a la provitamina D2, taquisterol y lumisterol, (Ramírez Anguiano, 2009)

2.13.4. Quitina y Quitosano

La parte del hongo fructífero que es el estípite, ya deshidratado, después de pasar su proceso de secado y molido, los estípites de los hongos *Lentinula edodes* son reconocidos como un preciado ingrediente rico en quitina fúngica.

El 80% de la fibra en el *Lentinula edodes* consiste en la quitina, se ha evidenciado que reduce el nivel de colesterol en el plasma sanguíneo en seres humanos (Sanabria Hinojoza 2018), citado por (Paucar López Lissette Cristina, 2021)

Estudios realizados indicaron que el quitosano producido por el estípite del *Lentinula edodes* mantiene propiedades antioxidantes, el quitosano extraído de la quitina también tiene su utilidad como fuente de antioxidantes, así es que puede ser utilizado como ingrediente o suplemento alimenticio en la industria.

2.13.5. Polisacáridos

Actualmente, los polisacáridos fúngicos son centro de atención para muchos investigadores por su composición especial en carbohidratos y sus estructuras, ya que éstas aparentemente les confieren importantes propiedades biológicas

como agentes antitumorales e inmunomoduladores.(Ramírez Anguiano, 2009)

Por otra parte, el contenido de polisacáridos, glucanos y fenoles de este hongo han sido estudiados encontrando propiedades antioxidantes debido a la estructura de anillos aromáticos de estos compuestos(Arce-Torres et al., 2020)

2.14. Condiciones óptimas para cultivar exopolisacáridos.

En la producción de biomasa de hongos medicinales entre el que se encuentra *Lentinula edodes*, se considera los elementos necesarios como son las fuentes de carbono, entre las más empleadas tenemos: glucosa, maltosa, galactosa y lactosa.

Las condiciones necesarias para llevar un cultivo de exopolisacáridos, se basan en varios parámetros los cuales se debe considerar:

- Cepa seleccionada
- Medio de cultivo
- Temperatura
- Tiempo de secado
- Tiempo de agitación
- Tiempo de incubación

2.15. Selección de la cepa

Siendo el hongo *Lentinula edodes* uno de los alimentos más consumidos a nivel mundial, resaltando sus propiedades nutritivas y medicinales, su procedencia asiática ha ocasionado la demanda del macromiceto lo que conlleva a la elevación de los precios para su exportación influyendo el costo en la obtención del producto en otros países. Debido a esta situación se procede a realizar estudios sobre su cultivo en varios países del mundo, se ha llevado a cabo la obtención del shiitake por varios métodos, uno de ellos ha sido realizar el cultivo partiendo de su cuerpo fructífero del mismo hongo, receptando las cepas para su cultivo, de esta manera disminuyen los costos del producto ya que se lo produce a nivel local.

Para el cultivador utilizar cepas nativas aclimatadas a condiciones del lugar donde se encuentran hace que los productores gocen de esa ventaja , lo que produce que se obtenga setas en menor tiempo, al contrario si tienen que exportarlas.

La cepa tiene un papel fundamental en la producción de la biomasa y exopolisacáridos. Las cepas para su estudio deben de considerar varias características en sus propiedades para mantenerlas y no perjudicar el proceso de obtención, entre las características a estudiar tenemos :

- Estado de maduración
- Tamaño
- Contaminación
- Nutrientes
- Medios de cultivo

El tipo de crecimiento filamentosos o algodonoso indica cualitativamente la producción de biomasa de las cepas, sin embargo, para determinar cuantitativamente dicha producción(Suárez, 2011)

2.16. MEDIOS DE CULTIVOS

Los medios de cultivos dan la característica de crecimiento micelial en los hongos , así también depende de las propiedades de las cepas empleadas , la velocidad de crecimiento se determina en los días de cultivo que permanece la cepa en reposo, observando de acuerdo a los medios de cultivos empleados.

Un buen desarrollo de la producción de biomasa y exopolisacáridos depende en gran parte de los medios de cultivos utilizados, y de la calidad de los nutrientes utilizados en su composición.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

- Matraz Erlenmeyer 250 ml, 100ml
- Pipetas graduadas 2ml, 5ml, 10ml
- Vaso de precipitación 50ml, 100ml, 250ml
- Probetas de 25ml, 50ml, 100ml, 1000ml
- Papel filtro marca Whatman # 1
- Indicador Universal pH
- Agitadores de vidrio
- Balón aforado
- Placas Petri
- Fiolas
- Buretas
- Embudos
- Pissetas
- Pinzas
- Guantes

3.1.2. Reactivos

- Hidróxido de Sodio 1N
- Ácido clorhídrico 1N
- Agua destilada
- Alcohol etílico

- Agar extracto de Malta
- Agar Papa Dextrosa

3.1.3. Equipos

- Balanza analítica (Mettler Toledo)
- Horno

3.2 CEPAS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

3.2.1 CEPA

Se trabaja con dos cepas comerciales de *Lentinula Edodes* denominadas: XX12 y XY01, proveniente del cepario Fungi Andino, sumergida en caldo de cultivo de Agar Papa Dextrosa (PDA) a una temperatura aproximada de 23 °C

3.2.2. Inoculación de la Cepa

Para el aislamiento de la cepa se utilizó PDA (Agar Papa Dextrosa), es necesario una temperatura de aproximadamente 20°C a 24°C, en un ambiente de incubación de completa oscuridad.

3.2.3. Conservación de la cepa y precultivo

La cepa de *Lentinula Edodes* fue mantenida en reposo en agar papa dextrosa (PDA), incubada a temperatura de 23 grados centígrados, durante 14 días y se mantiene guardada a 10 grados centígrados. Durante su producción se empleó la cepa de *Lentinula edodes* de 5mm.

El medio de cultivo se preparó utilizando: extracto de Malta (Titan Biotech Ltd.); (Agar Papa Dextrosa) (Becton, Dickinson and Company) , con pH 5,0 +/- 0.1.

3.3. Preparación del medio de cultivo

Se incubaron fiolas de 500 ml, conservando un volumen de 250 ml (volumen de conservación de la cepa). Los medios a estimar fueron: Extracto de Malta y Agar Papa Dextrosa.

El medio de cultivo se preparó con extracto de malta y Agar Papa Dextrosa se mezcla en 1 L de agua destilada, utilizando un matraz Erlenmeyer de 2000 ml, previamente el matraz fue esterilizado a 110°C, durante 15 minutos.

3.3.1. Condiciones operativas de cultivo

Los estados operativos de cultivo para todas las pruebas de ensayo se analizaron mediante pH 5.5 se controla que la agitación sea constante cada hora, temperatura de 25 a 30°C por 24 horas, evaluando cada muestra a diferente pH: 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5.

Se conserva la cepa con el medio de cultivo por 24 horas, con agitación de cinco minutos cada hora.

3.4. Producción de biomasa

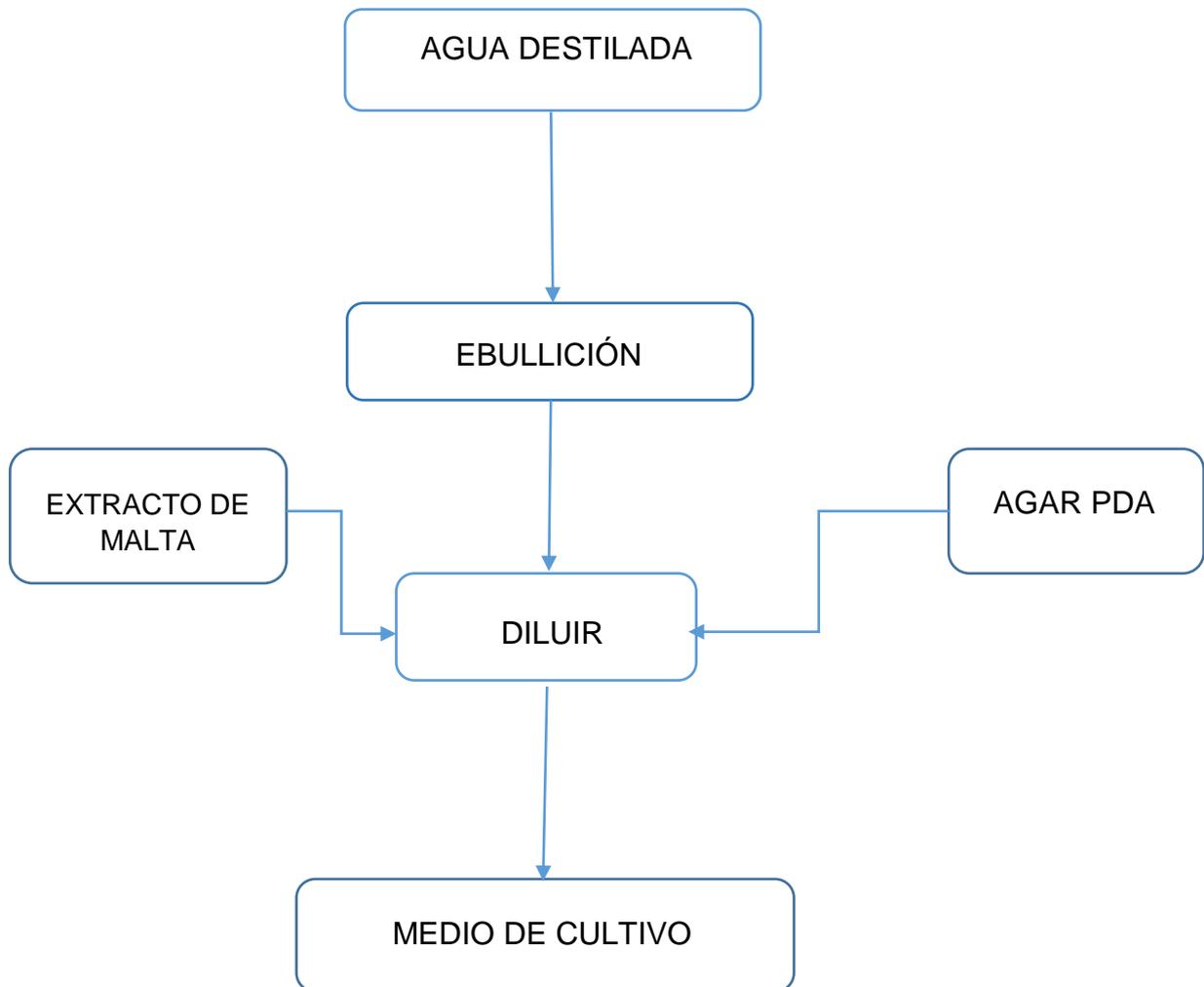
El estudio de la biomasa, se determinó por el procedimiento de peso seco. La cepa es retirada del disco Petri por medio de un asa de 5mm la cual es introducida hasta el fondo del disco para recoger la muestra se traspasa al matraz con contenido de medio de cultivo, se procede a valorar cada muestra a un pH determinado, se deja reposar por 24 horas con agitación de 5 minutos cada hora.

La biomasa total obtenida producto del filtrado por medio del papel filtro marca whatman # 1, que se obtuvo de cada matraz fue dirigido a un horno de secado a 70°C logrando llegar a un peso constante. (Lakzian et al. 2008).

3.5. Producción de exopolisacáridos

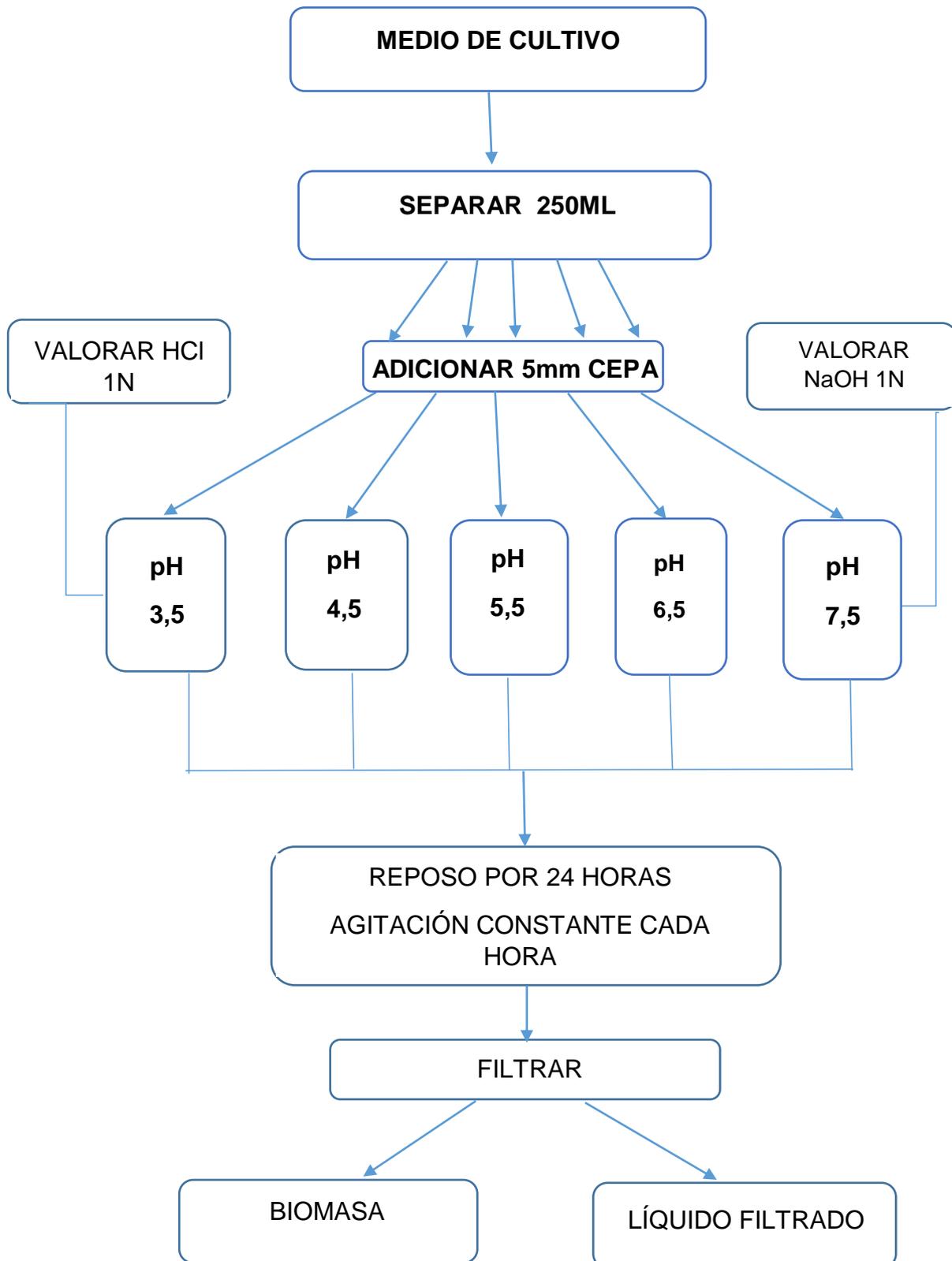
Durante el proceso de obtención de EPS, se realiza por remoción del micelio por filtrado, se adiciona 15 ml de alcohol etílico para precipitar los exopolisacáridos, se procede a valorar con solución de HCl 1N y NaOH 1N, hasta el pH determinado de estudio para su valoración, se agita por 5 minutos durante 24 horas, al finalizar el proceso se obtiene los exopolisacáridos por filtración del precipitado, luego es secado a 40°C. (Wagner et al. 2004; Rasulov et al. 2013).

3.6. Descripción de flujo gramas de las técnicas empleadas para la determinación del medio de cultivo



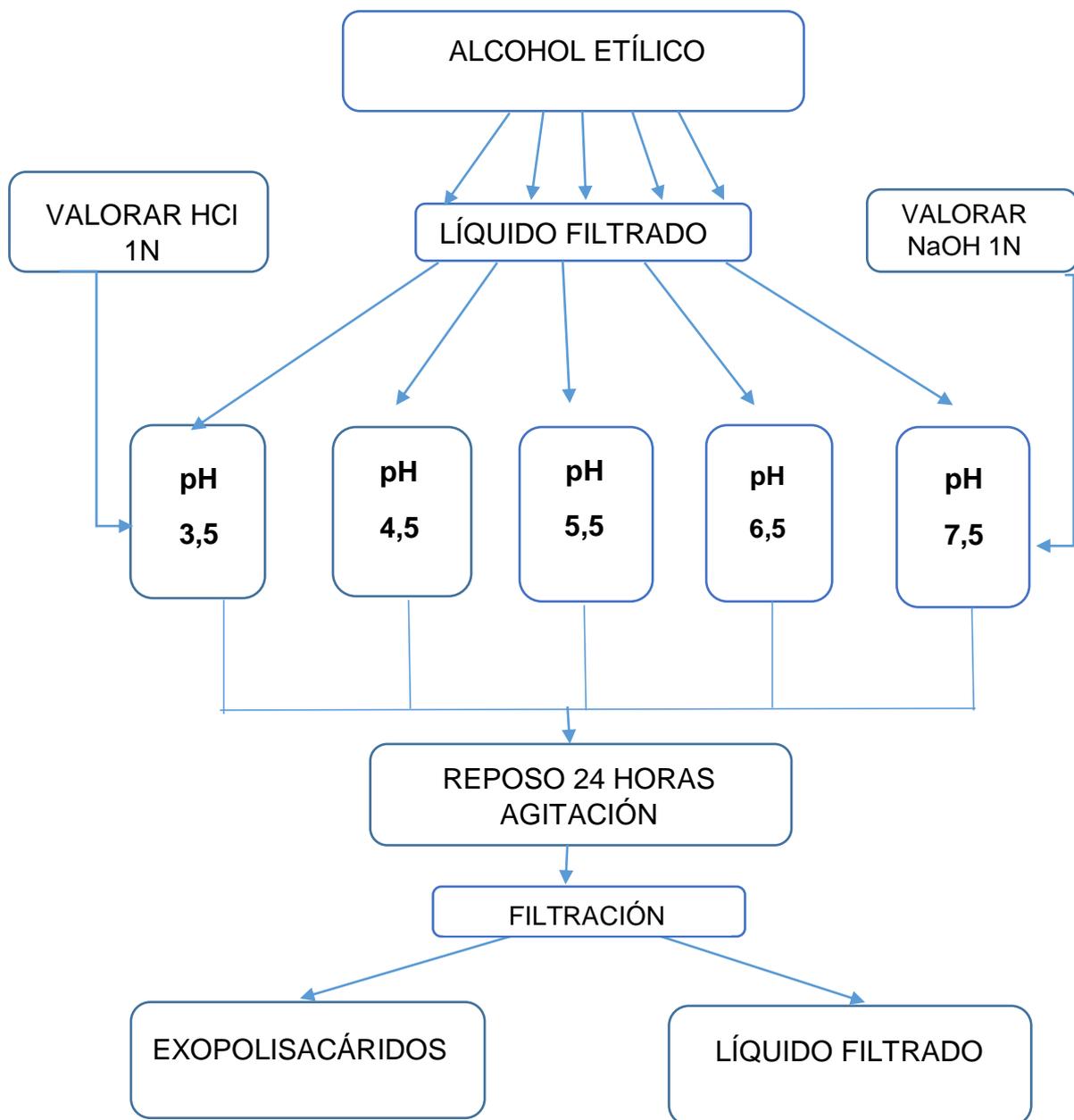
Fuente: autor

3.7. Descripción de flujo gramas en la producción de biomasa de *Lentinula edodes*.



Fuente: autor

3.8. Descripción de flujo gramas para la producción de exopolisacáridos de *Lentinula edodes*.



Fuente: autor

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación del medio de cultivo

El estudio acerca del medio de cultivo para determinar mayor crecimiento de la masa micelial, se ha revisado varios autores, determinando que el medio de cultivo donde se obtiene resultados satisfactorios del desarrollo del microorganismo es con el Agar Papa Dextrosa (PDA), obteniendo mayor cantidad de biomasa y por ende de exopolisacáridos.

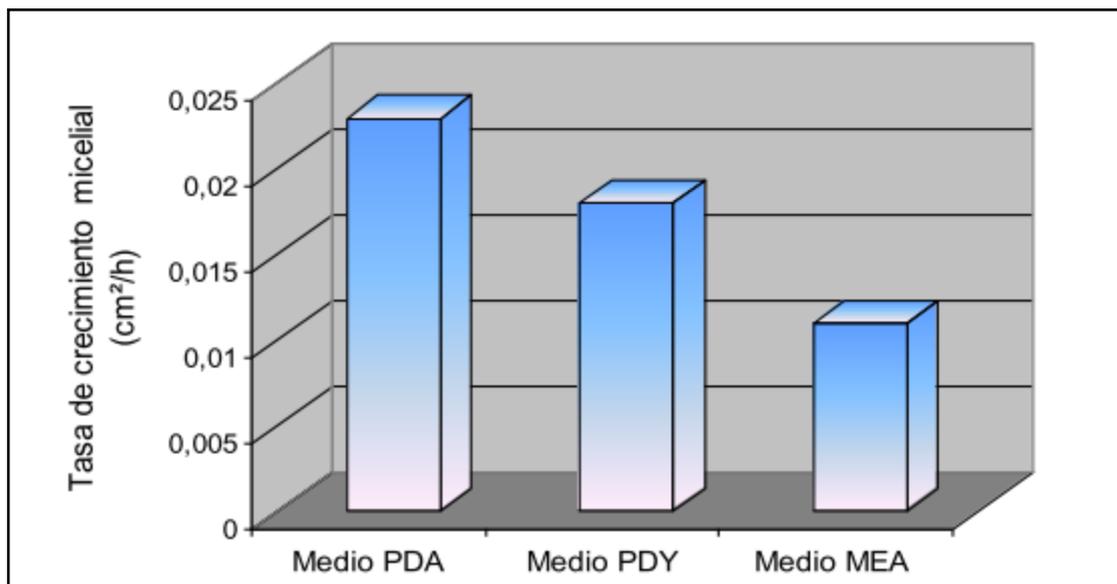


Figura 6. Tasa de crecimiento micelial Fuente: Galión,2009

Como se aprecia en la gráfica el análisis realizado con el medio de agar de PDA, es el que se obtiene mayor tasa de crecimiento micelial, mientras que los otros medios de cultivo no lo sobrepasan.

4.2. Producción de biomasa

Durante el proceso de obtención de la biomasa la cepa *Lentinula edodes*

4.2.1 Producción de biomasa con cepa *Lentinula edodes* XX12

Cuadro 3. Producción de biomasa a partir de hongos *Lentinula Edodes*, cepa XX12 evaluadas a diferentes concentraciones de pH

Especie	Muestra	pH	Biomasa
<i>Lentinula edodes</i> XX12	M1	3,5	6,96
		4,5	7,12
		5,5	14,42
		6,5	10,37
		7,5	8,74
	M2	3,5	7,01
		4,5	7,98
		5,5	14,96
		6,5	10,89
		7,5	8,97
	M3	3,5	7,58
		4,5	8,76
		5,5	15,05
		6,5	11.21
		7,5	9.38

Fuente: autor

4.2.2. Producción de biomasa con cepa *Lentinula edodes* XY01

Evaluación de la cantidad de biomasa a partir de cepa XY01, a diferentes concentraciones de pH

Cuadro 4. Producción de biomasa a partir de hongos *Lentinula Edodes*, cepa XY01 evaluadas a diferentes concentraciones de pH

Especie	Muestra	pH	Biomasa
<i>Lentinula edodes</i> XY01	M1	3,5	7,86
		4,5	8.91
		5,5	19.18
		6,5	14.26
		7,5	9.36
	M2	3,5	7.01
		4,5	8.10
		5,5	18.26
		6,5	13.96
		7,5	8.57
	M3	3,5	8.24
		4,5	9.31
		5,5	19.79
		6,5	15.37
		7,5	9.56

Fuente: autor

4.2.3. Tablas comparativas de producción de Biomasa.

Cuadro 5. Producción de biomasa XX12

Muestra	pH	Biomasa
M1	3,5	6,96
M1	4,5	7,12
M1	5,5	14,42
M1	6,5	10,37
M1	7,5	8,74
M2	3,5	7,01
M2	4,5	7,98
M2	5,5	14,96
M2	6,5	10,89
M2	7,5	8,97
M3	3,5	7,58
M3	4,5	8,76
M3	5,5	15,05
M3	6,5	11,21
M3	7,5	9,38

Fuente: autor

Cuadro 6. Producción biomasa XY01

Muestra	pH	Biomasa
M1	3,5	7,86
M1	4,5	8,91
M1	5,5	19,18
M1	6,5	14,26
M1	7,5	9,36
M2	3,5	7,01
M2	4,5	8,1
M2	5,5	18,26
M2	6,5	13,96
M2	7,5	8,57
M3	3,5	8,24
M3	4,5	9,31
M3	5,5	19,79
M3	6,5	15,37
M3	7,5	9,56

Fuente: autor

4.2.4 Gráficos comparativos en producción de biomasa de las cepas *Lentinula edodes* XX12

Cuadro 7. Valores comparativos de biomasa de la cepa XX12

ph	Biomasa M1	Biomasa M2	Biomasa M3
3,5	6,96	7,01	7,58
4,5	7,12	7,98	8,76
5,5	14,42	14,96	15,05
6,5	10,37	10,89	11,21
7,5	8,74	8,97	9,38

Fuente: autor

La figura 8, representa la cantidad de biomasa más alta obtenida de las tres corridas realizadas, y es en el tercer análisis donde se aprecia una cantidad considerada de la producción alcanzando 15,05 g en una concentración de 5.5, considerada una ligera acidez del medio lo que contribuye a un medio no propicio para la contaminación, conservándose por más tiempo.

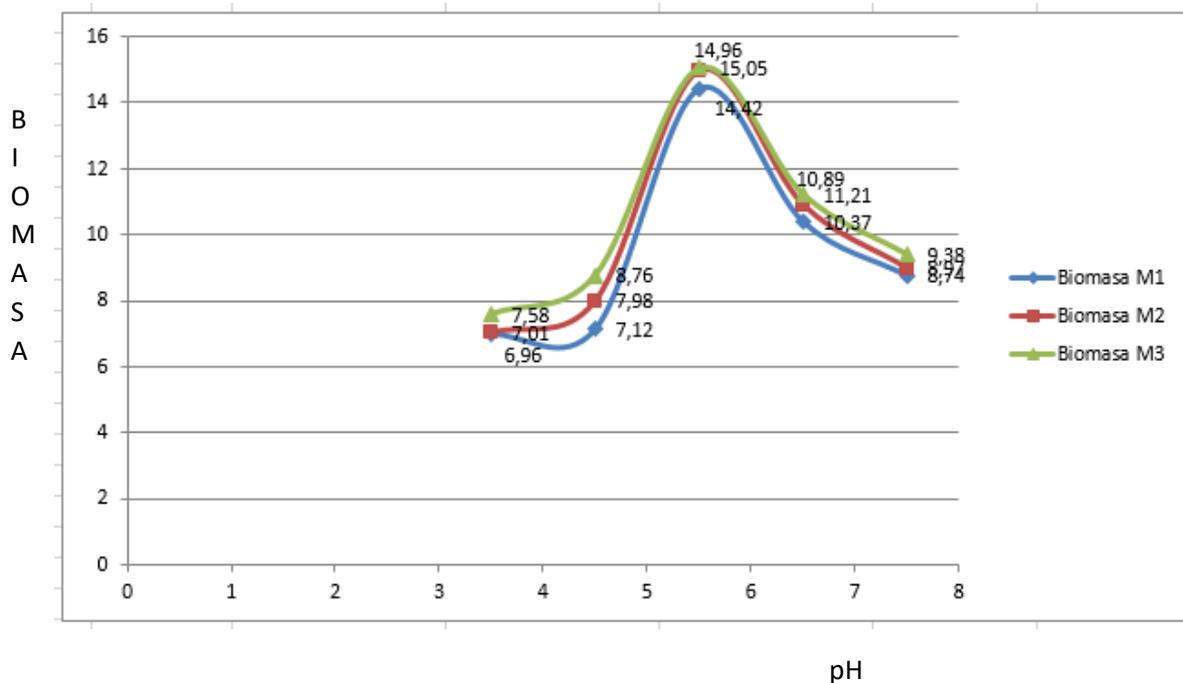


Figura 8. Producción de biomasa de cepa XX12

4.2.5 Gráficos comparativos en producción de biomasa de las cepas *Lentinula edodes* XY01

Cuadro 8. Valores comparativos de la biomasa de la cepa XY01

pH	Biomasa M1	Biomasa M2	Biomasa M3
3,5	7,86	7,01	8,24
4,5	8,91	8,1	9,31
5,5	19,18	18,26	19,79
6,5	14,26	13,96	15,37
7,5	9,36	8,57	9,56

Fuente: autor

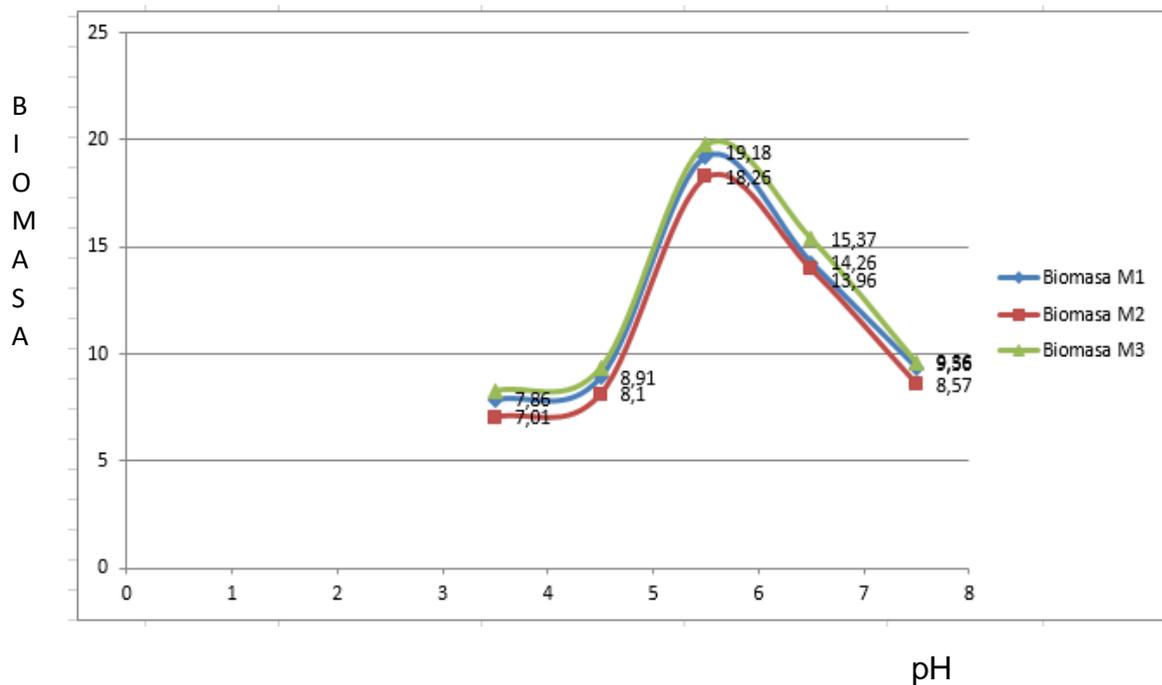


Figura 9. Gráfico de producción de biomasa de cepa XY01

4.2.6. Relación de muestras en la producción de biomasa en la cepa XX12

Pesos de biomasa XX12

Muestra	pH	Biomasa
M1	3,5	6,96
M1	4,5	7,12
M1	5,5	14,42
M1	6,5	10,37
M1	7,5	8,74
M2	3,5	7,01
M2	4,5	7,98
M2	5,5	14,96
M2	6,5	10,89
M2	7,5	8,97
M3	3,5	7,58
M3	4,5	8,76
M3	5,5	15,05
M3	6,5	11,21
M3	7,5	9,38

Fuente: autor

Cuadro 9. Diferenciación de biomásas XX12

Producción en g M2 respecto M1	Producción en g M3 respecto M1	Producción en g M3 respecto M2
0,05	0,62	0,57
0,86	1,64	0,78
0,54	0,63	0,09
0,52	0,84	0,32
0,23	0,64	0,41

Fuente: autor

4.2.7. Relación de muestras en la producción de biomasa en la cepa XY01

Pesos de biomasa XY01

Muestra	pH	Biomasa
M1	3,5	7,86
M1	4,5	8,91
M1	5,5	19,18
M1	6,5	14,26
M1	7,5	9,36
M2	3,5	7,01
M2	4,5	8,1
M2	5,5	18,26
M2	6,5	13,96
M2	7,5	8,57
M3	3,5	8,24
M3	4,5	9,31
M3	5,5	19,79
M3	6,5	15,37
M3	7,5	9,56

Fuente: autor

En relación a los valores obtenidos en la producción se comprueba según la relación de pesos que la muestra M 3, se obtiene mayor cantidad de biomasa de 1,53 g, a una concentración de pH 5.5

Cuadro 10. Diferenciación de biomasa XY01

Producción en g M2 respecto M1	Producción en g M3 respecto M1	Producción en g M3 respecto M2
0,85	0,38	1,23
0,81	0,40	1,21
0,92	0,61	1,53
0,30	1,11	1,41
0,79	0,20	0,99

Fuente: autor

4.2.8. Relación de valores en la producción de biomasa en la cepa XY01

La relación expresada en el cuadro 10, queda comprobada con la obtención de sus pesos en la muestra 3, con concentración de 5,5. Donde se obtiene una biomasa de 19,79 de peso mayoritario en relación a las otras nuestras obtenidas.

Cuadro 11. Relación de pesos de biomasa de cepa XY01

pH	Biomasa M1	Biomasa M2	Biomasa M3
3,5	7,86	7,01	8,24
4,5	8,91	8,1	9,31
5,5	19,18	18,26	19,79
6,5	14,26	13,96	15,37
7,5	9,36	8,57	9,56

Fuente: autor

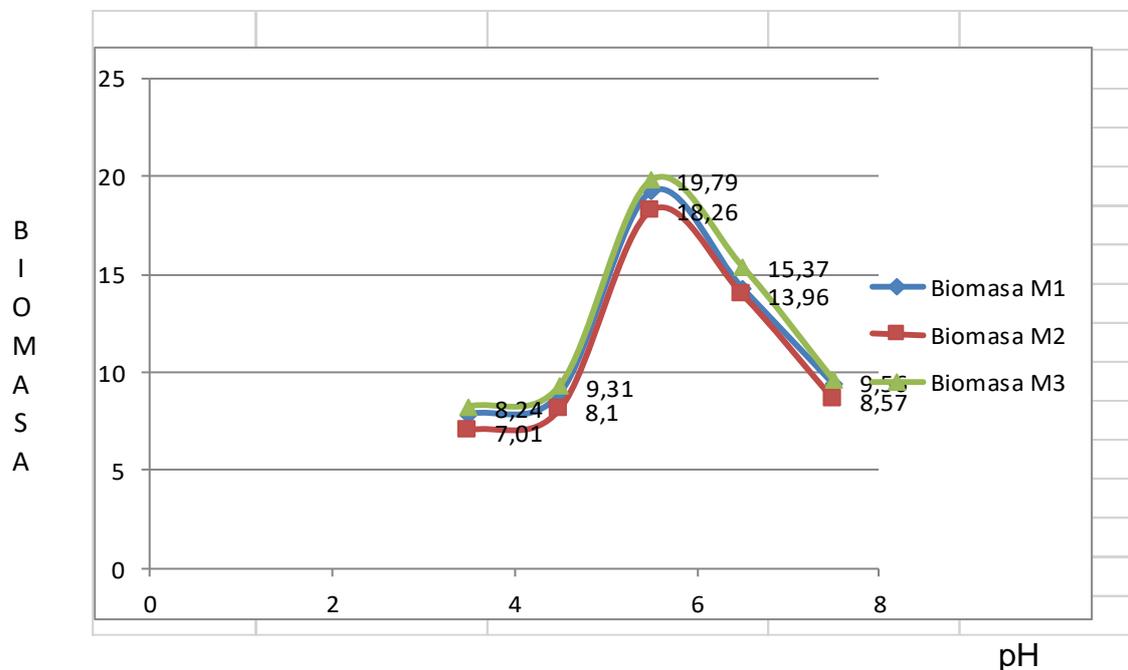


Figura 9. Relación de pesos de biomasa de cepa XY01

4.3. Producción de exopolisacáridos a partir de hongos *Lentinula Edodes*, evaluados a diferentes concentraciones de pH

4.3.1. Producción de exopolisacáridos a partir de la cepa *Lentinula edodes* XX12

Cuadro 12. Producción de exopolisacáridos a partir de la cepa XX12

Especie	Muestra	pH	Exopolisacáridos
<i>Lentinula Edodes</i> XX12	M1	3,5	0.7526
		4,5	0.8129
		5,5	1.4817
		6,5	1.2639
		7,5	0.889
	M2	3,5	0.8064
		4,5	0.9422
		5,5	1.5721
		6,5	1.4126
		7,5	0.9211
	M3	3,5	0.8114
		4,5	0.9637
		5,5	1.7828
		6,5	1.5617
		7,5	0.9746

Fuente: autor

4.3.2. Producción de exopolisacáridos a partir de la cepa *Lentinula edodes* XY01

Cuadro 13. Producción de exopolisacáridos a partir de cepa XY01

Especie	Muestra	pH	Exopolisacáridos
<i>Lentinula Edodes XY01</i>	M1	3,5	0.8121
		4,5	0.8768
		5,5	1.8026
		6,5	1.6412
		7,5	0.9642
	M2	3,5	0.7539
		4,5	0.8017
		5,5	1.7621
		6,5	1.4010
		7,5	0.8654
	M3	3,5	0.8461
		4,5	0.9126
		5,5	1.8876
		6,5	1.7127
		7,5	0.9947

Fuente: autor

4.3.3. TABLAS COMPARATIVAS DE PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS

Tabla comparativa XX12

Muestra	pH	Exopolisacàridos
M1	3,5	0.7526
M1	4,5	0.8129
M1	5,5	1,4817
M1	6,5	1,2639
M1	7,5	0.889
M2	3,5	0.8064
M2	4,5	0.9422
M2	5,5	1,5721
M2	6,5	1,4126
M2	7,5	0.9211
M3	3,5	0.8114
M3	4,5	0.9637
M3	5,5	1,7828
M3	6,5	1,5617
M3	7,5	0.9746

Fuente:autor

Tabla comparativa XY01

Muestra	pH	Exopolisacàridos
M1	3,5	0.8121
M1	4,5	0.8768
M1	5,5	1,8026
M1	6,5	1,6412
M1	7,5	0.9642
M2	3,5	0.7539
M2	4,5	0.8017
M2	5,5	1,7621
M2	6,5	1,4010
M2	7,5	0.8654
M3	3,5	0.8461
M3	4,5	0.9126
M3	5,5	1,8876
M3	6,5	1,7127
M3	7,5	0.9947

Fuente: autor

4.3.4. GRÁFICOS COMPARATIVAS DE PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS A PARTIR DE LA CEPA XX12

Cuadro 14. Valores comparativos de exopolisacárido de la cepa XX12

pH	Exopolisacàridos M1	Exopolisacàridos M2	Exopolisacàridos M3
3,5	0.7526	0.8064	0.8114
4,5	0.8129	0.9422	0.9637
5,5	1,4817	1,5721	1,7828
6,5	1,2639	1,4126	1,5617
7,5	0.889	0.9211	0.9746

Fuente: autor

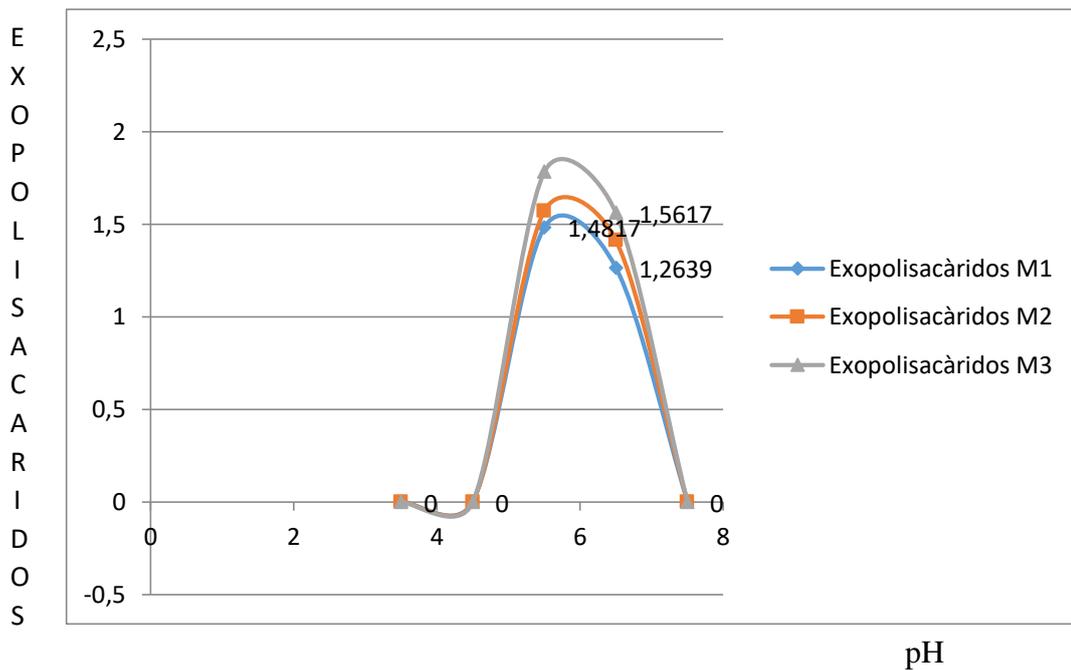


Figura 11. Producción de exopolisacáridos de cepa XX12

4.3.5. GRÁFICOS COMPARATIVAS DE PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS A PARTIR DE LA CEPA XY01

Cuadro 15. Valores comparativos de exopolisacáridos de la cepa XY01

pH	Exopolisacàridos M1	Exopolisacàridos M2	Exopolisacàridos M3
3,5	0,8121	0,7539	0,8461
4,5	0,8768	0,8017	0,9126
5,5	1,8026	1,7621	1,8876
6,5	1,6412	1,4010	1,7127
7,5	0,9642	0,8654	0,9947

Fuente: autor

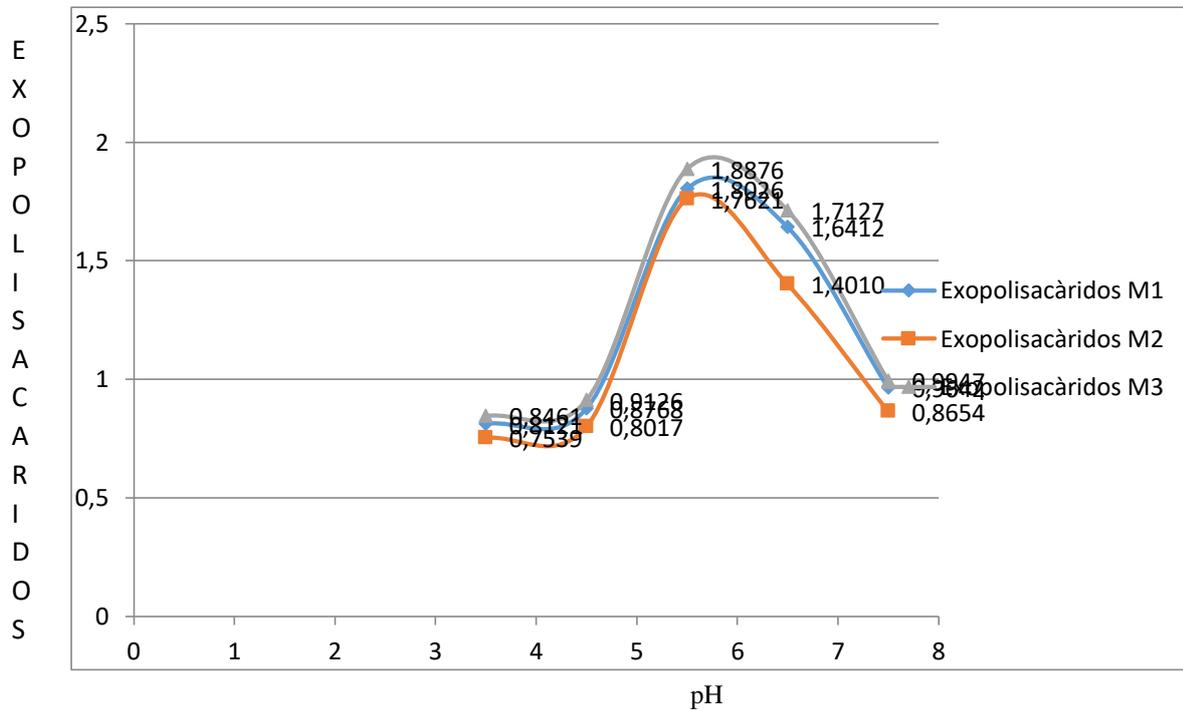


Figura 12. Producción de exopolisacáridos de cepa XY01

CAPITULO V

5.1. CONCLUSIONES

- Los macromicetos, especialmente las setas poseen un sin número de propiedades con beneficios para el ser humano, las cuales se presentan de acuerdo al lugar y alimento que se mantienen en su hábitat.
- La cepa de *Lentinula edodes* que se encuentra cultivada en un medio de concentración 5,5 da mejores resultados, de acuerdo a sus componentes.
- Los porcentajes de biomasa y exopolisacáridos dependerán de la calidad de la cepa, de los medios de cultivo, su agitación durante el proceso.

5.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con las investigaciones de sus biomoléculas, ya que son empleadas en varias áreas para favorecer al ser humano.
- Se debe considerar el medio de cultivo donde se realizará el proceso dependiendo de estos elementos se desarrollará mayor cantidad de producto.
- La agitación constante durante el proceso, es necesaria hasta obtener su biomasa y luego los exopolisacáridos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arce-Torres, L. F., Gómez-Díaz, I., Monge-Artavia, M., & Prado-Cordero, J. (2020). Metabolitos secundarios con actividad medicinal extraídos de hongos provenientes de Centroamérica. *Revista Tecnología En Marcha*, 33, 80–89.
- Campuzano, C., Carolina, L., Subtítulo, T. Y., Campuzano, C., Carolina, L., Santillán, C., Alejandra, R., María, Q. F., Villacrés, C., Tutora, C., María, Q. F. O., & Ramírez, O. (2020). *Evaluación de la actividad antiinflamatoria in vivo edodes) en ratones de experimentación* .
- Cui F. J.; Li Y.; Xu Z. H.; Xu H. Y.; Sun K. and Tao W. Y. 2006. Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exo-polymer by *Grifola frondosa* GF9801 using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 97, 1209-1216.
- Chang, S. T., & Miles, P. G. (2004). Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact: Second edition. In *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*.
- Chegwin C, Nieto I. Estudio químico preliminar de los metabolitos secundarios mayoritarios de tipo esterólico presentes en el extracto en acetato de etilo del hongo macromiceto *Pleurotus sajor-cajú* e inicio en búsqueda de estatinas en el mismo [Tesis de pregrado en química], Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias, Departamento de química. 2004.
- Chen, A. W. (2001). Cultivation of *Lentinula edodes* on synthetic logs. *Mushroom Growers' Newsletter*, 10(4), 3–9.
- Chen, L., Gong, Y., Cai, Y., Liu, W., Zhou, Y., Xiao, Y., Xu, Z., Liu, Y., Lei, X., Wang, G., Guo, M., Ma, X., & Bian, Y. (2016). Genome sequence of the edible cultivated mushroom *Lentinula edodes* (shiitake) reveals insights into lignocellulose degradation. *PLoS ONE*, 11(8), 1–20.
- Chihara G, Hamuro J, Maeda Y, Arai Y, Fukuoka F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumour activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing, an edible mushroom. *Cancer Research*, 1970; 30: 2776-2781
- Díaz, J.A. y F. Ortiz. 2001. Mercado internacional de hongos exóticos.

Biocomercio sostenible. Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá

Feng, Y., W. Li, X. Wu, J. Cheng y S. Ma. 2010. Statistical optimization of media form mycelia growth and exopolysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two morphologies. *Biochem. Eng. J.* 49, 104-112

Gaitán-Hernández, R., Cortés, N., & Mata, G. (2014). Improvement of yield of the edible and medicinal mushroom *Lentinula edodes* on wheat straw by use of supplemented spawn. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 467–474.

Guarín, J.A. y A. Ramírez. 2004. Estudio de la factibilidad técnico – financiera de un cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

Hassegawa, H. (2014). Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(8), 94-99

Hsieh C.; Liu C. J.; Tseng M. H.; Lo C. T. and Yang Y. C. 2006. Effect of olive oil on the production of mycelial biomass and polysaccharides of *Grifola frondosa* under high oxygen concentration aeration. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 434-439

Ina, K. and Ando, T. (2012) The Use of Lentinan for Treating Gastric Cancer.

Khatua, S., Chandra, S., & Acharya, K. (2019). Expanding knowledge on *Russula alata*, a novel mushroom from tribal cuisine, with chemical and pharmaceutical relevance. *Cytotechnology*, 71(1), 245–259.

Kim, J. Y., Kim, D. Y., Park, Y. J., & Jang, M. J. (2020). Transcriptome analysis of the edible mushroom *Lentinula edodes* in response to blue light. *PLoS ONE*, 15(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230680>

Kuhar, J., Castiglia, V., & Papinutti, V. (2013). *Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos*.

Lakzian A, Berenji AR, Karimi E, Razavi S (2008) Adsorption Capability of Lead, Nickel and Zinc by Exopolysaccharide and Dried Cell of *Ensifer meliloti*. *Asian J Chem* 20: 6075-6080

Lee B. C.; Bae J. T.; Pyo H. B.; Choe T. B.; Kim S. W.; Hwang H. J. and Yun J. W. 2004. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 369-376

Liu, F., Ooi, V. E. C., and Chang, S. T. (1997). Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences* 60, 763-771

Maeda Y. Y., Hamuro J., Chihara G. The mechanisms of action of antitumour polysaccharides: The effects of antilymphocyte serum on the antitumour activity of lentinan. *Int. J. Cancer* 1971, 8: 41-46

López-peña, D., Gutiérrez, A., & Esqueda, M. (2013). Cinética de crecimiento y composición química del micelio de. *Revista Mexicana de Micología*, August 2012.

Moonmoon, M.; Jahan, N. S.; Asaduzzaman, K. M. D.; Nazim, U.; Hossain, K.; Tania, M. and Ahmed S. 2011. Effects of different levels of wheat bran, rice bran and maize powder supplementation with saw dust on the production of shiitake mushroom (*Lentinula edodes* (Berk.) Singer). *Saudi J. Biol. Sci.* 18:323-328.

Osman, M., F. Hassan, O. Khattab, W. Ahmed y H. ElHenawy. 2009. Physiological studies on growth of two differ strains of *Lentinus edodes*. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 3, 4094-4103

Paucar López Lissette Cristina, Z. S. A. (2021). Evaluación del contenido de lentinan en la *Lentinula edodes* que se cultiva en el Ecuador.

Pazmiño, P. (2013). Empleo de los desechos del procesamiento del brócoli (*Brassica oleracea italica*) generados en la industria PROVEFRUT S. A y desechos forestales de Eucalipto (*Eucaliptus globulus*) generados en la provincia de Cotopaxi para la producción de setas Shiitake (. 15–17.

Pire D, Wright J, Albertó E (2001) Cultivation of shiitake using sawdust from widely available local woods in Argentina. *Micologia Aplicada International* 13: 87–91

Ramírez Anguiano, A. C. (2009). Estudio de las propiedades bioactivas de hongos comestibles para el diseño de productos cárnicos funcionales. 1–245.

Rasulov BA, Yili A, Aisa HA (2013) Biosorption of Metal Ions by Exopolysaccharide Produced by *Azotobacter chroococcum* XU1. *J Environ Prot* 4: 989-993

Rivera O, Nieto I. Estudio del efecto de la adición del estípite de shiitake (*Lentinula edodes* berk. pegler) y de un extracto rico en sus polisacáridos sobre las cualidades nutricionales del antipasto [Tesis de especialización en ciencia y tecnología de alimentos] Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias, Posgrado en ciencia y tecnología de alimentos. 2010.

Rodríguez Valencia, N., Jaramillo López, C., & Federación nacional de cafeteros de colombia. (2005). Cultivo de Hongos medicinales en residuos agrícolas de la zona cafetera. *Cenicafé*, 28, 0–73.

Saito M, Yamashita T, Kaneda T. Quantitative anlysis of eritadenine in Shiitake Mushroom and other edible fungi. *J. Jap. Soc. Food Nutr.* 1975; 28: 503-513.

Sarti, G., & Curá, A. (2019). Optimización de las condiciones de cultivo para el desarrollo de una biopelícula bacteriana y su aplicación como biofertilizante en *Solanum lycopersicum* L. var. Río grande. *Revista de Protección Vegetal*, 34(2)

Suárez. (2011). Evaluación de medios de cultivo sintéticos y cereales para la producción de semilla de setas comestibles Evaluation of cereals and artificial cultivation methods in the production of spawn of edible mushrooms. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(1), 130–140.

Suárez Arango, C., & Nieto, I. J. (2013). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: Una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 1–8.

Tepwong, P. y T. Ohshima. 2009. Biosynthesis of ergothioneine during different stages of submerged fermentation of “shiitake” (*Lentinus edodes*) mushrooms and their bioactive properties. *J. Biosci. Bioeng.* 108, 54-55

Turlo, J., B. Gutkowska y F. Herold. 2010. Effect of selenium enrichment on antioxidant activities and chemical composition of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. Mycelia extracts. *Food Chem. Toxicol.* 48, 1085-1091

Trejo M, Douarchea C, Bailleuxa V, Poularda C, Mariota S, Regeardb C,y

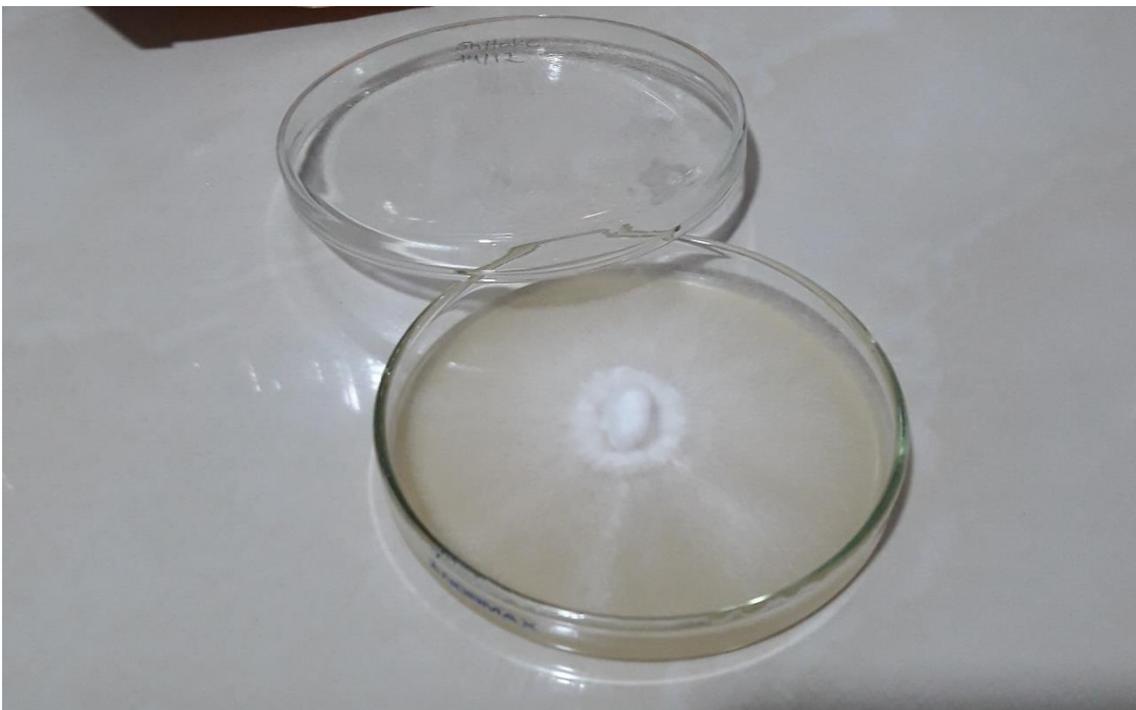
Raspauda E. Elasticity and wrinkled morphology of *Bacillus subtilis* pellicles. PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America). 2013; 110 (6):2011-2016.

Wagner D, Mitchell A, Sasaki GL, Lopes de Almeida Amazonas MA (2004) Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide. J Biotechnol 114: 153–164

Wasser S, Weis A. Medicinal properties of substances occurring in Higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives. International Journal of Medicinal Mushrooms, 1999; 1: 31–62

Zivanic J, Buescher R, Kim S. Mushroom texture, cell wall composition, color, and ultrastructure as affected by pH and temperature. Journal of Food Science. 2003; 5: 1860–1865.

Anexo 1



Cepas de *Lentinula edodes* receptada de Quito

Anexo 2



Preparación de Medio de Cultivo

- Agua destilada
- Agar Extracto de Malta
- Agar Papa Dextrosa

Anexo 3



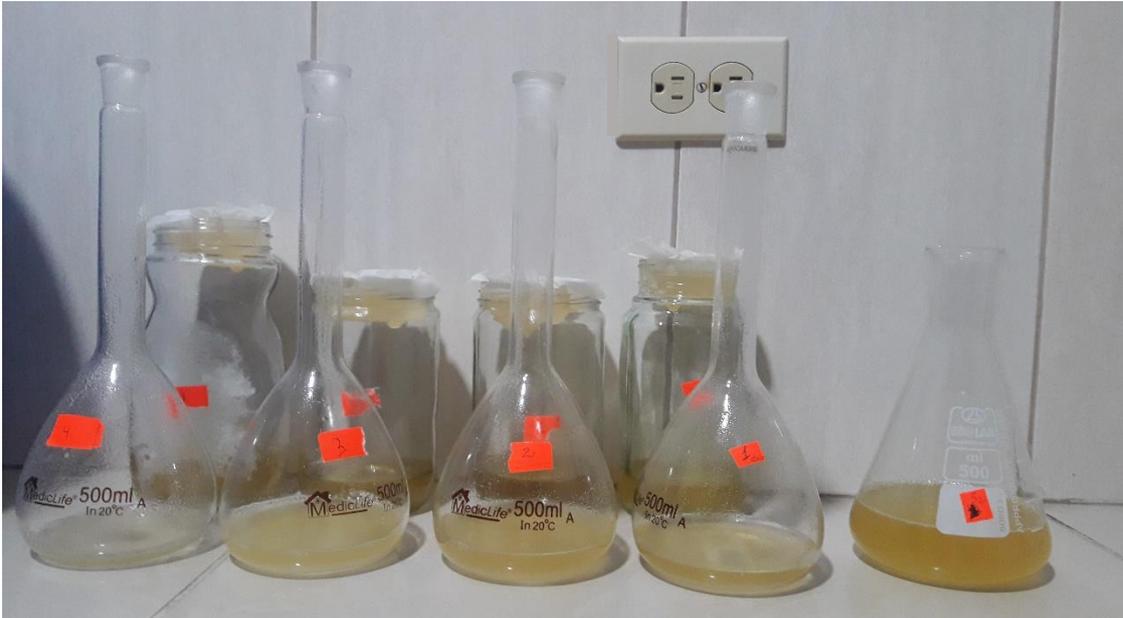
Pruebas en reposo para obtener producción de biomasa cada matraz contiene 250 ml de medio de cultivo adicionando los 5 mm de cepa *Lentinula edodes* (2 porciones).

Anexo 4



Se procede a pesar (balanza analítica marca Mettler Toledo) la cantidad de biomasa obtenida, el líquido filtrado obtenido se agrega 15 ml de alcohol étílico al 96% para obtención de exopolisacáridos de *Lentinula edodes*.

Anexo 5



Obtención de Exopolisacáridos de *Lentinula edodes* por filtración.

Anexo 6



Reactivos utilizados