

**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**



**ING. OMAR ALEJANDRO RIVERA MORALES**

**CÓDIGO 107401**

**Trabajo final para optar al título de  
Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**DIRECCIÓN**

**Dr. Sci. IVONNE JEANNETTE NIETO RAMÍREZ**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
PROGRAMA INTERFACULTADES  
ESPECIALIZACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
BOGOTA DC, 2010**

**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**

**ING. OMAR ALEJANDRO RIVERA MORALES**

**CODIGO 107401**

**Trabajo final para optar al título de  
Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**DIRECCIÓN**

**Dr. Sci. IVONNE JEANNETTE NIETO RAMÍREZ**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

**PROGRAMA INTERFACULTADES**

**ESPECIALIZACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**BOGOTA DC, 2010**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco especialmente al laboratorio de Química de Hongos Macromicetos de la Facultad de Química, en especial a las Doctoras Ivonne Jeannette Nieto Ramírez y Carolina Chegwin Angarita, por su gran enseñanza, por hacer posible este proyecto y por su invaluable esfuerzo por el desarrollo de la ciencia y el conocimiento de los Hongos Macromicetos en Colombia.

Al programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos por ofrecer este excelente programa, a Néstor Algecira (Director PECTA) y al Señor Álvaro Jiménez del ICTA.

A Yih Wen Fung y a toda su familia por sus invaluable enseñanzas.

A mi familia, mi madre Inirida Morales, mi padre Omar Rivera, mis abuelas Sabina Villegas y Beatriz Jiménez, y mi hermana Diana Rivera.

A Stefania Ramírez por su amor.

## **TITULO EN ESPAÑOL**

**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**

## **TITULO EN INGLES**

**STUDY OF EFECT OF ADDITION OF SHIITAKE STIPE (*Lentinula Edodes* Berk. Pegler) AND AN EXTRACT RICH IN POLYSACARIDES ON THE NUTRITIONAL QUALITY OF ANTIPASTI**

### **RESUMEN:**

En la presente investigación y con el objetivo de utilizar el estípite, parte del hongo Shiitake, que se ha convertido en una pérdida dentro de la cadena productiva del mismo dada su baja palatabilidad y que trae pérdidas económicas a los fungicultores, se elaboraron dos antipastos, empleando como ingrediente adicional tanto píleos como estípites de Shiitake por separado a los ingredientes tradicionales del antipasto. El empleo de este “desecho” se realizó para proporcionarle valor agregado al estípite y aumentar el carácter nutracéutico del antipasto, ya que éste contiene las mismas características funcionales del píleo.

Para determinar la diferencia nutricional se realizó el análisis proximal de los antipastos y para medir su palatabilidad y aceptación se efectuó el análisis sensorial, los cuales arrojaron como resultado una muy buena aceptación del producto elaborado con el estípite. En cuanto a su valor nutricional éste es muy similar en los dos antipastos, poniendo así de manifiesto la viabilidad del empleo de esta parte del hongo en la obtención de alimentos procesados. Así mismo, dado que el estípite contiene mayor cantidad de polisacáridos, compuestos con bioacción comprobada, se aumenta el carácter de alimento funcional del antipasto.

Con miras a aumentar aún más las propiedades nutracéuticas del antipasto, se plantea la posibilidad de emplear el extracto de polisacáridos obtenido del hongo como aditivo, para lo cual se realizó la extracción y cuantificación de los mismos, para a futuro explorar el potencial del empleo del estípite como materia prima en la producción de alimentos funcionales.

### **ABSTRACT:**

In this research and with the aim of using the stipe, part of the Shiitake mushroom, that has become a loss within the same production chain because of its low palatability and brings economic losses to mushroom growers, two antipasti were prepared, using as additional ingredient both pileus and stipes

separately of Shiitake to the traditional antipasto ingredients. The use of this "waste" was conducted to provide added value to the stipe and enhance the character nutraceutical of antipasto, because it contains the same functional characteristics of the pileus.

To determine the nutritional difference was performed proximal analysis to the two antipasti and to measure the palatability and acceptance sensory analysis was performed, which yielded very good results in a rating of the product prepared from the stipe. In terms of nutritional value it is very similar in the two antipasti, thereby demonstrating the feasibility of using this part of the fungus in the production of processed foods. Also, because the stipe contains more polysaccharides, compounds with proven bioacción, increases the character of functional food of antipasti.

In order to increase more the nutraceutical properties of antipasti, raised the possibility of using the polysaccharide extract of the mushroom obtained as an additive, this was done for the extraction and quantification of these, to explore in future the employment potential of the stipe as feedstock in the production of functional foods.

**Palabras Clave:**

Lentinan, extracto, antipasto, nutracéutico

**Keys words:**

Lentinan, extract, antipasti, nutraceutical

**TRABAJO DIRIGIDO POR:**

---

**Dr. Sci. IVONNE JEANNETTE NIETO RAMÍREZ**

**OMAR ALEJANDRO RIVERA MORALES**

**AÑO DE NACIMIENTO 1985**

Bogotá, D.C. Julio de 2010

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. Objetivo General.....	10
2.2. Objetivos Específicos .....	10
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....	11
4. MARCO TEÓRICO .....	13
4.1. SHIITAKE ( <i>Lentinula edodes</i> ).....	13
4.1.1. Generalidades.....	13
4.1.2. Clasificación y Morfología .....	13
4.1.3. Composición nutricional del Shiitake.....	14
4.1.4. Composición medicinal del Shiitake.....	16
4.1.5. Crecimiento del Shiitake.....	18
4.1.6. Cultivo de Shiitake.....	19
4.1.7. Cultivo en Bloques de sustrato.....	19
4.2. LOS POLISACÁRIDOS COMO COMPUESTOS BIOACTIVOS .....	21
4.2.1. Lentinan .....	22
4.2.2. Métodos de extracción de polisacáridos .....	23
4.2.3. Método de Dubois para determinación de carbohidratos totales	24
4.3. LOS ANTIPASTOS .....	25
4.4. ANÁLISIS SENSORIAL .....	25
4.5. ANÁLISIS PROXIMAL .....	26
4.5.1. Determinación de humedad .....	27
4.5.2. Determinación de grasa .....	27
4.5.3. Determinación de cenizas .....	27
4.5.4. Determinación de proteínas .....	27
4.5.5. Determinación de fibra dietaria total.....	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1. MATERIAL FÚNGICO .....	29
5.2. EXTRACCIÓN DE POLISACÁRIDOS .....	32
5.3. MÉTODO DE DUBOIS PARA DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS TOTALES.....	35

5.4.	PREPARACIÓN DEL ANTIPASTO.....	38
5.5.	ANÁLISIS SENSORIAL .....	41
5.6.	ANÁLISIS PROXIMAL .....	42
5.6.1.	Determinación de Humedad.....	42
5.6.2.	Determinación de Grasa .....	42
5.6.3.	Determinación de Ceniza .....	44
5.6.4.	Determinación de Proteínas.....	45
5.6.5.	Determinación de Fibra Dietaría Total.....	45
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
6.1.	MATERIAL FÚNGICO .....	47
6.2.	EXTRACCIÓN DE POLISACÁRIDOS .....	47
6.3.	MÉTODO DE DUBOIS PARA DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS TOTALES.....	47
6.4.	DESARROLLO DEL ANTIPASTO .....	48
6.5.	ANÁLISIS SENSORIAL .....	49
6.6.	ANÁLISIS PROXIMAL .....	50
7.	CONCLUSIONES .....	53
8.	RECOMENDACIONES.....	54
9.	BIBLIOGRAFIA.....	55
10.	ANEXOS .....	60
	ANEXO 1. FORMATO ENCUESTA ANALISIS SENSORIAL .....	60

## 1. INTRODUCCIÓN

El hongo comestible y medicinal *Lentinula Edodes*, más conocido como Shiitake, tiene origen asiático y forma parte fundamental de la cultura alimenticia de esta región, donde se cultiva hace más de un milenio por su exquisito sabor y por sus propiedades nutraceuticas y medicinales (Hobbs C., 1995; Przybylowicz y Donoghue, 1990; Ikekawa, T. 2001), dentro de las que se pueden citar: antiinflamatoria, antitumoral, antiviral, antibacterial, antiparasitaria, reguladora de la presión sanguínea y de los niveles de colesterol, antidiabético, inmunomodulador, tónico renal, hepatoprotector y potenciador sexual . Estas cualidades son debidas a la presencia de diversos metabolitos tanto secundarios como primarios (Wasser and Weis, 1999; Miles y Chang, 1997; Stamets, 2000; Przybylowicz y Donoghue, 1990; Cáncer Center UK 2002, MushWorld, 2005; Ikekawa, T. 2001).

Los fungicultores en Colombia tienen el problema que entre el 15 y el 20% de su producción se pierde debido a que los compradores exigen que el estípite sea retirado del hongo, por su característica fibrosa y su baja palatabilidad. La propuesta de la elaboración del antipasto es el aprovechamiento de los estípites cuya adición al mismo le daría carácter de alimento funcional, debido a que esta parte de la seta contiene, al igual que el carpóforo, polisacáridos dentro de los cuales se encuentran los glucanos, poseedores de acción anticancerígena e inmunestimuladora, que pueden enriquecer un alimento tanto a nivel nutricional como medicinal (Fung, 2006). La utilización de este desecho se constituiría en un valor agregado para los fungicultores.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

Determinar el efecto producido sobre la calidad nutricional de un antipasto tradicional al adicionarle tanto el estípite como del píleo del hongo macromiceto *Lentinula edodes* y un extracto rico en sus polisacáridos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Obtener el extracto rico en polisacáridos del píleo y del estípite del Shiitake para determinar cuál de las dos opciones es la más adecuada para preparar el antipasto.

Comparar con el uso del análisis proximal, la calidad nutricional de un antipasto con el píleo, otro con el estípite y otro con el extracto de los polisacáridos del hongo Shiitake.

Realizar un análisis sensorial preliminar enfocado únicamente hacia el efecto de las diferentes variables estudiadas sobre el sabor del antipasto obtenido.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En Colombia, dentro del ciclo de comercialización del hongo Shiitake hay un rango entre el 15 y el 20% de la eficiencia biológica que es desechado, correspondiente a parte del estípite (tallo) que por sus características fibrosas (Fung, 2006) no es aceptado por los compradores mayoristas. Sin embargo es posible aprovechar las propiedades de esta parte de la seta, si se tiene en cuenta que los contenidos de los glucanos son del 0.3% de estípite comparado con 0.55% del píleo, que es la parte del cuerpo fructífero actualmente comercializada.

En Colombia debido a que no tenemos la costumbre de consumirlos, el cultivo de hongos comestibles y medicinales ha tenido una evolución muy lenta comparada con la de países como E.U., Canadá, algunos europeos como España, Holanda, Italia entre otros, algunos países asiáticos como China, Japón, Tailandia, Taiwán entre otros, y países latinoamericanos como Brasil y México (Przybylowicz y Donoghue, 1990; Mushworld, 2005). El champiñón blanco (*Agaricus bisporus*) ha tenido una gran acogida por la población colombiana, su consumo y producción en el país se ha incrementado de forma considerable en los últimos 40 años, mientras que los hongos como las Orellanas (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*) y el Shiitake han sido cultivados y consumidos tan solo en los últimos 20 años sin tener el mismo éxito que el champiñón blanco, esto debido a la cultura alimenticia del nuestro país y al poco conocimiento de las propiedades nutricionales y medicinales que estos alimentos contienen (Fung, 2006). Uno de los problemas para los fungicultores del país ha sido introducir estos productos en las costumbres alimenticias de los colombianos, sin embargo hoy en día se han abierto mercados representativos, como lo son los restaurantes de comida oriental y de comida vegetariana altamente renombrados, tiendas especializadas de alimentos orientales, vegetarianos, orgánicos y de comida gourmet, algunos almacenes de cadena como Carulla, Éxito, Pomona, Surtifruver de la Sabana y otras tiendas de vegetales, frutas y hortalizas, quienes los ofrecen frescos en bandejas de 100 a 200 gr. Recientemente se ha abierto un mercado muy valioso con la oportunidad del negocio potencial de exportar hongos comestibles y medicinales producidos en el país y productos producidos tras su transformación o preparación, tales como antipastos, salsas, aderezos, harinas, extractos, entre otros.

Pero quizás el principal problema radica en que tanto los restaurantes que emplean el hongo fresco así como los mercados internacionales, con frecuencia lo requieren sin estípite, perjudicando de forma considerable al productor quien ve reducidos sus ingresos. Para citar un ejemplo, al cosechar 10 kilos de cuerpo fructífero de Shiitake, en promedio entre 1,5 y 2 kilos de estípite se deben desechar; es decir, del 15 al 20% de la cosecha se desperdicia, dejando al productor con un material que no tiene valor

comercial, pero que si tiene en considerable proporción todos los beneficios exhibidos por la fructificación del hongo.

Para los productores de Shiitake, esto se entiende como una potencial perdida, ya que el esfuerzo del productor consiste en obtener la máxima eficiencia biológica posible de sus sustratos, del espacio que utiliza, del esfuerzo humano que aplica y en general de la inversión que se realiza. Es este el panorama que lleva a plantear la necesidad de adelantar investigaciones en las que el objetivo sea ayudar a los consumidores a conocer el inmenso potencial que tienen los hongos comestibles y en este caso particular el Shiitake, llevando a la vez a la comercialización de estos alimentos funcionales. Una de las herramientas que se puede utilizar para lograr este fin es obtener productos modernos y atractivos al consumidor como lo es el antipasto propuesto en este trabajo, que adicionalmente sería una fuente importante de alimento para las personas vegetarianas, ya que estarían consumiendo un producto con alto contenido nutricional y un importante valor proteico.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. SHIITAKE (*Lentinula edodes*)

Figura 1. Hongo Shiitake (*Lentinula edodes*) (Fuente: El autor)



#### 4.1.1. Generalidades

El Shiitake fue clasificado como *Lentinus edodes* por Singer en 1941 (Przybylowicz y Donoghue, 1990), posteriormente Pegler en 1975 propuso denominarlo *Lentinula edodes*, nombre que conserva a la fecha tras haber sufrido 15 cambios desde que fue descrito inicialmente como *Agaricus edodes* en 1877 por Berkeley (Przybylowicz y Donoghue, 1990). Muchos taxónomos están de acuerdo con la clasificación de Pegler principalmente debido a la naturaleza de la putrefacción blanca causada por este hongo, aunque también se han generalizado los nombres comunes “Shiang-gu” originario de China y “Shiitake” de Japón (Quimio, Chang, Royse, 1990). Este último término significa “hongo negro del bosque” debido a sus características físicas y a su crecimiento natural en los árboles de los bosques (Quimio, Chang, Royse, 1990).

#### 4.1.2. Clasificación y Morfología

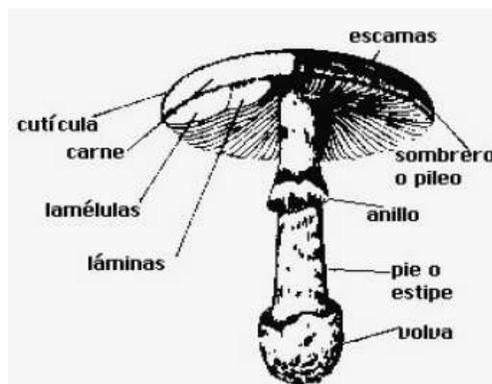
El Shiitake es un hongo clasificado taxonómicamente de la siguiente forma: reino Fungi, phylum *Basidiomycota*, clase *Basidiomycetes*, orden *Agaricales*, familia *Thricholomataceae*, género *Lentinula* y especie *Edodes*.

La morfología del Shiitake corresponde a la morfología típica de los hongos Basidiomicetos (Figura 3). Es un Agarical con píleo marrón oscuro de 5 a 20 cm de diámetro, de forma convexa, las laminillas son planas y blancas. El estípite es fibroso, unido central, excéntricamente y áspero en su textura. Las esporas son blancas de forma ovoide (Fung, 2006; Miles, P. Chang, S. 1999).

Figura 2. Hongo Shiitake sin cosechar (Fuente: El autor)



Figura.3. Morfología de un Basidiomiceto (Fuente: Pire, 2001)



#### 4.1.3. Composición nutricional del Shiitake

Nutricionalmente, los hongos Shiitake tienen gran valor, debido a que son un buen recurso de vitaminas B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina) y D, también contiene todos los aminoácidos esenciales, fibra dietaria, alto valor calórico y la cantidad de proteína es comparable con la del pollo y el cerdo pero con más fibra que dichas carnes. Contiene altos niveles de minerales como hierro, potasio y fósforo (Stamets, 2000).

Otros estudios realizados según Crisand y Sands (1978) citados por Miles y Chang (1997) muestran que el Shiitake no posee más de 18% de proteína cruda; si bien esta cantidad de proteína es baja si se le compara a la obtenida por la carne, en él se encuentran todos los aminoácidos esenciales para el hombre incluyendo leucina y lisina en grandes cantidades, las cuales por lo general están ausentes en la mayoría de cereales y sus subproductos.

En la tabla 1 podemos apreciar que el Shiitake tiene niveles de grasa casi despreciables con respecto al trigo y a la carne de pollo, teniendo en cuenta que ha sido reportado que el *Lentinula edodes* reporta alto contenido de

ácidos grasos. El contenido de fibra está calculado en aproximadamente 6,7 mg por cada 100 g de Shiitake fresco, este es un valor muy significativo. También podemos apreciar que es un valor proteico bastante significativo, respecto a otros alimentos. También contiene altos niveles de hierro, y vitaminas B1, B2 y B3 (Musworld, 2005, NATURAL RURAL LIVING SCIENCE INSTITUTE, R.D.A. Korea, 2001)

.Tabla 1. Análisis proximal, de vitaminas y minerales del Shiitake fresco y deshidratado por cada 100 g, comparado con otros alimentos (Fuente: NATURAL RURAL LIVING SCIENCE INSTITUTE, R.D.A. Korea, 2001)

ALIMENTO	ENERGIA (KCal)	HUMEDAD (%)	PROTEINA (g)	GRASA (g)	CENIZAS (g)	CARBOHIDRATOS (mg)	
						AZUCAR	FIBRA
SHIITAKE							
Deshidratado	272	10,6	18,1	3,1	4,5	57	6,7
Fresco	27	90,8	2	0,3	0,8	5,4	0,7
OTROS ALIMENTOS							
Trigo	328	11,8	12	2,9	1,8	69	2,5
Carne de pollo	180	69,4	19	10,6	0,9	0,1	0

ALIMENTO	MINERALES (mg)					VITAMINAS (mg)				
	Ca	P	Fe	Na	K	A	B1	B2	B3	C
SHIITAKE										
Deshidratado	19	268	3,3	25	2140	0	0,48	1,6	19	0
Fresco	6	28	0,6	5	180	0	0,08	0,2	4	-
OTROS ALIMENTOS										
Trigo	71	390	3,2	3	380	0	0,34	0,1	5	0
Carne de Pollo	11	110	1,1	58	327	50	0,2	0,2	2,7	0

#### 4.1.4. Composición medicinal del Shiitake.

Gracias al desarrollo de la química de los productos naturales y al enfoque sobre el estudio de los metabolitos fúngicos, los hongos comestibles han sido reconocidos como alimentos funcionales (Piqueras, 2004) por la presencia de compuestos como polisacáridos, triterpenos, flavonoides, esteroides y ácidos grasos entre otros (Chegwin, 2004). El *Lentinula edodes* conocido tradicionalmente en las culturas orientales como nutraceutico, se utiliza como droga según la farmacopea oriental (Jones, 1995; Mushworld, 2005, Przybylowicz y Donoghue, 1990; Miles, P. Chang, S. 1999) y varios metabolitos que de sus cuerpos fructíferos se han aislado presentan numerosas actividades biológicas (Wasser and Weis, 1999; Miles y Chang, 1997; Stamets, 2000; Cáncer Center UK, 2002; Mushworld, 2005, Przybylowicz y Donoghue, 1990) dentro de las que podemos nombrar: antiinflamatoria, antitumoral, antiviral, antibacterial, antiparasitaria, regulador de la presión sanguínea y de los niveles de colesterol, antidiabético, inmunomodulador, tónico renal, hepatoprotector y potenciador sexual (Wasser & Weis, 1999). En la tabla 2 están resumidos algunos de los compuestos aislados de Shiitake, el grupo funcional al que pertenecen y su uso bioacción.

Tabla 2. Compuestos activos del Shiitake

COMPUESTO	GRUPO FUNCIONAL	BIOACCIÓN	REFERENCIA
<b>Eritadenina</b>	Derivado aciclico de la adenosina	Hipolipidémico, reduce los niveles de colesterol en la sangre por excreción	Suzuki, S.; Ohshima, S., 1974, Yamamura y Cochran, 1974
<b>C-1-2</b>	Polisacárido	Inmunoactivo	
<b>Lectina</b>	Proteína	Inmunoactivo	
<b>Lentinan</b>	Polisacárido	Antibacterial, Antiviral, Inmunoactivo	Chihara, 1970
<b>Emitanina</b>	Polisacárido	Inmunoactivo	
<b>EPS – EPS4</b>	Lignina	Antiviral, Inmunoactivo	Susuki <i>et al</i> , 1990 Sorimachi <i>et al</i> , 1990
<b>KS-2, KS-2-B</b>	Péptido	Antiviral, Antibacterial, Inmunoactivo	Fuji <i>et al</i> , 1978
<b>AC2P</b>	Polisacárido	Antiviral	
<b>FBP</b>	Proteína	Antiviral	
<b>RNA</b>	Ácidos Nucleicos	Antiviral	

<b>Ergosterol</b>	Triterpeno	Provitamina D-2	
-------------------	------------	-----------------	--

Hay estudios realizados por instituciones medicas como *The Hong Kong Association for Health Care, New York Academy of Science*, y universidades en Japón, China, Estados Unidos, Reino Unido, Alemania, Suecia, Noruega, Dinamarca, Francia, etc., que demuestran las propiedades medicinales de este hongo, cuyos resultados están plasmados en importantes publicaciones como *Journal of Cáncer and Chemotherapy, International Journal of Oriental Medicine, International Journal of Immunotherapy, International Journal of Immunopharmacology, International Journal of Medicinal Mushrooms. International Journal of Cáncer*, entre otras, que demuestran que con el uso del polisacárido Lentinan, en algunos casos de cáncer estomacal y de colon, se ha eliminado el 100% del tumor y se ha elevado el número de días de vida en pacientes terminales (Chihara, 1992; Mizuno, 1995; Miles y Chang, 1997).

En la actualidad existen en el mercado diferentes empresas que se encargan de la extracción de componentes activos de productos naturales que son comercializados como suplementos dietarios, productos nutracéuticos, aditivos alimenticios, factores de transferencia, medicinas naturales y productos farmacéuticos. En el campo de los hongos en general hay un gran historial de productos medicinales que son obtenidos a partir de estos y usados con gran frecuencia en nuestra sociedad, tales como antibióticos, micofarina, factores de transferencia y diferentes metabolitos secundarios. Los extractos comerciales, los cuales son producidos y demandados en países orientales, Estados Unidos y Europa son vendidos como suplementos dietarios de diferentes hongos en tiendas de alimentos naturales y salud, en diferentes presentaciones como son capsulas o elixires (Cáncer Center UK, 2002; Mushworld, 2005, Przybylowicz y Donoghue, 1990). Las ventas de suplementos dietarios a base de hongos se han estimado entre 5 y 6 billones de dólares anualmente tomado de Cáncer Center UK quien cito a Chang y Buswell (1999).

Con base en estos antecedentes, se plantea como uno de los objetivos de este trabajo el obtener un extracto de Shiitake que contenga altos niveles de polisacáridos entre los que se encuentra el Lentinan, con el fin de adicionarlos a un producto alimenticio comercial, el antipasto, evaluando, el efecto sobre su calidad nutricional.

Como se mencionó anteriormente, el Shiitake ocupa el segundo lugar en la producción mundial. Sin embargo en el proceso de comercialización, una porción apreciable del estípite es desaprovechado sin tener en cuenta, como se ha comprobado que esta parte de la seta también tiene valiosos componentes como es el caso de los glucanos que pueden ser empleados para enriquecer otro alimento tanto a nivel nutricional como medicinal (Fung, 2006). Este hecho da pie para otro objetivo de la presente investigación

como es el de darle utilidad a esa parte del hongo lo que a su vez repercutiría en un valor agregado para los fungicultores.

#### **4.1.5. Crecimiento del Shiitake**

Para su óptimo crecimiento el hongo requiere tanto de factores nutricionales como químicos, que en conjunto con las enzimas extracelulares, degradan los polisacáridos insolubles hasta convertirlos en moléculas de menor complejidad y así ser absorbidos por las células de las hifas que conforman la masa micelial, la cual produce los cuerpos fructíferos (Stamets, 2000; Fung, 2006).

#### **Requerimientos nutricionales para el crecimiento de Shiitake**

Dentro de los requerimientos nutricionales para el desarrollo de este hongo, se encuentran fuentes externas de carbón y de nitrógeno, que inducen el crecimiento micelial, además fuentes de minerales y de vitamina B1. La presión del oxígeno y el pH ejercen efectos sobre los procesos metabólicos, y por ende, sobre la capacidad de las setas de emplear ciertos compuestos para sus necesidades nutricionales (Miles y Chang, 1997; Stamets, 2000).

- Fuentes de carbono (C): Glucosa, sucrosa, almidón, celulosa y hemicelulosa, lignina, (maderas duras de árboles de hojas anchas en aserrín y viruta, cascarillas).
- Fuentes de nitrógeno (N): Nitrógeno orgánico o sales de amonio, salvado de arroz, salvado de trigo (C: 69,9%, N: 11,4%)
- Relación C/N: Fase vegetativa (preparación del sustrato, inoculación, incubación, choque térmico) 25-30/1, fase reproductiva (fructificación, cosecha) 40-73/1.
- Fuente vitamina B1: Es requerida para el crecimiento del micelio y en la fase de fructificación, se encuentra en el salvado de trigo.

#### **Requerimientos físicos para el crecimiento de Shiitake**

Dentro de los factores ambientales se encuentran la temperatura, humedad relativa, luminosidad, ventilación y pH. El crecimiento y el desarrollo son afectados por estos factores relacionados con los siguientes parámetros: El mínimo es el valor por debajo del cual no hay crecimiento, el máximo es el valor por encima del cual no hay crecimiento y el óptimo en el cual se produce el mayor crecimiento (Stamets, 2000).

- pH: El Shiitake crece dentro de un rango de pH de 3,0 a 6,0 con un óptimo de 4,5 a 5,5 en la fase vegetativa y de 3,5 a 4,5 para la formación de los primeros primordios (cuando comienzan a fructificar).

- Temperatura: La temperatura óptima del crecimiento vegetativo del Shiitake es de 25°C. Por debajo de 5°C o por encima de 35°C el crecimiento del micelio se detiene.
- Humedad: Es necesario considerar la humedad del sustrato y la del ambiente que lo rodea. En general se maneja una humedad relativa del ambiente en la fase vegetativa de 50-75% y de 80-95% en la etapa de fructificación (Chang y Hayes,1978).
- Luminosidad: En la finalización de la incubación cuando comienza la pigmentación, la luz debe ser de 50 lux, y se incrementa a mínimo 100 lux en la etapa de fructificación (Quimio,1990).
- Ventilación: Cumple un papel importante al mantener la relación oxígeno – dióxido de carbono, los cuales determinan la velocidad de desarrollo del micelio.

#### **4.1.6. Cultivo de Shiitake**

*L. edodes* es el segundo hongo más comercializado en el mundo después del conocido “Champiñón” (*Agaricus bisporus*), fue cultivado por primera vez en China por Wu San Kwung en el condado de Qingyuan durante la dinastía Sung, utilizando la técnica de cultivo sobre troncos de madera (Quimio, Chang, Royse, 1990). En esta técnica, los troncos de madera se perforan y los huecos formados se inoculan con tapones que contienen esporas o micelio del hongo. Posteriormente los troncos se acomodan en pilas y constantemente se irrigan con agua. Tras 6 a 12 meses, se obtienen los primeros cuerpos fructíferos del hongo. Aunque este método de cultivo es lento en presentar los primeros cuerpos fructíferos, según los orientales es un método simple, natural, y no necesita la esterilización del sustrato ni el conocimiento de técnicas de laboratorio (Miles y Chang, 1999).

Desde 1987 China se convirtió en el principal productor de *Lentinus edodes*, desplazando a Japón, y desde entonces domina el mercado, así, el condado de Qingyuan presentó una producción de 106.500 toneladas de hongo fresco en 1997 (Miles y Chang,1999, Mushworld, 2005; Przybylowicz y Donoghue, 1990)). Actualmente, el cultivo en troncos naturales representa el 20% de la producción en el condado de Qingyuan, mientras que el 80% restante, proviene de cultivos usando el método del aserrín sintético, causando así menos daño ambiental que el ocasionado por el método tradicional por la tala de árboles. Es tan importante económicamente el hongo *L. edodes*, que el condado de Qingyuan fue nombrado por el gobierno chino, como “la ciudad del hongo *Lentinula*” (Quimio, Chang, Royse, 1990).

#### **4.1.7. Cultivo en Bloques de sustrato**

Para el cultivo de diferentes especies de macrohongos se desarrollo la técnica de troncos artificiales, también llamados bloques, que contienen sustratos que satisfacen las necesidades nutricionales del hongo, y que

además son ubicados en lugares adaptados donde se controlan los requerimientos físicos para el crecimiento, para así lograr un óptimo cultivo que genera un impacto ambiental positivo al aprovechar residuos agrícolas, además, evita el impacto negativo que genera el cultivo tradicional en troncos naturales (Stamets, 2000).

Esta técnica consiste en la producción de bolsas que contienen una cantidad de sustrato previamente preparado bajo una fórmula que garantiza la adecuada proporción de carbono / nitrógeno y el pH óptimo para el crecimiento del hongo, para esto se puede usar un gran número de materiales que comprende desperdicios como aserrines y virutas de madera, bagazo de azúcar, pajas, tallos de maíz, desperdicios del café, productos de la industria papelera, vitivinícola, entre muchos más (Stamets, 2000; Mushworld, 2005; Przybylowicz y Donoghue, 1990).

Dichos bloques son esterilizados, inoculados con la semilla de Shiitake en condiciones de laboratorio, para después ser ubicados en cuartos de incubación donde el micelio colonizará el sustrato, después de aproximadamente tres meses son llevados a invernaderos de fructificación donde los bloques entraran a la fase de producción de cuerpos fructíferos.

Figura 4. Bloques esterilizados e inoculados con *Lentinula edodes* ubicados en cuarto de incubación (Fuente: El autor)



Figura 5. Bloques en fructificación (Fuente: El autor)





#### 4.2. LOS POLISACÁRIDOS COMO COMPUESTOS BIOACTIVOS

En la investigación científica de los productos naturales fúngicos, han sido de gran interés el aislamiento, caracterización química y pruebas biológicas de los metabolitos que sintetizan dichos organismos, pues éstos pueden tener aplicación biológica, médica, agrícola e industrial, como es el caso de los antibióticos (penicilina, ácido itacónico, cefalosporina), enzimas (lipasa, pectinasa, celulasa, entre otras), insulina, etanol, ácido cítrico, alcaloides, giberelinas, ergosterol, vitaminas y polisacáridos entre otros (Stamets, 2000).

Extractos de diferentes hongos en agua caliente son usados en la medicina tradicional China gracias a su alta eficiencia en tratamientos de diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, solo en las últimas cuatro décadas la tecnología química ha permitido aislar los componentes relevantes y usarlos en experimentos controlados (reportado por Borchers et al, 1999; Kidd, 2000; Feng et al, 2001; citados en Wasser y Weis, 1999; Cancer Research UK, 2002; Ikekawa, 2000;). Dentro de estos componentes se encuentran los polisacáridos, un grupo de macromoléculas biológicas con una importante diversidad estructural y de presencia generalizada en la naturaleza, caracterizados por ser estructuras poliméricas repetidas de monosacáridos unidos unos a otros por enlaces glicosídicos, por esta razón son diferenciados de las proteínas y los ácidos nucleicos. Los polisacáridos presentan la más alta capacidad de llevar información biológica ya que tienen el mayor potencial de variabilidad estructural entre las biomoléculas. Los aminoácidos en proteínas y los nucleótidos en ácidos nucleicos pueden enlazarse de una sola manera, mientras que las unidades de monosacáridos en oligosacáridos y polisacáridos, pueden hacerlo de varias maneras para formar una gran variedad de estructuras ramificadas o lineales (Sharon y Lis, 1993 citados en Cancer Research UK, 2002).

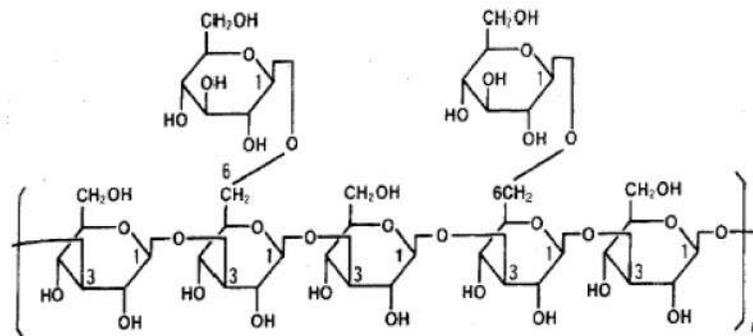
Muchos, sino todos los hongos basidiomicetos han mostrado tener polisacáridos con actividades antitumorales e inmunoestimulantes. Los primeros reportes datan de finales de los 60 hechos por Ikekawa *et al.* (1968, 1969) y Chihara *et al.* (1969,1970) quienes aislaron el Lentinan por primera vez y demostraron que los extractos de Lentinan exhibieron marcada actividad antitumoral en el huésped contra el sarcoma 180, observaciones que atrajeron la atención de la comunidad científica inmediatamente incentivando el estudio de dichos componentes que posteriormente fueron

aislados con agua caliente, purificados y fue determinada su estructura química.

#### 4.2.1. Lentinan

El Lentinan es un polisacárido  $\beta$ -(1-3)  $\beta$ -(1-6)-D Glucano con una estructura de triple hélice que contiene moléculas de glucosa con enlaces  $\beta$ -(1-3) en la parte central y enlaces  $\beta$ -(1-6)- Glucosa en las cadenas laterales. La configuración de las moléculas de glucosa en estructura de hélice es considerada importante para la actividad biológica (Figura.6), es soluble en agua y estable al calor. Fue aislado por primera vez por Chihara (1970), quien demostró que los efectos antitumorales de los polisacáridos de este hongo eran mejores que las de otras setas, y que eran activos para algunos, pero no todos los tipos de tumores (Maeda *et al.*, 1974). El polisacárido purificado ha mostrado en numerosas xenografías que causa regresión total del tumor (Hobbs, 1995; Wasser and Weis, 1999) y su actividad posiblemente puede deberse a la activación del sistema inmune del huésped.

Figura 6. Estructura del Lentinan (Fuente: Mizuno, 1999)



Diferentes pacientes con cáncer han sido sometidos a estudios clínicos cuando se les ha administrado Lentinan durante la quimioterapia, mostrando que el crecimiento del tumor se logra inhibir, la eficiencia de la quimioterapia aumenta y la vida del paciente es prolongada. El Lentinan mostro la prolongación del tiempo de vida a tres pacientes de cáncer gástrico inoperable (Mashiko *et al*, 1992; Shimizu *et al*, 1981) y a mujeres con recurrente cáncer de seno (Kosaka *et al*, 1995).

En un estudio clínico a 275 pacientes con cáncer gástrico recurrente se les administro quimioterapia, a algunos solo el agente quimioterapéutico (mitomycin C con 5-fluorouracil o tegafur) y a los otros pacientes se les administro Lentinan un tiempo antes de administrarles el agente quimioterapéutico. El análisis mostro mejores resultados en el tratamiento con Lentinan, prolongando considerablemente el tiempo de vida de los pacientes (Taguchi *et al*, 1981).

En otro grupo de 16 pacientes con cáncer avanzado, se administro Lentinan (4mg / semana por 4 semanas) vía intravenosa, se observo que el 80% del tumor se inhibió en 7 pacientes. El tiempo de sobrevivencia para los 7 pacientes que mostraron respuesta inmunológica fue de 129 días, mientras que los pacientes que no mostraron respuesta inmunológica, tan solo tuvieron 49 días de sobrevivencia (Oka *et al*, 1992).

#### **4.2.2. Métodos de extracción de polisacáridos**

En general, los polisacáridos son termoestables y solubles en agua, con mejores resultados en agua caliente.

Los métodos usados hasta ahora para elaborar suplementos dietarios a base de Shiitake enfocados especialmente en los polisacáridos fueron descritos por Wasser (2005) como sigue:

- Los cuerpos fructíferos son deshidratados naturalmente y pulverizados en forma de tabletas o capsulas.
- Los cuerpos fructíferos deshidratados y pulverizados, son extraídos con agua caliente o alcohol y posteriormente son concentrados (ejemplo Bio-Life).
- El micelio obtenido por fermentaciones en estado líquido, posterior separación de masa micelial y liofilización.

A pesar de que los métodos mencionados anteriormente no están enfocados en la purificación y el aislamiento de determinados polisacáridos, se han usado durante varios años para vender los denominados extractos y elixires en la medicina tradicional China (Wasser, 2005).

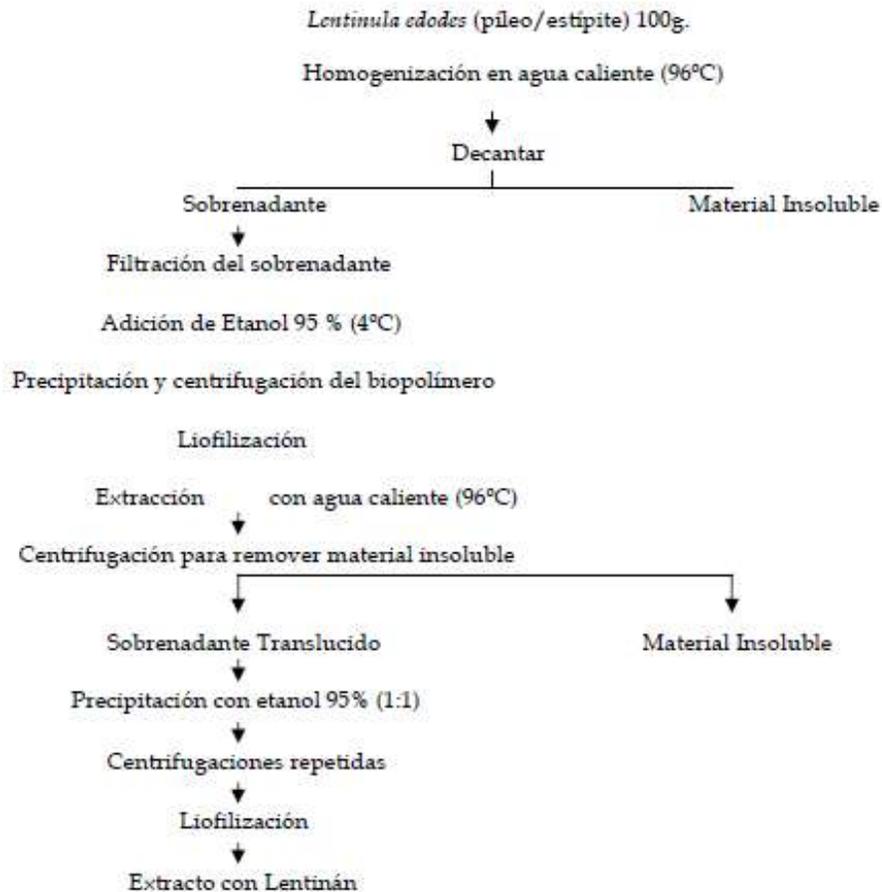
Existe una similitud en las diferentes técnicas desarrolladas para la extracción de este tipo de compuestos indistintamente de la fuente de la que provengan si es de los cuerpos fructíferos, del micelio o de los medios de cultivo (Mizuno, 1999).

Generalmente se utiliza etanol frio tanto para extraer como para eliminar las sustancias de menor peso molecular. La purificación se alcanza por combinación de técnicas incluidas la precipitación fraccionada, precipitación ácida con acido acético, cromatografía de intercambio iónico, filtración con geles y cromatografía de afinidad. Se han realizado modificaciones químicas por oxido reductolisis (degradación de Smith) y también por formolisis (Mizuno, 1999).

Un estudio reciente de Yap en 2001 estableció un método más eficiente para la extracción de  $\beta$ -D-glucanos del Shiitake (Figura 7) por precipitación con etanol y tratamiento con nitrógeno líquido obteniendo un producto con una pureza del 87,5 %. Desde un punto de vista comercial este método es práctico por su corto tiempo de realización, mayor eficiencia y costo

relativamente bajo comparado con los métodos de Chihara (1970) y Mizuno (1999). A continuación se detalla la metodología actual. (Yap & Ng, 2001).

Esquema 1. Método de extracción de  $\beta$ -D-Glucanos de *Lentinula Edodes* (Fuente Yap & Ng, 2001)



#### 4.2.3. Método de Dubois para determinación de carbohidratos totales

La colorimetría es una técnica instrumental que tiene como objetivo la determinación de la absorción de la luz visible a partir de una muestra que puede ser una sustancia pura, una mezcla o una disolución específica. De esta forma, la colorimetría desarrolla una serie de métodos, con el objetivo de realizar una cuantificación de los colores. Para este tipo de análisis es necesario el empleo de un instrumento conocido como colorímetro que está constituido por una *fente de radiación* (luz blanca), un sistema dispersivo como lo son las rendijas de entrada y salida, junto con la red de difracción; del detector que es una especie de fototubo encargado de transformar la señal luminosa en una señal eléctrica; y, por último, del sistema que se ocupa de las medidas de la absorción, una vez que la misma haya sido previamente amplificada, es decir, se trata de un conversor analógico o

digital. Los métodos espectroscópicos atómicos y moleculares figuran entre los métodos analíticos instrumentales más utilizados.

El contenido total de carbohidratos de medios líquidos, extractos, alimentos líquidos puede ser determinado como azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados, dando un color naranja muy estable cuando reaccionan con fenol y en presencia de ácido sulfúrico concentrado. La intensidad del color naranja es proporcional a la cantidad total de carbohidratos presente. Esta absorbancia puede ser medida a 492 nm y la concentración total de carbohidratos de las soluciones problema puede ser medida con respecto a una curva estándar preparada. Se pueden usar dos soluciones estándar; de glucosa y fructosa, cada una a 400 µg / ml. Se deben preparar soluciones de glucosa o fructosa que deben contener 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 µg / ml del azúcar seleccionado (glucosa o fructosa) para la curva.

### **4.3. LOS ANTIPASTOS**

Los antipastos (en italiano “antes de la pasta del plato principal”), son alimentos que sirven como entradas, originarios de la cocina italiana por tradición pero se han extendido por todo el mundo con gran acogida, integrando productos autóctonos de cada región. En la actualidad son comercializados como conservas de alimentos, en frascos o enlatados, se diferencian de los encurtidos de vegetales, principalmente porque están acompañados de algún tipo de carne y utilizan diversos conservantes incluidas hierbas o especies que ayudan a preservar sus diferentes componentes que han sido macerados y homogenizados ([www.wisegEEK.com/what-is-antipasti.htm](http://www.wisegEEK.com/what-is-antipasti.htm)).

En otras palabras, los antipastos son una mezcla de alguna carne con alimentos como vegetales, hierbas, especies, salsas, encurtidos y/o ensaladas que son macerados y conservados en vinagre o salmueras. Generalmente están hechos con carnes rojas, embutidos, productos de la pesca como el atún, el salmón o crustáceos. Es muy común ver antipastos con tomate, berenjenas, pepinillo, pimientos asados, ajíes en vinagre, también algunas aceitunas negras y verdes, anchoas, cebollines en conserva, y algunos quesos (Olaya J. 2002).

### **4.4. ANÁLISIS SENSORIAL**

El análisis sensorial de alimentos es una evaluación por medio de los sentidos. El papel fundamental y las decisiones las toman los jueces, quienes por lo general son personas entrenadas y capacitadas, con un gran

desarrollo de percepción en sus sentidos. Los jueces, se pueden clasificar en expertos, entrenados y semientrenados; de acuerdo a las exigencias de las pruebas sensoriales de cada producto dispuesto para análisis. Las pruebas sensoriales son las muestras a las que cada uno de los jueces debe hacer su respectiva "cata". Estas se dividen en dos: pruebas afectivas y pruebas discriminativas que se deben realizar en un laboratorio de análisis adecuado con buena iluminación, ventilación y dotado de todos los elementos necesarios para cada prueba. Además se debe tener en cuenta el número de jueces, un buen espacio para la deliberación del panel, donde se reunirán los jueces y el orientador para discutir las respuestas obtenidas de dichas pruebas y dar a conocer el resultado del análisis del producto (Anzaldúa M, 2002).

Generalmente los análisis sensoriales comprenden cómo capta el individuo el producto con sus cinco sentidos, percibiendo características como olor, aroma, gusto, sabor, textura, color, palatabilidad, entre otros. Esta propiedad de los alimentos es muy compleja, ya que combina tres propiedades: olor, aroma, y gusto; por lo tanto su medición y apreciación son más complejas que las de cada propiedad por separado. El sabor es lo que diferencia un alimento de otro, ya que si se prueba un alimento con los ojos cerrados y la nariz tapada, solamente se podrá juzgar si es dulce, salado, amargo o ácido. En cambio, en cuanto se perciba el olor, se podrá decir de qué alimento se trata.

El sabor es una propiedad química que involucra la detección de estímulos disueltos en agua aceite o saliva por las papilas gustativas, localizadas en la superficie de la lengua, en la mucosa del paladar y en el área de la garganta. Estas papilas se dividen en 4 grupos, cada uno sensible a los cuatro sabores o gustos:

- Papilasiformes: Localizadas en la punta de la lengua sensible al sabor dulce.
- Fungiformes: Localizada en los laterales inferiores de la lengua, detectan el sabor salado.
- Coraliformes: Localizadas en los laterales posteriores de la lengua, sensible al sabor ácido.
- Caliciformes: Localizadas en la parte posterior de la cavidad bucal detectan sabor amargo.

#### **4.5. ANÁLISIS PROXIMAL**

El propósito principal de un análisis proximal es determinar, en un alimento, el contenido de humedad, grasa, proteína, fibra, cenizas y carbohidratos. Estos procedimientos revelan el valor nutricional de un producto y como puede ser combinado de la mejor forma con otras materias primas para

alcanzar el nivel deseado de los distintos componentes de una dieta. Es también un excelente procedimiento para realizar control de calidad y determinar si los productos terminados alcanzan los estándares establecidos por los productores y consumidores.

#### **4.5.1. Determinación de humedad**

**MÉTODO POR SECADO:** Se calienta la muestra bajo condiciones establecidas y se hace uso de la pérdida de peso para calcular el contenido de humedad. Porcentaje de Humedad: NTC 1683 – 1981 – 10 – 07, Determinación en estufa o mufla.

#### **4.5.2. Determinación de grasa**

**MÉTODO DE EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES:** El contenido en lípidos libres, los cuales consisten fundamentalmente de grasas neutras (triglicéridos) y de ácidos grasos libres, se puede determinar en forma conveniente en los alimentos por extracción del material seco y reducido a polvo con una determinada cantidad de éter de petróleo o éter dietílico en un aparato de extracción continua. Se dispone de éstos en numerosos diseños, pero básicamente son de dos tipos. El tipo Bolton o Bailey-Walker da una extracción continua debido al goteo del disolvente que se condensa sobre la muestra contenida en un dedal que es un filtro poroso, alrededor del cual pasa el vapor caliente del disolvente. El tipo Soxhlet da una extracción intermitente con un exceso de disolvente reciente condensado. Porcentaje de Grasas: NTC 1962 – 1981 – 10 – 01, Método de Soxhlet

#### **4.5.3. Determinación de cenizas**

La determinación de cenizas es referida como el análisis de residuos inorgánicos que quedan después de la ignición u oxidación completa de la materia orgánica de un alimento. La técnica consiste en quemar la muestra en una mufla para eliminar todo el material orgánico. La ceniza remanente es el residuo inorgánico y la medición de la ceniza total es útil en el análisis de alimentos, ya que se pueden determinar diversos minerales contenidos en la muestra.

#### **4.5.4. Determinación de proteínas**

**METODO DE KJELDAHL:** con este procedimiento se mide el contenido de nitrógeno de una muestra con el que posteriormente se puede calcular el contenido de proteína, presuponiendo una proporción entre ellos para el alimento específico que está siendo analizado. Esta técnica se divide básicamente, en tres partes: 1) digestión, 2) destilación, 3) valoración. En la etapa de digestión, el nitrógeno orgánico es convertido en amonio, en

presencia de un catalizador, a aproximadamente 370°C. En la etapa de destilación, se alcaliniza con NaOH la muestra digerida y el nitrógeno se desprende en forma de NH<sub>3</sub>, por destilación. Este NH<sub>3</sub> se atrapa en una disolución de ácido bórico. La cantidad de nitrógeno amónico en esta disolución se cuantifica mediante el análisis volumétrico frente a una disolución de HCl valorada. Se lleva a cabo el conjunto del análisis sobre una muestra en blanco y se substraen, de cada una de las determinaciones, el volumen de HCl valorante necesario para este blanco. Porcentaje de Proteínas: NTC 1556C – 10 - 1 89/80, Método Kjeldhal.

#### **4.5.5. Determinación de fibra dietaria total**

METODO ENZIMATICO- GRAVIMETRICO (Prosky): Este ensayo determina el contenido de fibra dietaria total de alimentos usando una combinación de métodos gravimétricos y enzimáticos. Muestras secas, libres de grasa son gelatinizadas con alfa-amilasa termoestable y posteriormente digeridas enzimáticamente con proteasa y aminoglucosidasa para remover la proteína y almidón presente en la muestra. El etanol es adicionado para precipitar la fibra dietaria soluble. El residuo es filtrado y lavado con etanol y acetona. Después de secado, el residuo es pesado. La mitad de las muestras son analizadas para determinar proteínas y cenizas. La fibra dietaria total es el peso del residuo menos el peso de la proteína y ceniza. Porcentaje de Fibra Dietaria: NTC 1556C – 10 - 1 89/80, Método Kjeldhaj

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. MATERIAL FÚNGICO

El material fúngico fue sembrado, cultivado y cosechado por el autor. Para la obtención de cuerpos fructíferos se realizó una Fermentación en Estado Sólido (FES). El sustrato contenía como fuente de carbono y base principal madera (aserrín y viruta de eucalipto) 83% y salvado de trigo como fuente de nitrógeno 15%, mezclado con azúcar morena 1% y yeso blanco 1% como agentes enriquecedores del medio, que sirven para optimizar el proceso metabólico, ajustar el pH del sustrato y facilitar su crecimiento. El contenido de agua de cada bloque fue del 65 % frente a un 35 % de sustrato seco. El sustrato fue empacado en bolsas de polipropileno calibre 3 de 25 cm por 45 cm perfectamente selladas, una vez empacado este sustrato en las bolsas de polipropileno se denomina Bloque. En la tabla 3. está especificada la composición del sustrato para una mezcla con la que se elaboran 11 bloques de 1300 g cada uno (en base húmeda). Se elaboran mezclas de 14300 g de sustrato (en base húmeda) debido a que la autoclave con la que se cuenta tiene la capacidad para 11 bloques. Debido a que se requerían mínimo 10 Kg de Shiitake para el desarrollo de este trabajo, fue necesario realizar 4 mezclas, para un total de 34 bloques.

Tabla 3. Formulación de sustrato para una mezcla de 14,3 Kg de sustrato (Fuente. El autor)

<b>FORMULACION DE 14300g DE SUSTRATO, PARA 11 BLOQUES DE 1300g CADA UNO</b>		
MATERIA PRIMA	PORCENTAJE %	PESO (g)
Agua	65	9295
Aserrín	29,05	4154.15
Salvado de trigo	5,25	750.75
Azúcar	0,35	50.05
Yeso	0,35	50.05

Los bloques fueron llevados a una autoclave, que opera con gas natural y cuyo vapor se mantuvo a una temperatura de 121°C durante dos horas. Después de esterilizados, los bloques fueron trasladados al área de Inoculación. La inoculación es uno de los puntos más críticos del proceso debido al riesgo permanente de contaminación, por lo que se realizó en un

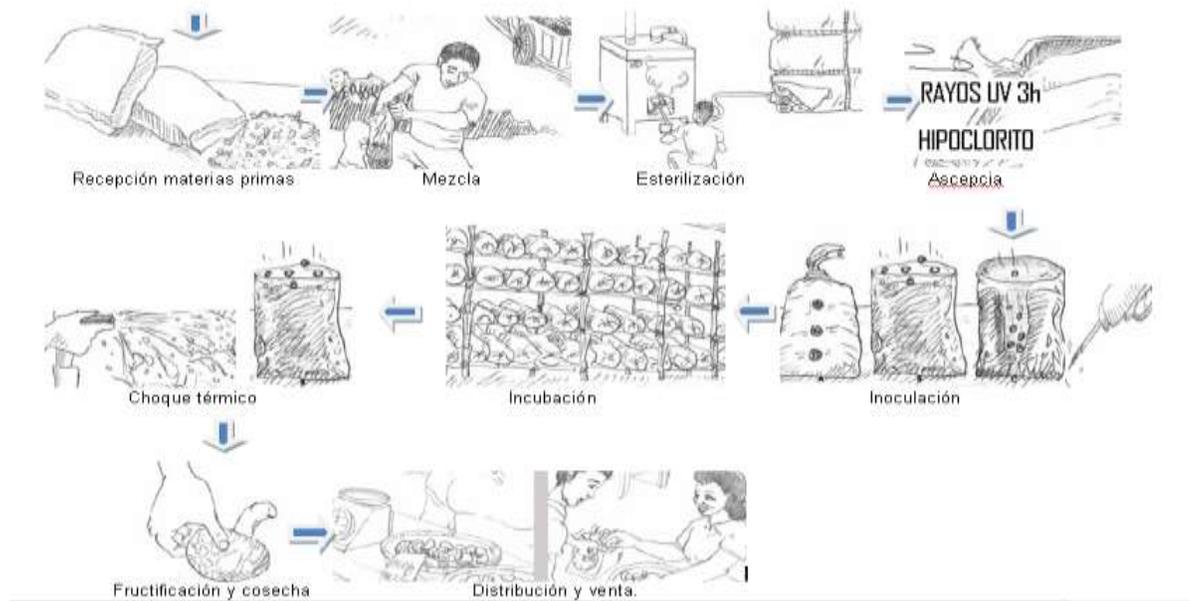
espacio totalmente estéril bajo procedimientos de laboratorio, dentro de los cuales se incluye aplicación de formol al 3 %, de hipoclorito de sodio al 10 % y luz ultravioleta por 5 horas para la esterilización del ambiente (Fung, 2006), además, implementos de laboratorio como batas, gorros, tapabocas y guantes previamente esterilizados. Seguido de la inoculación, los bloques fueron llevados a los cuartos de incubación (Przybylowicz y Donoghue, 1990; Stamets, 2000).

El proceso de incubación es el más largo de todos, tomó aproximadamente 100 días. Se realizó en condiciones de oscuridad absoluta, total asepsia, con una temperatura de 25°C (en el interior de los bloques) y una humedad relativa superior a 65% constante durante los 100 días de incubación, la concentración de CO<sub>2</sub> en el aire debe ser superior a 10,000 ppm y la intensidad de luz debe estar entre 50-100 lux (Przybylowicz y Donoghue, 1990; Stamets, 2000).. El fundamento de este proceso es que la semilla de Shiitake colonice el bloque y se incuba en el sustrato. Una vez colonizado e incubado, el bloque se sometió a un choque térmico. Este choque de temperatura se realizó con el fin de inducir el crecimiento de los hongos de manera controlada. Consiste en bajar la temperatura hasta que alcance los 13°C. La metodología que se utiliza es retirar la bolsa de polipropileno y sumergir los bloques en agua previamente acondicionada para este fin (temperatura de 10°C aproximadamente) durante 30 a 300 minutos dependiendo del número de cosechas que haya dado el mismo bloque (Przybylowicz y Donoghue, 1990; Stamets, 2000).

Finalmente los bloques fueron ubicados en el área de Fructificación. Este proceso consiste en el crecimiento de los hongos sobre el bloque colonizado por el micelio y su posterior cosecha. El crecimiento del hongo requiere una iluminación tenue controlada entre 500-2000 lux a 370-420 nm, una temperatura entre 16 y 18°C y una humedad relativa superior a 85%, la concentración de CO<sub>2</sub> en el aire debe ser inferior a 1000 ppm por lo cual se deben realizar de 4 a 8 cambios de aire por hora (Przybylowicz y Donoghue, 1990; Stamets, 2000).

La figura 7 muestra de forma resumida un esquema del método de producción desde la mezcla del sustrato hasta la cosecha de los cuerpos fructíferos.

Figura 7. Resumen grafico del método de cultivo de Shiitake en troncos artificiales (Mushworld, 2005).



La cosecha se realizó manualmente con tijeras y los hongos fueron depositados en canastas plásticas donde se efectuó el corte del estípote. Los estípites fueron pesados y empacados en canastillas plásticas para ser refrigerados a 4°C hasta ser llevados al laboratorio en donde se realizó tanto la extracción de los polisacáridos como la elaboración del antipasto.

La eficiencia biológica indica qué tanto rendimiento se presenta de Shiitake fresco en peso por cada kilogramo de sustrato en base seca sembrado.

Figura 8. Shiitake a punto de ser cosechado (Fuente. El autor)



## 5.2. EXTRACCIÓN DE POLISACÁRIDOS

Para la extracción de polisacáridos se utilizaron 397,4 g de Shiitake fresco, separando los píleos (283,7 g) de los estípites (113,7 g). Se pica el material y se sometió a una extracción utilizando agua caliente a 90°C por triplicado y por separado. Posteriormente se filtraron al vacío y se concentraron por evaporación, obteniéndose una solución de 65 ml de y 95 ml respectivamente. Seguidamente se hizo una purificación con etanol frío, usando 420 ml de etanol para la extracción de píleos y 287 ml de etanol para la extracción de estípites. Nuevamente se filtro al vacío para obtener el material remanente. Este producto fue utilizado para la cuantificación de carbohidratos totales con el método de Dubois y para la adición a un antipasto (Figuras 9-15).

Esquema 2. Metodología para la extracción de polisacáridos

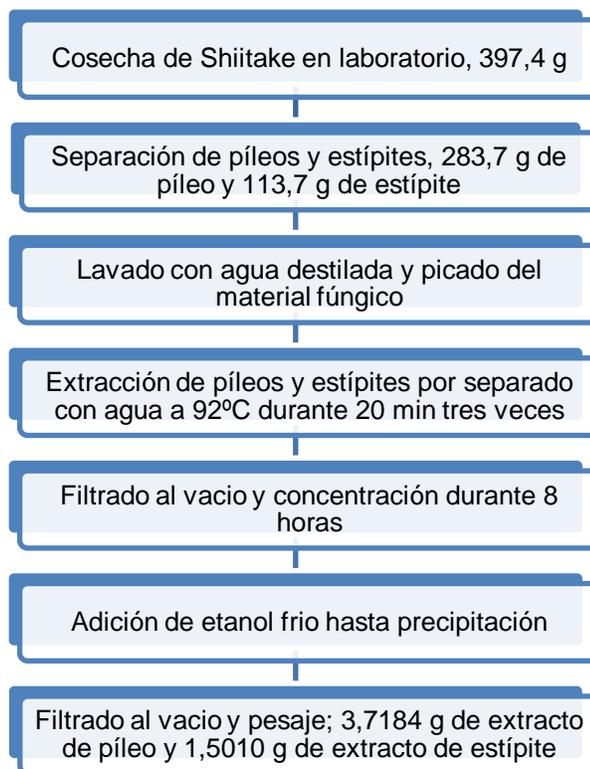


Figura 9. Shiitake utilizado para la extracción de polisacáridos



Figura 10. Material Fúngico picado sumergido en agua caliente.



Figura 11. Filtrado al vacío



Figura 12. Extracto concentrado



Figura 13. Purificación con etanol frío.



Figura 14. Filtrado al vacío, obtención del extracto



Figura 15. Extracto final de polisacáridos



### 5.3. MÉTODO DE DUBOIS PARA DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS TOTALES

Para hacer la grafica estándar se hicieron soluciones de glucosa grado analito por separado, se disolvieron de 4 mg en 10 ml de agua destilada y se almacenaron a 4°C. Además se hicieron soluciones en tanto de pileo y como de estípide por separado, cada una con 2,2 mg de material fúngico con 50 ml de agua destilada. El blanco se preparo tomando 1 ml de agua destilada.

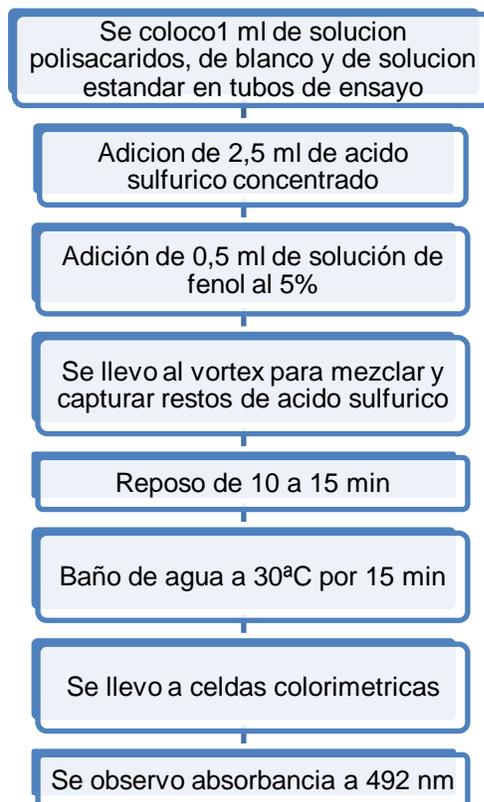
Las muestras se prepararon como se muestra en la tabla 4 de acuerdo al porcentaje de concentración, por ejemplo, si es al 5%, se añaden 50 µl de muestra más 950 µl de agua destilada, por ejemplo, si es al 10%, se añaden 100 µl de muestra más 900 µl de agua destilada. En el esquema 3 se muestra de forma detallada el procedimiento para la determinación de carbohidratos seguido en este trabajo.

Tabla 4. Concentraciones empleadas para la realización de la curva de calibración para carbohidratos por el método de Dubois.

Nº Dilución	Blanco	2	3	4	5	6	7
µl Stock Glucosa	0	25	50	75	100	125	150
µl de agua destilada	1000	975	950	925	900	875	850
[ ] de glucosa mg / l	0	10	20	30	40	50	60

Los reactivos usados fueron: Solución de fenol al 5% (p/v) y Acido sulfúrico concentrado al 95%.

Esquema 3. Procedimiento para el método de Dubois con la modificación de Rojas D, 2006.



Este procedimiento utiliza la técnica de Dubois, usando la modificación propuesta por Diego Fernando Rojas en su tesis titulada Validación y estandarización de métodos analíticos para la cuantificación de intrapolisacáridos, exopolisacáridos y ácidos ganodericos a partir del cultivo sumergido de *Ganoderma lucidum*

Figura 16. Concentraciones empleadas para la realización de la curva de calibración para carbohidratos por el método de Dubois



Figura 17. Equipo Vortex para la reacción entre el fenol el ácido sulfúrico y las soluciones estándar de glucosa, fructosa y los analitos



Figura 20. Equipo lector de absorbancia



#### 5.4. PREPARACIÓN DEL ANTIPASTO

Se prepararon dos antipastos, uno con los estípites y otro con los píleos. Los antipastos contenían los siguientes productos obtenidos en el comercio: como fuente proteica además del material fúngico se adiciono atún en lomos, y como fuente vegetal pasta de tomate, pepinillos y champiñones encurtidos, pimentón, jengibre y orégano en polvo y aceite de oliva.

Como se ha comentado en diferentes ocasiones en el presente trabajo, los estípites de *Lentinula edodes* tienen una cualidad fibrosa por la que no son aceptados generalmente por los compradores; por esta razón, fue necesario someterles a escaldamiento con agua, sal y ácido acético durante 8 minutos a 90 °C. Para determinar este tiempo se hicieron pruebas con píleos con diferentes concentraciones de ácido acético y diferentes tiempos de escaldado, observando la dureza como indicador de la propiedad fibrosa en cada tratamiento, hasta obtener una dureza aceptable. El extracto soluble del escaldamiento del Shiitake fue mezclado con la pasta de tomate, los pimentones y estípites fueron mezclados con los pepinillos, los champiñones, el orégano en polvo, el jengibre en polvo, el atún y el aceite de oliva, y luego fueron envasados 500 g de antipasto en frascos esterilizados.

Por lo contrario, para la preparación del antipasto A (elaborado con los píleos del Shiitake), esta parte de la fructificación se caracteriza por ser bastante suave y blanda, puede ser consumida sin ningún tipo de cocción, por lo tanto, solo se salteó con aceite de oliva y un poco de sal durante cinco minutos y luego mezclados con los demás ingredientes y envasados 500 g de antipasto en frascos esterilizados.

Cada frasco de antipasto contiene aproximadamente 200 gr de pasta de tomate y 300 g de la mezcla de ingredientes, de los cuales aproximadamente el 40% es Shiitake bien sea los estípites o el píleo. Posteriormente se hizo un escaldamiento en baño maría a los frascos que contenían el antipasto a 92°C

por una hora, esto para reducir la actividad microbiana y prolongar la vida del producto (Esquema 4).

Esquema 4. Metodología para la elaboración de los antipastos



Figura 21. Esterilización de frascos y herramientas de trabajo



Figura 22. Componentes del antipasto listos para envasar y mezclar



Figura 23. Envasado de pasta de tomate 40% del volumen del frasco y de la mezcla



Figura 24. Escaldado de pasteurización a 92°C



Figura 25. Antipastos listos para ser consumidos



## 5.5. ANÁLISIS SENSORIAL

Se realizaron degustaciones a 20 personas mayores de 23 años de ambos sexos, 10 mujeres y 10 hombres, quienes diligenciaron un formato de preguntas evaluativas y comparativas respecto al sabor y a la textura de los dos antipastos. En el anexo 1.se encuentra el modelo de la encuesta aplicada.

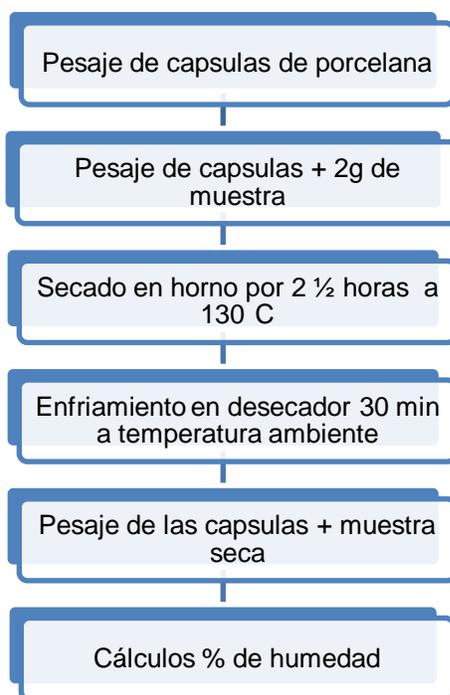
## 5.6. ANÁLISIS PROXIMAL

Se desarrollo en los laboratorios del ICTA en el laboratorio de Análisis Fisicoquímicos.

### 5.6.1. Determinación de Humedad

Se tararon tres capsulas de porcelana vacías secas; posteriormente se pesaron las capsulas más 2 g de muestra y se registraron los pesos correspondientes. Seguidamente las capsulas con muestra fueron sometidas a secado en horno a 100°C durante 4 horas hasta peso constante. Después de este tiempo se llevaron al desecador para enfriamiento durante 30 minutos. Se pesaron las muestras y se realizaron los cálculos correspondientes (Esquema 5).

Esquema 5. Metodología para la determinación de Humedad



### 5.6.2. Determinación de Grasa

Se tomó la muestra seca y se envolvió en un papel filtro cualitativo que se introdujo en un dedal de vidrio, se adicionaron 50 ml de bencina de petróleo en un vaso seco previamente tarado y se colocó en un equipo de extracción goldfish durante dos horas. Después de este tiempo se recuperó parte del disolvente llevando posteriormente el vaso a un horno durante 20 minutos a 108°C, con el objeto de que se evaporara el líquido remanente, luego se

enfrió en el desecador a temperatura ambiente y se peso el residuo para por diferencia establecer el peso del extracto etéreo (Esquema 6).

Esquema 6. Metodología para la determinación de Grasa

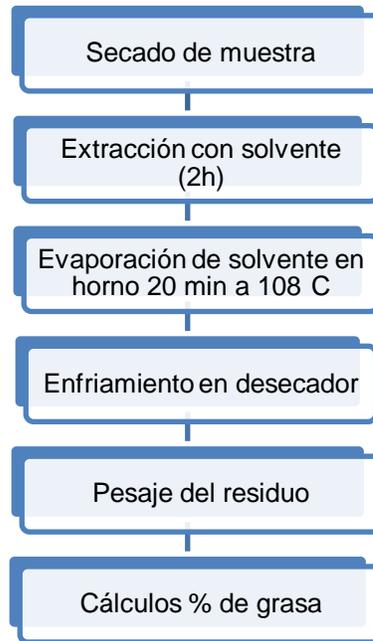


Figura 26. Muestra seca para determinación de grasas



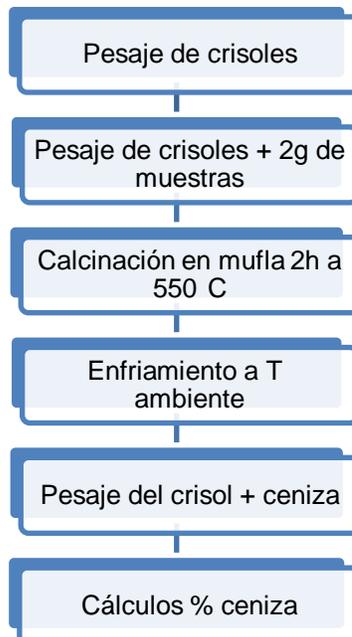
Figura 27. Residuo de grasas



### 5.6.3. Determinación de Ceniza

Se pesaron tres crisoles secos seguidamente se pesaron estos crisoles más 2 g de muestra cada uno. Se sometieron a calcinación en una mufla de 3 a 4 horas a 560°C (peso constante). Transcurrido este tiempo, se enfriaron los crisoles más cenizas en un desecador y se pesaron para realizar los cálculos correspondientes (Esquema 7).

Esquema 7. Metodología para determinación de ceniza



#### 5.6.4. Determinación de Proteínas

Se pesaron 0,5 g de muestra por duplicado en un papel libre de ceniza, en el cual se envolvió la muestra y se introdujo en un balón Kjeldahl, junto con 10ml de  $H_2SO_4$  y 3 g de catalizador ( $K_2SO_4$  y  $CuSO_4$ ). Se realizó la digestión hasta la aparición de un color verde esmeralda, se dejó enfriar el balón y se sometió a una destilación (adición de soda con el fin de neutralizar la acción del ácido sulfúrico sobrante y favorecer la liberación del amoníaco en forma de  $NH_4OH$ , el cual fue recibido en el erlenmeyer con la solución de ácido bórico más indicador tachiro). Posteriormente se realizó una titulación con HCL 0,101N para cuantificar la cantidad de nitrógeno amónico en la muestra y el blanco sometido al mismo procedimiento (Esquema 8).

Esquema 8. Metodología para la determinación de proteínas



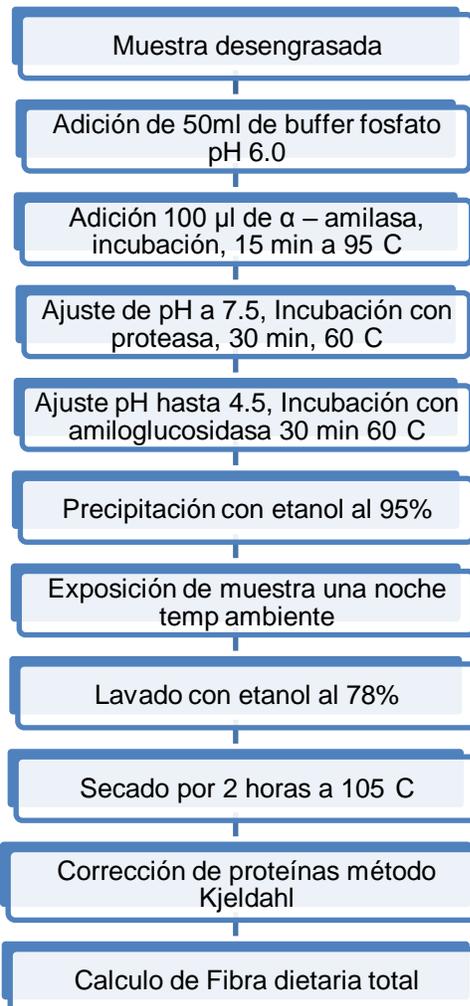
#### 5.6.5. Determinación de Fibra Dietaría Total

Se pesaron 0,5 g de muestra desengrasada y se introdujo en un vaso junto con 50ml de Buffer fosfato pH 6 y 100  $\mu$ l de alfa-amilasa termoestable sometiéndose a una incubación a 95°C por 15 minutos. Seguidamente se enfrió y se ajustó el pH a 7.5 y se adicionó 100  $\mu$ l de proteasa incubándose durante 30min a 60°C. Posteriormente se ajusto el pH a 4.5 para adicionar 100  $\mu$ l de aminoglucosidasa y se incubó a la misma temperatura por 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se adicionaron cuatro partes de etanol al 95% para precipitar la fibra soluble con una concentración del etanol del 78% dejándose a temperatura ambiente durante una noche. Después de este tiempo se filtró el residuo sobre un crisol Gooch con celita previamente

secado y pesado. A continuación se lavó el residuo con etanol al 78%; se secó en un horno a 105°C por 2 horas y se enfrió en el desecador y se pesó.

Se realizaron correcciones de proteína por el método Kjeldahl y cenizas por calcinación (2 horas a 550°C) con el fin de restárselo al residuo obtenido y sacar los cálculos de fibra dietaria (Esquema 9).

Esquema 9. Metodología para la determinación de fibra



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. MATERIAL FÚNGICO

El material fúngico fue sembrado, cultivado y cosechado por el autor. Para desarrollo del presente trabajo se utilizaron aproximadamente 10 Kg de Shiitake (*Lentinula edodes*) fresco, para los cuales fueron necesarios 34 bloques de 1300 g (en base húmeda), los cuales mostraron una eficiencia biológica entre 60 y 70 % después de tres oleadas de fructificación.

### 6.2. EXTRACCIÓN DE POLISACÁRIDOS

La extracción de polisacáridos de píleos y estípites se realizó por separado, dando los resultados mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de la extracción de polisacáridos

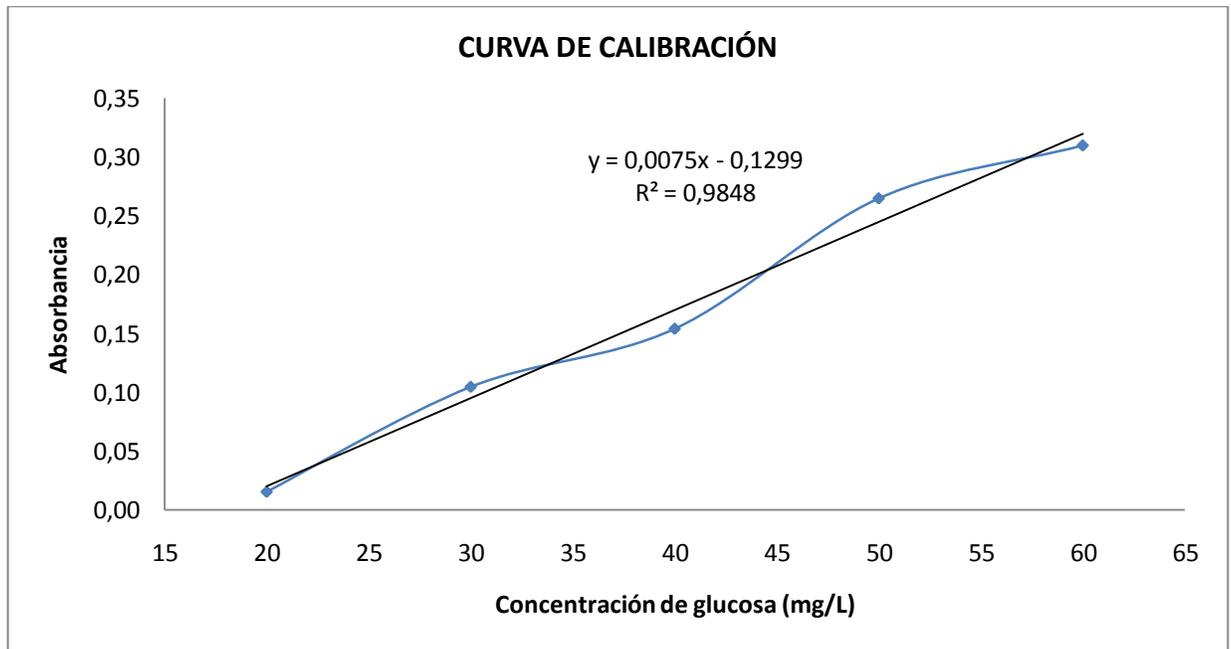
MATERIAL	FRESCO	EXTRACTO	RENDIMIENTO
PÍLEO	283,7 g	3,7184 g	0,131 g extracto / g píleo fresco
ESTÍPITE	113,7 g	1,5010 g	0,132 g extracto / g estípite fresco

En lo referente al aporte de los polisacáridos como compuestos bioactivos, sería el mismo si se empleara el píleo (0.131g/g) o el estípite (0.132g/g) de la fructificación. Esto es algo positivo para el propósito de este trabajo, dado que se confirma lo reportado por Fung en 2006, al afirmar que el estípite del *Lentinula edodes* también presenta actividad biológica en una proporción significativa. Con este resultado podemos recomendar a los fungicultores el uso de los estípites con fines nutricionales y terapéuticos para la preparación de alimentos funcionales.

### 6.3. MÉTODO DE DUBOIS PARA DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS TOTALES

La determinación de los carbohidratos totales se realizó con el fin de determinar si el contenido es igual en el estípite y el píleo. La curva de calibración empleando el método de Dubois se muestra a continuación:

Figura 28. Curva de calibración para la determinación de carbohidratos totales tanto de píleo como de estípite de *Lentinula edodes*



Se leyeron las absorbancias de las soluciones de los extractos del estípite y del píleo de 2,2 mg en 50 ml de agua destilada (cada uno), con valores de 0,1012 y -0,0092 respectivamente. Al reemplazar estos datos en la línea de tendencia para la curva de calibración les correspondieron concentraciones de 29,3mg/L para el estípite y 16,1mg/L para el píleo.

#### 6.4. DESARROLLO DEL ANTIPASTO

En el antipasto encontramos un aumento valor proteico, dado que aparte del atún, el hongo Shiitake tiene reportado un 17% de proteína por Crisand y Sands (1978) citados por Miles y Chang (1997). Aparte de lo anterior, podemos concluir que el antipasto puede ser ofrecido como alimento funcional nutraceutico, dado que puede ser incluido dentro de la dieta diaria, además, posee gran valor nutricional.

Los fungicultores pueden preparar antipastos utilizando vegetales que se encuentren en su región, que sean de fácil adquisición, y que presenten estabilidad en los diferentes periodos del año. Los antipastos son alimentos etéreos, su elaboración depende de los gustos gastronómicos y culinarios del consumidor, además de la disponibilidad y precio de los diferentes componentes que pueda llevar. Revisando recetas de cocina de diferentes países, encontramos que los antipastos generalmente se preparan utilizando los vegetales autóctonos de cada región y que tradicionalmente han sido utilizados por sus culturas alimenticias y culinarias. De acuerdo a lo anterior,

es posible que cada fungicultor pruebe con diferentes ingredientes y pruebe la concentración de estos en el producto que desea obtener, teniendo en cuenta los gustos de los clientes para sus antipastos y el mercado en el que quiera ofrecer sus productos.

## 6.5. ANÁLISIS SENSORIAL

El análisis sensorial realizado a los dos antipastos puso de manifiesto que hubo gran acogida por el sabor y la textura de los antipastos; ya que ninguno de los panelistas manifestó mal sabor o textura desagradable, por el contrario fueron del agrado de todos los integrantes del panel.

Para un mejor análisis a continuación se presentan los resultados y discusión de los mismos de manera individual para cada una de las preguntas formuladas en la encuesta.

Tabla 6. Resultados obtenidos frente a la calidad del sabor de los antipastos

	ANTIPASTO A (píleos)		ANTIPASTO B (estípites)	
	No. Panelistas	%	No. Panelistas	%
Agradable	15	75	14	70
Regular	2	10	4	20
Aceptable	3	15	2	10

En la tabla anterior se ve claramente que el sabor del Antipasto A que contenía los píleos del Shiitake presentó un 75% de aceptabilidad en cuanto al sabor frente a un 70% del Antipasto B elaborado con los estípites, lo cual pone de manifiesto que si es totalmente viable el empleo de éstos como componente adicional en un antipasto, lo que se convierte en una manera de aprovechamiento de esta parte de la seta que hasta el presente forma parte de los desechos propios del cultivo de Shiitake.

Tabla 7. Resultados de la evaluación de acidez, dulzura o salinidad de los antipastos.

	ANTIPASTO A (píleos)		ANTIPASTO B (estípites)	
	No. Panelistas	%	No. Panelistas	%
Acido	7	35	9	45
Dulce	4	20	4	20
Salado	5	25	3	15
Ninguno	4	20	4	20

Con respecto a los resultados anteriores se presenta una apreciación bastante similar entre las dos preparaciones. Adicionalmente, no se

encontraron diferencias marcadas de sabor entre los dos antipastos ya que los % de respuestas frente a diferencia en el sabor son de 60% frente a 40%

Tabla 8. Resultados frente a la presencia de textura fibrosa en los antipastos

	ANTIPASTO A (píleos)		ANTIPASTO B (estípites)	
	No. panelistas	%	No. panelistas	%
SI	3	15	7	35
NO	17	85	13	65

Para los objetivos del presente trabajo esta era la pregunta mas relevante, dado que el rechazo en el consumo del estípite es precisamente su consistencia fibrosa. La apreciación dada por los panelistas permite ver que la presencia dentro del antipasto de los estípites previamente escaldados es aceptada en gran medida y la inclusión de ellos da como resultado un antipasto agradable de consumir. Es así como, si bien la textura para el antipasto B presentó una mayor sensación fibrosa (35%) que en A (15%), este hecho no afectó para nada la palatabilidad del mismo. Los resultados indican que su utilización en la preparación de esta clase de alimentos es totalmente viable, convirtiéndose en una solución para las pérdidas que hasta el presente aquejan a los fungicultores colombianos.

## 6.6. ANÁLISIS PROXIMAL

Observando los datos obtenidos (Tabla 9) se ve claramente que existen diferencias en la composición nutricional del antipasto A y del antipasto B, siendo más notable en lo referente al % de humedad..

Esta diferencia puede ser debida al proceso previo realizado al estípite puesto que, como se mencionó con anterioridad en el presente trabajo, los estípites de *Lentinula edodes* presentan una consistencia fibrosa, característica responsable de que no sean aceptados por los compradores y consumidores; razón por la cual para hacerlos más fácilmente comestibles fue necesario someterlos a escaldamiento con agua, sal y ácido acético durante 8 minutos. En contraste, para la preparación del antipasto A (elaborado con los píleos del Shiitake), al ser esta parte de la fructificación bastante suave y blanda, de manera que puede ser consumida sin ningún tipo de cocción, el proceso de escaldado se obvió y solo se salteó con aceite de oliva y sal durante cinco minutos.

Por lo anterior, el antipasto preparado con los estípites del Shiitake contiene un mayor porcentaje de agua, ya que durante el escaldado el agua penetra dentro de los tejidos del producto, lo cual está en concordancia con el resultado obtenido para el contenido de humedad.

Tabla 9. Análisis proximal antipasto A (píleos) y antipasto B (estípites)

	<b>ANTIPASTO A</b>	<b>ANTIPASTO B</b>
Humedad	79,6 %	84,2 %
Grasas	7,6 %	1,5 %
Proteínas	4,5 %	3,6 %
Cenizas	1,8 %	2,1 %
Fibra	0,9 %	1,3 %
Carbohidratos Totales	5,6 %	7,6 %

En cuanto a las diferencias presentadas en proteínas, cenizas y fibra estas pueden ser debidas al método de preparación dado que las verduras, si bien proceden del mismo lote, se trocearon y mezclaron previamente, lo que puede llevar a que en la porción adicionada a cada frasco haya una variación en la composición de la mezcla vegetal, lo que incide directamente en el contenido de los compuestos analizados. Cabe aquí anotar, que como recomendación para trabajos posteriores en los cuales se quiera determinar con exactitud la composición proximal, se debe realizar la adición de todos los componentes por separado, con lo cual se asegura una homogeneidad en el contenido de los mismos en la preparación y por lo tanto su real contribución a los valores de los parámetros del análisis proximal.

Referente al contenido de carbohidratos, éstos presentan una diferencia significativa (píleo 5,6 %, estípite 7.6%) que está totalmente de acuerdo con lo esperado, puesto que según la determinación del contenido de carbohidratos por el método de Dubois el estípite presenta una mayor proporción de estos metabolitos. Este resultado es por demás importante puesto que son los polisacáridos del Shiitake los fungimetabolitos que presentan bioacción y por lo tanto el antipasto elaborado con el estípite proporcionaría un alimento con mayor valor nutraceútico (características nutricionales y metabolitos con acción beneficiosa para la salud).

De todo lo anteriormente expuesto se puede deducir con gran facilidad que el estípite del hongo comestible Shiitake se puede emplear, con un pequeño tratamiento previo, en la elaboración de alimentos funcionales. Esta aseveración se realiza con base en que, al adicionar el estípite del hongo no sólo se está aumentando el contenido de proteína total del alimento sino su calidad ya que la proteína fúngica posee todos los aminoácidos esenciales. No se debe dejar de lado el aporte de vitaminas, fibra y minerales que

también proporciona. A esto se debe aunar el aporte de polisacáridos con acciones antitumorales e inmunoestimuladores que convierten a la preparación elaborada con ellos en un verdadero alimento funcional.

## 7. CONCLUSIONES

Como principal conclusión de esta investigación se encuentra el hecho de que los estípite del Shiitake pueden ser empleados de manera exitosa para la elaboración de alimentos procesados, convirtiéndose en una buena oportunidad de negocio para los Fungicultores cultivadores de Shiitake con la elaboración de antipastos a partir del estípite de sus fructificaciones, debido a su fácil preparación, a su aceptación por los consumidores y a que este puede ser ofrecido como alimento funcional debido a su contenido de polisacáridos aportados por el hongo, ya que estos compuestos presentan actividad biológica inmunomoduladora y anticancerígena, Aunado a lo anterior se encuentra el valor agregado que los resultados obtenidos aporta, ya que lo que antes representaba una pérdida de entre el 15 y el 20 % para los fungicultores, ahora se puede describir como una materia prima de optima calidad para la preparación de un alimento funcional.

Así mismo es viable la elaboración de un antipasto no sólo con los estípite del shiitake, si no en general, con cualquier parte de la fructificación del *Lentinula edodes* incluyendo los hongos con malformaciones o con un tamaño fuera del rango de comercialización, debido a su fácil preparación, a que no se requiere de tecnología costosas o difícil de obtener, a que si se pasteuriza y se prepara en ambientes que cumplen con los requerimientos y normas impuestas por la ley, el antipasto en conserva es un alimento que puede ser conservado por largos periodos de tiempo, se estima que varios meses, sin que este se descomponga o pierda sus propiedades funcionales y de sabor.

El análisis sensorial demostró una gran aceptación del producto por parte de los panelistas, y se observó que no se percibe en el contenido del antipasto ningún componente con características fibrosas, de dureza, o de baja palatabilidad

## 8. RECOMENDACIONES

Para realizar un análisis proximal real y que pueda ser comparado frente a otros alimentos procesados se debe adicionar a la preparación los componentes de manera individual para garantizar que el contenido de cada uno sea siempre el mismo.

Explorar la posibilidad de la elaboración de antipastos de Orellanas (*Pleurotus* sp.) y otros hongos comestibles y medicinales, así como también hacer salsas y aderezos con todas las partes de la fructificación que no puedan ser comercializadas, aprovechando que son productos muy valiosos tanto nutricional como medicinalmente.

## 9. BIBLIOGRAFIA

Anzaldúa M. (2002) *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España.

Bensky, D. & Gamble, A. (1993). *Chinese Materia Medica*. 2nd ed. Eastland Press, Seattle.

Borchers, A.T., Stern, J.S. Hackman, R.M., Keen, C.L. and Gershwin, H.E. (1999). Mushrooms, tumors and immunity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **221**, 281-293.

Carluccio, A. (2003). *Complete Mushroom Book*. Quadrille, Singapore.

Chang, S-T & Miles, P.G. (2004). *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect and Environmental Impact*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton.

Chang, S-T. (1999). *Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st Century: non-green revolution*. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 1-8.

Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. (1970). *Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumour activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing, an edible mushroom*. **Cancer Research**, 30, 2776-2781.

Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T. and Fukuoka, F. (1969). *Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing*. *Nature* 222, 687-688.

Feng, W., Nagai, J. and Ikekawa, T. (2001). *A clinical pilot study of EEM for advanced cancer treatment with EEM for improvement of cachexia and immune function compared with MPA*. *Biotherapy* **15**, 691-696.

Fung, Y. (2006) *Evaluación de la actividad anticancerígena e inmunomoduladora del hongo *Lentinula edodes* Berk. Pegler (Shiitake) cultivado sobre residuos agroindustriales colombianos*. Universidad Nacional de Colombia

Hobbs, C. (1995). *Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing and culture*. Botanica Press, Santa Cruz, Calif.

Hobbs, C. (2000). *Medicinal value of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetideae)*. A literature review. *Int J Med Mushrooms*, 2, 287-302

- Ikekawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nankinishi, M. and Fukoka, F. (1969). *Antitumour activity of aqueous extracts of edible mushrooms*. *Cancer Research* **29**, 734-735.
- Ikikawa, T. (2000). *On biological activity of mushrooms*. *Biotherapy* **14**, 945-951.
- Ikekawa, T. (2001). *Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms in health care*. *Int J Med Mushrooms*, **3**, 291–298.
- Jones, K. (1995) “*Shiitake. The healing mushroom*”. Vermont. Healing Arts Press
- Kidd, P.M. (2000). *The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer therapy*. *Alternative Medicine Review* **5**, 4-27.
- Kosaka, A., Suga, T., & Yamashita, A. (1995). *Dose reductive effect of lentinan on the epirubicin therapy for breast cancer patients*. *International Journal of Immunotherapy*, **11**(4), 143-151.
- Koumoto, K., Kimura, T., Kobayashi, H., Sakurai, K., & Shinkai, S. (2001) *Chemical Modification of Curdlan to Induce an Interaction with Poly(C)*. *Chem.Lett*, **30**, 908–909.
- Maeda, Y. Y., & Chihara, G. (1973). *The effects of neonatal thymectomy on the antitumor activity of lentinan, carboxymethyl pacymaran and Zymosan and their effects on various immune response*. *Int. J. Cancer*, **11**, 153-161.
- Maeda, Y. Y, Hamuro J., & Chihara, G. (1971). *The mechanisms of action of anti-tumour polysaccharides. I. The effects of antilymphocyte serum on the anti-tumour activity of lentinan*. *Int. J. Cancer*, **8**, 41-46.
- Maeda, Y. Y., Watanabe, ST., Chihara, C., & Rokutanda, M. (1988). *Denaturation and renaturation of a  $\beta$ -1, 6; 1, 3-glucan, lentinan, associated with expression of T-cell-mediated responses*. *Cancer Res* , **48**, 671–675.
- Markova, M., Kussovski, V., Drandarska, I., Nikolaeva, N., & Radoucheva, T. (2003). *Protective activity of Lentinan in experimental tuberculosis*. *International Immunopharmacology*, **3**, 1557–1562.
- Markova, N., Kussovski, V., Radoucheva, T., Dilova, K., & Georgieva, N. (2002). *Effects of intraperitoneal and intranasal application of Lentinan on cellular response in rats*. *International Immunopharmacology*, **2**, 1641–1645.
- Mashiko, H. et al (1992) *A case of advanced Gastric cancer with liver metastasis completely responding to a combined immunochemotherapy whit UFT, mitomycin C and Lentinan*. *Gan to kagaku ryoho* **19**: 715-718.

Miles, P.; Chang, S. (1999). "*Biología de las setas*". Hong Kong. Ed. World Scientific. 4p.

Mizuno, T. (1999). *The extraction and development of antitumour-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan* (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 9-30.

MushWorld (2005) "*Mushroom Growers`Handbook*" – Shiitake Cultivation, Korea

Oka, M., et al (1992). *Immunological analysis and clinical effects of intra-abdominal and intrapleural injection of lentinan*. *Biotherapy* 5: 107-112

Olaya J. (2002). *Antipasto a partir de verduras crudas*, Hogares Juveniles Campesinos, Videoteca del campo, Granja integral autosuficiente. Videocasete VHS

Olaya J. (2002). *Antipasto a partir de verduras encurtidas*, Hogares Juveniles Campesinos, Videoteca del campo, Granja integral autosuficiente. Videocasete VHS

Przybylowicz, P.; Donoghue, J. (1990). "*Shiitake Growers Handbook*". The art and Science of mushroom cultivation Publishing Company. 3p.

Quimio, T. H.; Chang, S. T.; Royse, D. J. (1990). *Technical guidelines for mushroom growing in the tropics*. Roma. Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO. (106) 70p. Rochester. 130p.

Rojas D. (2006). *Validación y estandarización de métodos analíticos para la cuantificación de intrapolisacaridos, exopolisacaridos y ácidos ganodericos a partir del cultivo sumergido de Ganoderma lucidum*. Universidad de Antioquia.

"*Science of mushroom cultivation*". United States of America. Ed. Kendall/Hunt

Shimizu, T. et al (1981). *A combination of regional chemotherapy and systemic immunotherapy for the treatment of inoperable gastric cancer*. In: Aoki T. et al. *Manipulation of host defense mechanism*. Amsterdam, Netherlands.

Smith J., Rowan N. Sullivan R. (2002). "*Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments*." Cancer Research UK, University of Strathclyde.

Stamets, P. (2000). "*Growing gourmet and medicinal mushrooms*". Canadá. McGraw-Hill. 25p.

Suzuki, N., & Wada, A. (1982). *Hydrodynamic behavior of lentinan molecules as studied by quasielastic light-scattering*. *Carbohydr. Res.*, 109, 295-298.

Susuki, H. et al. (1990). *Structural characterisation of the immunoactive and antiviral water-soluble lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes mycelium* (LEM)*. *Agricultural and Biological Chemistry* **254**, 479-487.

Suzuki, M., Iwashiro, M., Takatsuki, F., Kuribayashi, K., & Hamuro, J. (1994). *Reconstitution of Anti-tumor Effects of Lentinan in Nude Mice: Roles of Delayed-type Hypersensitivity Reaction Triggered by CD4-positive T Cell Clone in the Infiltration of Effector Cells into Tumor*. *Jpn. J. Cancer Res*, 85, 409-417.

Taguchi, T., Furue, H., Kimura, T., Kondo, T., Hattori, T., Itoh, I., & Ogawa, N. (1985). *Results of phase III study of lentinan*. *Gan To Kagaku Ryoho*, 12, 366-78

Trigos, A. (1998). *Química de los Hongos. En "Producción de vitamina D2 a partir de hongos macromicetos: Aspectos científicos, técnicos y económicos"*. Bogotá. Editor: Dr. Augusto Rivera Umaña. Editorial Guadalupe. 19p.

Wasser, S.P. and Weis, A.L. (1999). *Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycete mushrooms: a modern perspective*. *Critical Reviews in Immunology* **19**, 65-96.

Wasser, S. P., & Weis, A. L. (1999). *Medicinal properties of substances occurring in Higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives*. *Int J Med Mushrooms*, 1, 31–62.

Wasser, S.P. (2002). *Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides*. *Appl Microbiol Biotechnol* , 60, 258–274.

Wasser, S. P., Weis, A. L. (1997). *Shiitake mushrooms [*Lentinus edodes* (Berk.)Sing.]*. In: Nevo E (ed) *Medicinal mushrooms*. Peledfus, Haifa, Israe.

Wasser, S.P. (2005). *Shiitake (*Lentinus edodes*)*. *Encyclopedia of Dietary Supplements*. DOI: 10,108 1 E-EDS 120024880. Marcel Dekker, pp. 653-664.

Wasser, S.P., Didkukh, M.Y. and Nevo, E. (2004). *Dietary supplements from culinary medicinal mushrooms: a variety of regulation and safety concerns for the 21<sup>st</sup> century*. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 6, 231-245.

Wasser, S.P., Nevo, E., Sokolov, D., Reshetnikov, S. and Timor-Tismenetsky, H. (2000). *Dietary supplements from medicinal mushrooms: diversity of types and variety of regulations*. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2, 1-20.

Yap, A-T., & Ng, M-L.M. (2001). *An improved method for the isolation of lentinan from the edible and medicinal shiitake mushroom, Lentinus edodes (Berk.) Sing. (Agaricomycetideae). International Journal of Medicinal Mushrooms, 3, 6-19.*

Yoshida, O., Nakashima, H., Yoshida, T., Kaneko, Y., Yamamoto, I., Matsuzaki, K., Uryu, T., & Yamamoto, N. (1988). *Sulfation of the immunomodulating polysaccharide lentinan: A novel strategy for antivirals to human immunodeficiency virus (HIV). Biochem. Pharm., 37, 2887-2891.*

## 10. ANEXOS

### ANEXO 1. FORMATO ENCUESTA ANALISIS SENSORIAL

#### UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

#### ESPECIALIZACION EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

##### ANALISIS SENSORIAL

**Producto:** Es un antipasto tradicional, que contiene atún, pasta de tomate, vegetales como pepinillo agrídulce “pickle”, pimentón, jengibre y orégano, además contiene champiñones y el hongo medicinal Shiitake.

**Objetivo:** Apreciar y comparar el sabor y la textura de dos tipos de antipasto.

Sexo: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

Usted ha comido Shiitake en alguna presentación, cual?

\_\_\_\_\_

##### ANALISIS DE SABOR:

1. Disfruto del sabor, le parecía agradable, regular, aceptable?

a. \_\_\_\_\_ b. \_\_\_\_\_

2. Le pareció ácido o dulce o salado?

a. \_\_\_\_\_ b. \_\_\_\_\_

3. ¿Sintió el sabor del hongo medicinal Shiitake? sabor agradable o fuerte o desagradable?

a. \_\_\_\_\_ b. \_\_\_\_\_

4. ¿Siente diferencias de sabor apreciables entre los dos antipastos?

\_\_\_\_\_

**ANALISIS DE TEXTURA:**

1. ¿Sintió alguna textura fibrosa o difícil de masticar o de mal gusto?

a. \_\_\_\_\_ b. \_\_\_\_\_

2. ¿Percibió si alguna textura era desconocida para usted?

\_\_\_\_\_

3. diferencias en la textura de los dos antipastos?

\_\_\_\_\_