



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

GRADO EN BIOLOGIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA
PARA LA PRODUCCIÓN DE HONGOS
COMESTIBLES**

Janire García Lavis

Leioa, Febrero 2014

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

RESUMEN

El cultivo de hongos comestibles saprófitos constituye un sistema de producción-consumo, que ha adquirido gran relevancia social, económica y ecológica. Con el fin de abaratar costes a la vez que aprovechar y reciclar residuos forestales, el objetivo de este trabajo se ha centrado en evaluar la viabilidad del aserrín de *Eucalyptus globulus* como soporte del cultivo en bolsa de *Lentinula edodes* (hongo comercializado conocido como Shiitake) y *Agrocybe aegerita* (hongo no comercializado comúnmente llamado Seta de Chopo). Se han evaluado 6 formulaciones, todas ellas con el aserrín como componente principal y con adición de diferentes suplementos: cereales (salvado y mijo), un controlador del pH (CaCO_3) y un estimulador de crecimiento (CaSO_4). Se ha determinado el crecimiento miceliar sobre cada uno de los sustratos, así como la producción de carpoforos (tanto en cantidad como en calidad) y la duración del periodo de fructificación. La mezcla más efectiva para la producción de *L. edodes* fue aquella que contenía yeso y azúcar mientras que para *A. aegerita* el salvado resultó ser el mejor suplemento.

ABSTRACT

The cultivation of *Lentinula edodes* (Shiitake fungus known as eatable) and *Agrocybe aegerita* (no fungus commonly called mushroom commercialized Poplar) was evaluated in synthetic studs in order to take advantage different alternative substrates with different proportions. This research aims to improve the production of eatable mushrooms using technologies that facilitate the transformation of eucalyptus sawdust as a source of cellulose and hemicellulose. Mushrooms were isolated to inoculate PDA media mycelia obtained in the bags. 6 different substrates using a charge of wood (eucalyptus sawdust), cereals (bran and millet), pH controller (CaCO_3) and growth stimulator (CaSO_4) were performed. The most effective mixture for the production of *L. edodes* was that containing gypsum and sugar while for *A. aegerita* bran proved to be the best supplement.

INTRODUCCIÓN

Los hongos saprófitos se caracterizan por desarrollar todo su ciclo vital sobre materia orgánica inerte, obteniendo sus requerimientos nutritivos y energéticos degradando dicha materia orgánica. En este grupo se encuentran todos los hongos que degradan el complejo lignocelulósico que forma parte de la pared de los vegetales. Existen dos subgrupos de hongos saprófitos: los *Degradadores Primarios* que corresponde a los hongos colonizadores y que inician el proceso de degradación y los *Degradadores Secundarios* que sólo pueden acceder a sustancias orgánicas más simples que han sido pre-degradadas por los Degradadores Primarios.

Los hongos saprófitos comestibles al ser independientes de otros seres vivos, pueden ser cultivados mediante sistemas de producción, en una serie de eventos secuenciales con los cuales se simula el crecimiento natural de cepas fúngicas sometidas previamente a procesos de domesticación. La tecnología específica de la producción depende de la especie, sin embargo, en todos los casos la producción se divide en varias fases: obtención del micelio, elaboración del inóculo, preparación del sustrato, inoculación del sustrato, incubación, fructificación, cosecha y comercialización.

Tradicionalmente, el cultivo se ha llevado a cabo en troncos recién cortados, que son talados durante el período de dormancia cuando su contenido de azúcar es alto. Una vez talados se realizan, con un taladro, múltiples y pequeños agujeros en los troncos, que son inoculados con basidiosporas o con micelio crecido sobre tacos de madera o de aserrín (Royse et al. 1985).

Sin embargo, en las últimas décadas se han desarrollado nuevos métodos basados en el cultivo en bolsas de plástico esterilizables. Como sustrato del cultivo se utiliza una mezcla de aserrín, aditivos suplementarios con contenidos de celulosa como los granos o el salvado de trigo y otras fuentes de hidratos de carbono y nitrógeno (Murata et al. 1987). La mezcla es esterilizada con calor e inoculada con micelio y, tras un periodo de incubación variable, se induce el proceso de fructificación mediante un cambio en la temperatura (Iizuka y Takeuchi, 1978). Hay que tener en cuenta que el crecimiento está regulado por factores medioambientales como la temperatura, la humedad, el pH, la luz y las concentraciones de CO₂ y O₂. Las condiciones más adecuadas varían en función del tipo de desarrollo que se busca, es decir, si se busca el crecimiento del micelio o la fructificación. El micelio crece bien en un amplio rango de temperaturas, que van desde los 10°C a los 40°C, aunque la temperatura óptima oscila alrededor de los 23°C. Asimismo, la humedad tanto del sustrato contenido en la bolsa, como del ambiente, juega un papel determinante en el

crecimiento micelial y el desarrollo de los primordios y el cuerpo fructífero, debiéndose mantener por encima del 70% (Chang y Miles, 1989).

El cultivo de hongos comestibles saprófitos constituye un sistema de producción-consumo, que ha adquirido gran relevancia social, económica y ecológica a nivel mundial. Se trata de un conjunto de procesos biotecnológicos aplicados que pueden desarrollarse a pequeña y a gran escala para producir un alimento de buena calidad nutricional, suplementos dietéticos, así como enzimas y productos metabólicos (Mora y Martínez-Carrera, 2007).

Son diversos los estudios que han demostrado un elevado contenido de proteínas en los hongos comestibles (19-35% en base seca), así como concentraciones significativas de aminoácidos esenciales (lisina, leucina, metionina, y triptófano) y vitaminas (tiamina, niacina, riboflavina y ácido ascórbico) (Chang & Miles, 1989; Wasser & Weis, 1999). Más recientemente, también se han descubierto propiedades medicinales en estos hongos, entre las que pueden mencionarse cualidades anti-tumorales, inmuno-moduladoras, anti-virales, anti-bacterianas, anti-parasíticas, anti-hipertensión, anti-arterioesclerosis, hepatoprotectoras, anti-diabéticas y anti-inflamatorias (Chang & Miles, 1989; Wasser & Weis, 1999). Todo ello da idea del elevado valor nutracético de los hongos comestibles, a partir de los cuales pueden desarrollarse diversos compuestos farmacéuticos. Se ha estimado que este campo genera los 3.6 billones de dólares en los mercados internacionales de la industria alimenticia, farmacéutica, y de cosmética, apreciándose una creciente demanda en Europa, Norteamérica y Japón (Chang, 1999).

Actualmente, las principales especies fúngicas saprófitas cultivables en mayor o menor escala son: *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach, *Agaricus blazei* Murill., *Agaricus brunnescens* Peck, *Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Sing, *Auricularia auricula* (Hook.) Underw, *Corpinus comatus* (O.F. Müll) Pers, *Flammulina velutipes* (Curtis.: Fr.) Sing., *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray, *Hericium erinaceus* (Bull.) Person, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, *Lepista nuda* (Bull.:Fr.) Cooke, *Pholiota nameko* (T. Ito) S. Ito&Imai, *Pleurotus eryngii* (De Cand.) Gillet, *Pleurotus ostreatus* Cham. Jura. Vogs., *Stropharia rugosoannulata* Farlow ex Murrill, *Volvariella volvacea* (Bull. ex Fr) Sing (Boa E, 2004; Sanchez et al., 2005). Sin embargo, cabe destacar que de todos los géneros mencionados únicamente las especies de *Auricularia*, *Lentinula* y *Pleurotus* (Degradadores Primarios) y *Agaricus* (Degradador Secundario) son producidas a nivel industrial (Arias et al., 2008).

De entre los diez principales países productores de setas de interés comestible y medicinal, China destaca claramente con una producción de 1.409.680 toneladas generando el 49% del total de setas saprofitas comestibles producidas a nivel mundial, debido probablemente a su cultivo desde el siglo XIV. Le siguen muy a distancia EEUU con un 14%, los Países Bajos con un 9%, España con un 6%, Francia y Polonia con un 5% y, finalmente Italia, Canadá, Irlanda y Reino Unido con una producción del 3% del total (FAO-FAOSTAT, 2005).

LENTINULA EDODES

Lentinula edodes (Berk.) Pegler, denominada anteriormente como *Agaricus edodes* Berk. y *Lentinus edodes* (Berk.) Singer, pertenece a la división Basidiomycota, Clase Agaricomycetes, Orden Agaricales, Familia Marasmiaceae. Es una especie nativa del Este de Asia, en concreto de Japón, China y Corea (Kazuko, 2006).

Se conoce popularmente con el nombre de *Shiitake*, termino japonés que proviene de "*Shii*", nombre de un tipo de castaño (*Castanopsis cuspidata*) sobre el que se ha cultivado tradicionalmente y "*take*", que significa hongo.

Es considerado un hongo de pudrición blanca que produce un sistema enzimático capaz de degradar todos los componentes de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y lignina) por lo que se le denomina ligninocelulolítico (Silva et al., 2007).

Posee excepcionales propiedades organolépticas y nutritivas (Mizuno, 1995). Su micelio tiene un elevado contenido en proteínas, carbohidratos, fibras, vitaminas, minerales, así como un bajo contenido en lípidos, específicamente colesterol (Longvah y Dosthale, 1998).

En cuanto a las propiedades medicinales, se han aislado diferentes compuestos cuya capacidad antibiótica, anticarcinogénica y antiviral ha sido demostrada (Sasaki et al, 1976 y 2001; Kosaka et al., 1982; Taguchi, 1983; Ngai y Ng, 2003).

De entre las especies de estos géneros cultivadas a nivel industrial, *Lentinula edodes* es la segunda especie más cultivada y consumida a nivel mundial (Silva et al., 2007). Se producen más de 130.000 toneladas al año, siendo comercializado el 45% en fresco y el resto en seco. Los mayores productores de Shiitake se encuentran en Asia (China, Japón, Taiwan y Corea), pero debido a sus propiedades gastronómicas y a su facilidad de cultivo, en los últimos años se ha incentivado su expansión a otros países (Canadá, EEUU, Tailandia, México, Brasil, Suiza). En el caso concreto de España, hasta hace muy poco tiempo se encontraba solamente en tiendas especializadas de productos orientales como producto deshidratado importado de China. Sin

embargo, cada vez es más frecuente encontrarla en los puntos de venta de frutas y hortalizas, en los que se venden como un producto gourmet, con precios altos y una demanda creciente.

AGROCYBE AEGERITA

Agrocybe aegerita (V. Brig.) Sing., pertenece a la División Basidiomycotina, Clase Basidiomycetes, Orden Agaricales, Familia Strophariaceae.

Conocido popularmente con el nombre de seta de chopo, fructifica de forma fasciculada sobre tocones o árboles vivos tanto de chopo como de sauces y olmos. Posee un elevada capacidad antioxidante, así como anticancerígena y antifúngica (Zhong et al., 2009)

Se cultiva en Japón, China, Corea y Australia, en general a pequeña escala, siendo los requerimientos específicos para su cultivo muy poco conocidos. En España su cultivo es inexistente. Como sustrato utilizado para su cultivo se ha descrito la paja de trigo, cortezas molidas o serrín de álamo (*Populus alba*) (Maroto, 1995).

OBJETIVOS

El consumo de setas cultivadas en el mercado español presenta un principal problema, la inercia de cara a la diversificación (Sierra et al., 2002). Es difícil entrar en el mercado con una especie nueva y resultar competitiva frente a otras que llevan mucho tiempo y están bien aceptadas como el Champiñón (*Agaricus bisporus*) y la Seta de Ostra (*Pleurotus ostreatus*). A los nuevos ejemplares, aunque sean de mejor calidad se les tiende a rechazar por desconocimiento, pero también por el más elevado coste de producción que hace, en el caso del Shiitake, que sea un producto demasiado caro para competir con *A. bisporus* y *P. ostreatus*. Por eso es importante buscar mayor rentabilidad al cultivo, para lo cual es fundamental obtener las materias primas que más abundan en la zona de explotación a un bajo coste económico.

El sector de pasta y papel tiene un gran peso específico en el tejido industrial del País Vasco. Según los datos del Inventario Forestal de la Comunidad Autónoma del País Vasco (2005), la superficie forestal de este territorio es de 396.701 hectáreas, de las que 13.023 son de eucalipto, concentrándose sobre todo en Bizkaia, en donde es la especie que ocupa la mayor superficie después del pino radiata. Actualmente la industria del aserrío es la más importante actividad de transformación de madera en el País Vasco, acumulándose grandes volúmenes de

estos desperdicios (más del 40%) a los que se le podría dar un valor añadido si pudieran ser utilizados en la producción de hongos comestibles.

Por tanto, se plantea como objetivo de este trabajo la evaluación de la posibilidad de utilizar el aserrín de *Eucalyptus globulus* como soporte del cultivo de los hongos comestibles *Lentinula edodes* y *Agrocybe aegerita*, lo que significará reducción de costes y una mayor extensión en el mercado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se parte de carpóforos de *Agrocybe aegerita* (Seta de Chopo) recolectados en el parque de Akarlanda (Umbe, Vizcaya) sobre tronco de *Populus alba* L. y de una cepa de *Lentinula edodes* (Shiitake) adquirida en la empresa FungiSem micelios SA (Calahorra, La Rioja) ante la ausencia de ellas en un ambiente natural cercano.

El aislamiento del micelio de *A. aegerita* se realizó a partir de un trozo de carne de la zona interior del sombrero del carpóforo de las setas, que se colocó en placa Petri sobre medio Potato Dextrosa Agar (PDA) previamente esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos (Suárez et al., 2011). A este proceso se le conoce como “aislamiento en cultivo puro”. Los cultivos puros son la base de todo el proceso y son resembrados periódicamente sobre medio fresco para mantener su viabilidad.

El cultivo de ambas especies se lleva a cabo en bolsas de polipropileno esterilizables en autoclave provistas de filtros laterales micro-poros que permiten el intercambio de gases con el exterior sin permitir la entrada de contaminación.

Como sustrato de cultivo se utilizan diferentes fórmulas, todas ellas con el denominador común de ser el aserrín de eucalipto el ingrediente principal. El aserrín procede de la trituración de troncos de *Eucalyptus globulus* de una plantación situada en Ereño (Bizkaia).

Se prepararon 6 formulaciones diferentes, en las que la proporción por bolsa de aserrín (80%) y de agua (65%) se mantuvo constante y solo se variaron los suplementos añadidos así como la proporción de cada uno (Tabla 1). Las proporciones se seleccionaron por ser las más habitualmente utilizadas en el cultivo de Shiitake en bolsa (Harris, 1986; Chen, 2005). El peso seco por bolsa fue de 300 g. Se prepararon tres bolsas idénticas por tratamiento (tipo de sustrato). El ensayo se repitió dos veces.

Tabla1. Formulaciones preparadas para el cultivo en bolsa de Shiitake y de Seta de Chopo.

	Sustrato A	Sustrato B	Sustrato C	Sustrato D	Sustrato E	Sustrato F
Aserrín eucalipto	80%	80%	80%	80%	80%	80%
Salvado de trigo	20%	---	10%	20%	20%	---
Mijo	---	20%	10%	---	---	20%
Azúcar	---	---	---	1%	---	---
Yeso	---	---	---	1%	---	---
CaCO₃	---	---	---	---	0,40%	0,40%
Agua	65%	65%	65%	65%	65%	65%

Los ingredientes se mezclan manualmente estando el material seco, para luego añadirle agua hasta lograr el nivel de humedad adecuado (65%) (Harris, 1986). Sin sellar las bolsas, pero cerradas con una pinza, se llevan al autoclave donde son esterilizadas a 121°C durante media hora. Una vez finalizado el proceso, las bolsas se dejan enfriar durante 24 h antes de ser inoculadas. El cultivo puro crecido sobre medio PDA se parte en 20 triángulos y, en condiciones de esterilizado, se inoculan 4 triángulos por bolsa. El procedimiento seguido es el mismo para los dos tipos de setas que se van a estudiar. Gracias a una máquina de sellado se sellan todas las bolsas.

Tras el sellado, las bolsas se trasladaron a un cuarto de cultivo en el que se depositaron sobre estanterías metálicas en una disposición totalmente aleatorizada. La temperatura ambiente se mantuvo en torno a los 23-24°C y con una humedad ambiental del 40-50%. Dos veces por semana se realizó la revisión del estado de los cultivos hasta la finalización del proceso, que duro un total de 110 días.

Durante los 60 primeros días del cultivo las bolsas se mantuvieron en oscuridad. Una vez cubierto el sustrato por el micelio y habiéndose formado un bloque compacto y de color blanco-marrón, se indujo la fructificación. Para ello, los bloques se sacaron de las bolsas, se refrigeraron a 5°C durante 24 h (Murata, et al. 1987), se sumergieron en agua fría y se expusieron a luz constante de baja intensidad (Kleinmamm-klar y Schwantes 1980, Regés Dalmaú 2008). Dos veces por semana, los bloques se regaron con agua mediante tubos que la llevaban directamente a su interior y se rociaba la superficie pulverizando agua con un spray.

Los altos niveles de dióxido de carbono inhiben la fructificación, por lo que se incrementó la ventilación de la habitación y los bloques se colocaron en bandejas con tres cuartas partes de su superficie en contacto con el aire. De este modo, se permite que el bloque desarrolle una piel marrón que forme un microambiente favorable para la formación de primordios y proteja al bloque de microorganismos patógenos y deshidratación (Tritana y Tantikanjan, 1987; Kleinmamm-Klar y Schwantes 1980).

Los cuerpos fructíferos adquirieron un tamaño entre 8 y 12 cm. Se pesaron individualmente (peso fresco) y se dejaron en la estufa a 40° C durante 72 horas. Tras ese período de tiempo se pesaron nuevamente las setas (peso seco) y se almacenaron en bolsas según el tipo de tratamiento y el tipo de muestra.

Con los datos recopilados durante el cultivo se calculó la Eficiencia Biológica (EB) (Royse, 1985) de cada sustrato mediante la siguiente fórmula:

$$EB (\%) = \frac{P.H.F (Kg)}{P.S.S (Kg)} \times 100$$

P.H.F = Peso de hongos frescos

P.S.S = Peso de sustrato seco

Todos los datos obtenidos fueron analizados con el paquete estadístico ©SPSS Inc. (vs. 19.0, 2011). Primero, se verificó la normalidad y homogeneidad de las varianzas mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov* y la prueba de *Levene*. Las variables expresadas como porcentajes fueron transformadas mediante $\arcsen\sqrt{x}$, donde x es el porcentaje de una determinada variable (Anderson y McLean, 1974). Sin embargo, todas las medias y errores estándar mostrados en los resultados están obtenidos a partir de datos no transformados. Para determinar las diferencias significativas entre tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) junto con una comparación múltiple *post hoc* de medias observadas mediante el test de *Tukey*. El factor de estudio fue el tipo de formulación, la variable de respuesta fue el tiempo de colonización del sustrato, la duración del periodo de fructificación, la eficiencia biológica, el número de cuerpos fructíferos y el peso fresco de los carpóforos. El nivel de significación para los test estadísticos fue $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

La producción de micelio en cultivo puro fue el primer paso a seguir. En la Figura 1 se muestra la viabilidad tras las continuas resiembras para la obtención de material a inocular.



Figura 1. Micelio de la Seta de Chopo a la izquierda y micelio de Shiitake a la derecha.

Una vez obtenidos los cultivos puros de ambas especies, comenzó el proceso de cultivo, cuya duración total, como se puede ver en el Cronograma de la Figura 2, fue de 120 días: 10 días para la producción del inóculo antes de inocularlos en las bolsas y 110 días posteriores a la inoculación.

Tras la inoculación, la colonización inicial de los sustratos de cultivo duró entre 35 y 40 días. Hasta los 55-60 días se produjo un denso crecimiento micelial que acabó por formar una costra superficial. En ese momento se procedió a la apertura de las bolsas y a la inducción de la fructificación. Cinco días después, habiendo transcurrido 65 días del inicio del cultivo, comenzaron a aparecer los primeros cuerpos fructíferos. El periodo de fructificación fue variable en función de la especie y del sustrato de cultivo pero, en general, tuvo lugar entre los 65 y los 100 días de cultivo.

A los 100 días se sumergieron nuevamente los tacos en agua fría para inducir una segunda floración. El grado de desecación era muy elevado, por lo que se dio por finalizado el ciclo de cultivo a los 110 días.

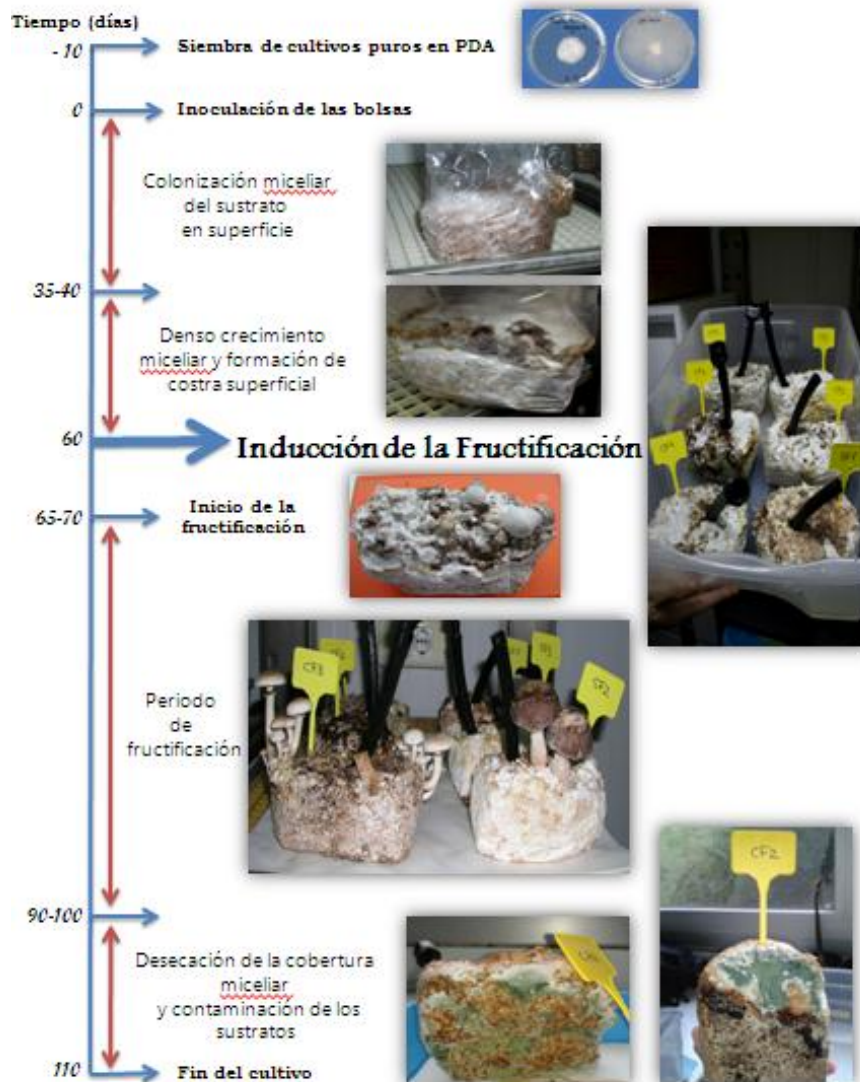


Figura 2. Cronograma del cultivo en bolsa.

En la Figura 3 se observa el crecimiento micelar de *Lentinula edodes* dentro de las bolsas selladas medido a los 9, 18, 25 y 33 días después de la inoculación. En la primera semana, el sustrato con un crecimiento micelar más abundante fue el D (aserrín, salvado, azúcar, yeso), mientras que a las 3 semanas el C (aserrín, salvado, mijo) lo superó en un 20%. A los 25 días el micelio cubrió prácticamente casi toda la superficie en todos los casos. Cabe destacar que no se encontraron diferencias de crecimiento en función del tipo de sustrato, observándose a los 33 días una colonización total del cultivo en todas las formulaciones evaluadas.

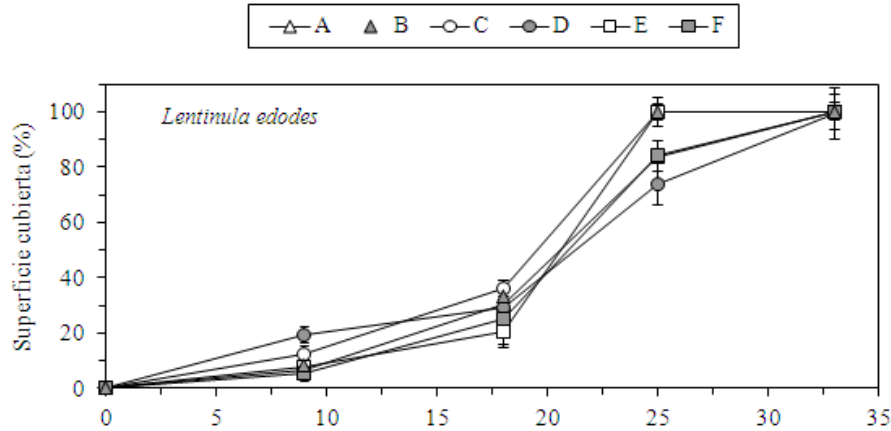


Figura 3. Crecimiento micelar de *Lentinula edodes* dentro de la bolsa.

En la Figura 4 se muestran los resultados de la observación del crecimiento micelar de *Agrocybe aegerita* durante 33 días. Durante la primera semana el sustrato C (aserrín, salvado y mijo) presentó un mayor crecimiento micelar. No obstante, durante las siguientes semanas fue sobre el sustrato E y el sustrato F donde se produjo mayor desarrollo micelar. Solo el sustrato E (aserrín, salvado y CaCO_3) presentó una colonización del 100% de la superficie a los 33 días, mientras que para el sustrato F (aserrín, mijo y CaCO_3) la superficie cubierta por micelio de forma homogénea fue de alrededor del 80%. Los sustratos B y C (mijo) terminaron con una colonización superficial del 20% y los sustratos A y D (salvado) tan solo un 10%. Comparándolos con los resultados obtenidos con Shiitake, se consideró tiempo suficiente para comenzar a inducir la fructificación.

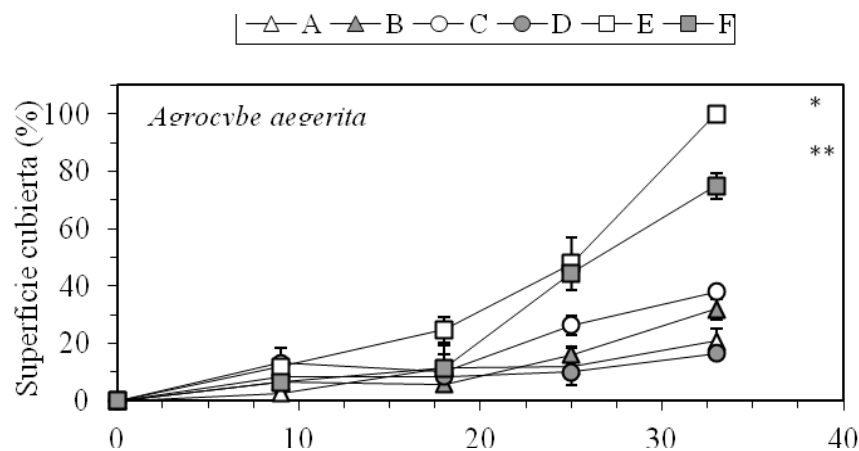


Figura 4. Crecimiento micelar de *Agrocybe aegerita* dentro de la bolsa. Los datos son la media \pm error estandar ($n=6$). La presencia de asteriscos indica la existencia de diferencias significativas entre sustratos de cultivo según el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

Transcurridos unos 65 días desde el inicio del ensayo se procedió a la inducción de la fructificación. Para ello, se sacaron los tacos de las bolsas, se sumergieron en agua y se expusieron a luz constante, comenzándose a notar a los pocos días la formación de cuerpos fructíferos en los diferentes sustratos. En el caso de *Lentinula edodes*, en el sustrato A no se observaron primordios durante todo el proceso (Figura 5). En el resto de sustratos si que se produjo fructificación. El periodo de fructificación más largo se obtuvo en el sustrato D, que duró 30 días, seguido por los sustratos B y F que duraron alrededor de 20 días. Los periodos más breves se obtuvieron en los sustratos C y E, en los que la fructificación duró poco más de 10 días.

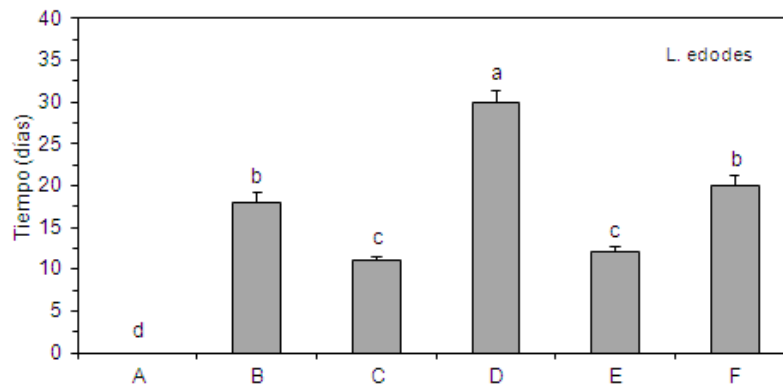


Figura 5. Duración del periodo de fructificación de *Lentinula edodes*. Los datos son la media \pm error estandar (n=6). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas entre sustratos de cultivo según el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

En la Figura 6 pueden observarse los resultados de la duración del periodo de fructificación de *Agrocybe aegerita*. Presentó un periodo de fructificación en el sustrato C de 29 días y en el sustrato D de 4 días, resultados totalmente inversos a los obtenidos con *L. edodes*. Además, los sustratos B y F para ambos tipos de setas presentaron unos resultados significativamente similares. En el caso del sustrato A, la fructificación duró 10 días.

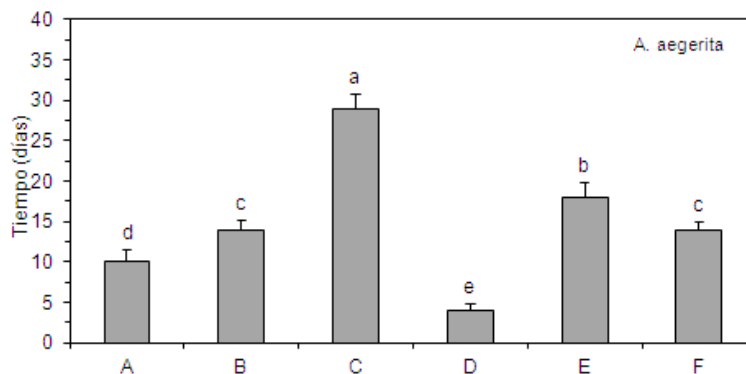


Figura 6. Duración del periodo de fructificación de *Agrocybe aegerita*. Los datos son la media \pm error estandar (n=6). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas entre sustratos de cultivo según el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

Un parámetro muy importante a la hora de evaluar la utilidad de diferentes sustratos como soporte de cultivo de especies saprofitas es la Eficiencia Biológica, que relaciona los kilos de hongo obtenidos por kilo de sustrato. La determinación de dicho parámetro mostró una mayor eficiencia de los cultivos de Shiitake con resultados superiores al 30% frente a los obtenidos con la Seta de Chopo cuyos valores máximos no superaron el 20%.

Con respecto a la formulación del sustrato, en el caso de *L. edodes* (Figura 7) el mejor fue el D, con una Eficiencia Biológica del 60%. En el caso de los sustratos B, C y E se obtuvieron valores muy similares que rondaban el 35%. En el sustrato F la eficiencia se redujo al 30%.

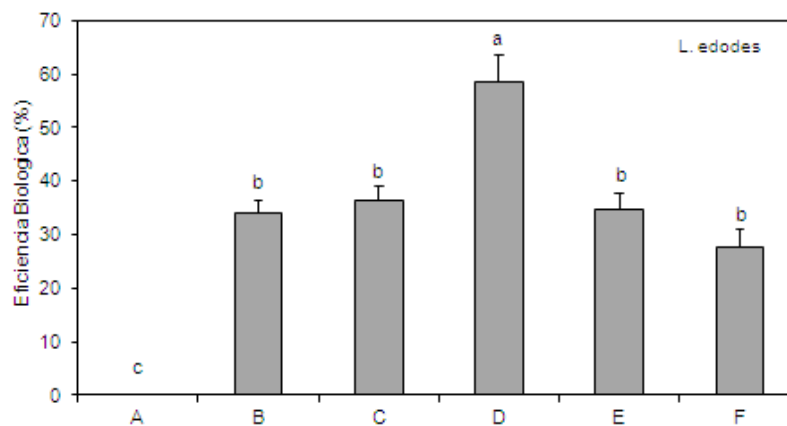


Figura 7. Eficiencia Biológica de *Lentinula edodes* medida en %. Los datos son la media \pm error estándar (n=6). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas entre sustratos de cultivo según el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

En *A. aegerita* (Figura 8) C y E fueron los sustratos más eficientes, rozando eficiencias del 20%, valores que descendían a poco más del 10% en el caso de los sustratos A, B y F. En el caso de esta especie el sustrato menos eficiente fue el D, con un valor que no alcanzaba el 5%.

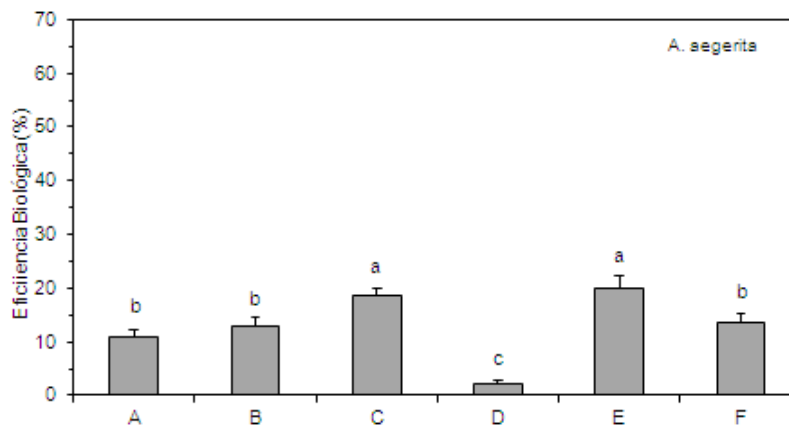


Figura 8. Eficiencia Biológica de *Agrocybe aegerita* medida en %. Los datos son la media \pm error estándar (n=6). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas entre sustratos de cultivo según el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

Otro parámetro a tener en cuenta, el número de carpóforos producidos por cada bolsa de sustrato. Al final del tratamiento el sustrato que más cuerpos fructíferos presentó fue el D para *L. edodes* (Figura 9) con una media de 11 carpóforos seguido del sustrato B con 8 carpóforos. Los sustrato C, E y F terminaron con una media de 6 carpóforos mientras que para el sustrato A no hubo fructificación alguna.

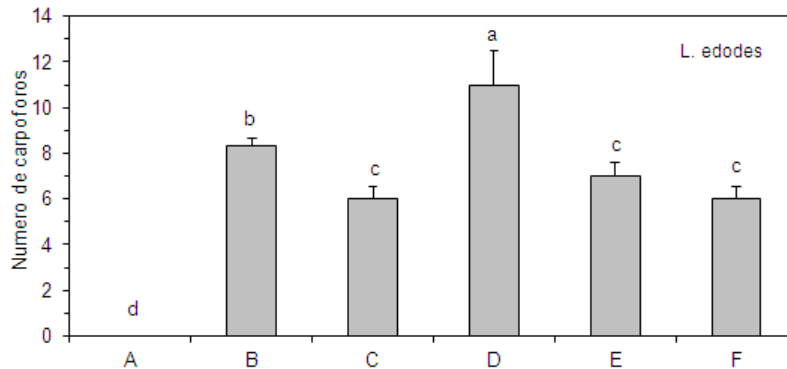


Figura 9. Número medio de cuerpos fructíferos de *Lentinula edodes*. Los datos son la media \pm error estándar (n=6). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas entre sustratos de cultivo según el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

En el caso de *A. aegerita*, el sustrato C presentó la mayor producción, con una media de 9 carpóforos, mientras que la menor producción se obtuvo en los sustratos A y D, con una media de 3 ejemplares por bolsa (Figura10).

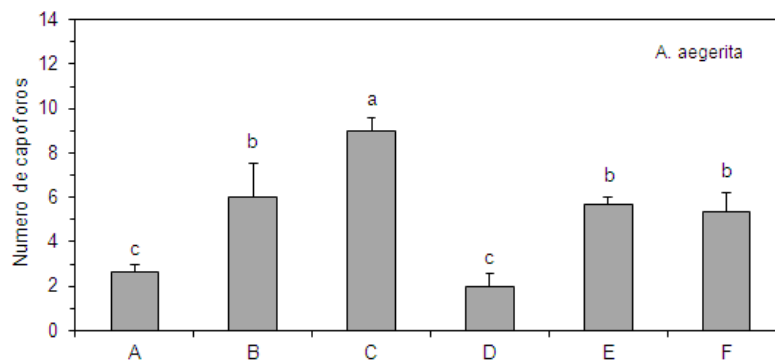


Figura 10. Número medio de cuerpos fructíferos de *Agrocybe aegerita*. Los datos son la media \pm error estándar (n=6). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas entre sustratos de cultivo según el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

Además de la Eficiencia Biológica, es importante valorar el aspecto y tamaño de los carpóforos producidos, puesto que siendo la comercialización su destino final, es importante que tanto su aspecto como su tamaño sean adecuados.

Con respecto al aspecto, los carpóforos de *L. edodes* eran grandes y robusto, muy similares a los comprados en el mercado (Figura 11). Aunque se produjeran de forma individualizada o en

ramilletes, el desarrollo del carpóforo siempre era bueno y adquiría un aspecto carnoso y robusto.

Los cuerpos fructíferos presentaban bastante homogeneidad, como queda reflejado en su peso fresco (Figura 12). Así, los más grandes se obtuvieron en el sustrato C, con un peso significativamente superior al de los obtenidos en los otros sustratos, entre los que no se aprecian diferencias significativas.



Figura 11. Aspecto de los carpóforos de Shiitake.

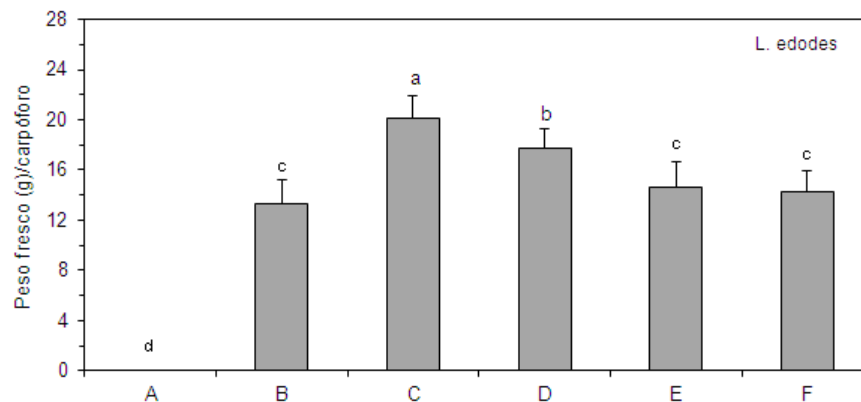


Figura 12. Peso fresco medio por carpóforo producido para cada uno de los sustratos utilizados en el cultivo de *Lentinus edodes*. Los datos son la media \pm error estándar (n=6). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas entre sustratos de cultivo según el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

En el caso de *A. aegerita*, el aspecto era mucho más variable, encontrándose ejemplares muy endeble, con aspecto de desarrollarse de forma aislada, es decir con el pie muy largo y delgado y muy poco sombrero (Figura 13). Los carpóforos más grandes y de mejor aspecto se obtuvieron en los sustratos A y E, siendo también aceptables los obtenidos en el sustrato F (Figura 14). Sin

embargo, los carpóforos recolectados en los sustratos B, C y D eran muy pequeños, sobre todo con el sombrero poco desarrollado por lo que prácticamente todo el peso obtenido correspondía al pie.



Figura 13. Aspecto de los carpóforos de la Seta de Chopo.

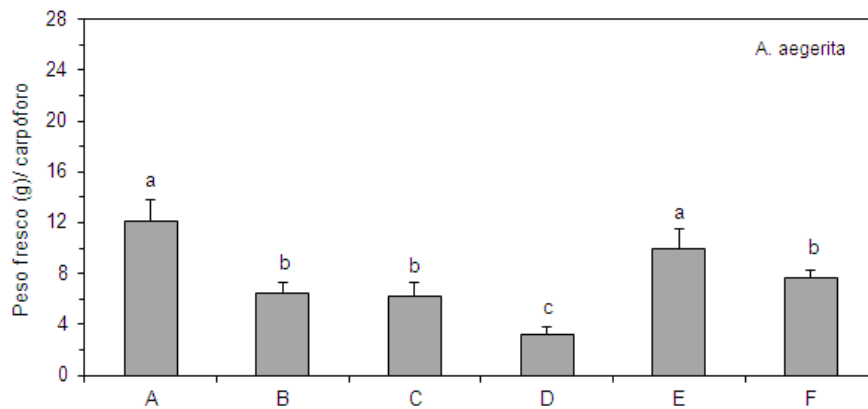


Figura 14. Peso fresco medio por carpóforo producido para cada uno de los sustratos utilizados en el cultivo de *Agrocybe aegerita*. Los datos son la media \pm error estándar (n=6). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas entre sustratos de cultivo según el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

En cuanto a la contaminación de los tacos se refiere, en la Tabla 2 pueden observarse los resultados obtenidos, siendo en el caso de Shiitake un porcentaje nulo para todos los tipos de sustrato. El cultivo de *A. aegerita* se contaminaba fácilmente y 10 días después del inicio del ensayo, el 33% de los tacos del sustrato A se contaminaron dentro de las bolsas. A mitad del tratamiento (50 días) el sustrato A presentó contaminaciones en el 100% de los tacos y otros sustratos como el D y E superaron el 50%.

Tabla 2. Porcentaje de bloques contaminados para cada uno de los sustratos evaluados en el cultivo de *Lentinula edodes* y *Agrocybe aegerita* durante el proceso.

	<i>Lentinula edodes</i>	<i>Agrocybe aegerita</i>
Sustrato A	0%	100%
Sustrato B	0%	0%
Sustrato C	0%	0%
Sustrato D	0%	66%
Sustrato E	0%	100%
Sustrato F	0%	33%

Al final del ensayo todos los sustratos de *Agrocybe aegerita* a excepción de B y C sufrieron, aunque a diferentes niveles, contaminación y tuvieron que ser desechados.

DISCUSIÓN

En todo proceso de producción de hongos saprófitos, es muy importante evaluar el tiempo de colonización del sustrato como un indicativo de la rapidez para metabolizar el alimento por parte del hongo (Villegas et al., 2007). Los resultados estadísticos mostraron que el tipo de formulación no afectaba al tiempo de colonización del bloque de *L. edodes*, y que en todos los casos la colonización era rápida y densa, lo que indicaba que el aserrín de eucalipto era apto para el crecimiento de esta especie. Sin embargo, en *A. aegerita*, si se encontraron diferencias en el crecimiento micelial en función del sustrato. Así, a los 33 días del inicio del tratamiento el sustrato E y el F, que contenían CaCO_3 como aditivo, presentaron un crecimiento del 100% y 80% respectivamente. Por el contrario, los sustratos mezclados con mijo (B y C) solo fueron bien colonizados en un 20% y los mezclados con salvado (A y D) en un 10%. El uso de la cal o carbonato de calcio y del yeso ó sulfato de calcio, mejora la estructura física de la mezcla, altera el pH, y actúa como fuente de calcio (Singer, 1961, Pellinen *et al.* 1987, Regés Dalmaú, 2008), aunque su uso se aplica principalmente a las denominadas setas de (*Agaricus*), los resultados obtenidos parecen indicar que son complementos fundamentales en el caso del cultivo de la Seta de Chopo.

Con respecto a la producción de carpóforos, al igual que lo observado en el presente trabajo, en general, la aparición de primordios comienza a aparecer entre 4 y 5 días después de la inducción

de la fructificación. Aunque a diferencia de otros estudios en los que la duración del tiempo de fructificación supera los 60 días (Philippoussis et al., 2003), la fructificación en el mejor de los casos no superó los 30 días. Además, no se observó ningún cuerpo fructífero de *L. edodes* para el sustrato A, lo que puede significar que el tratamiento que únicamente contenga aserrín y salvado no es el idóneo a la hora de producir esta especie saprófita. Son resultados obtenidos sin pérdidas de bloques por contaminación por lo que estadísticamente se pueden considerar resultados concluyentes. El sustrato D (azúcar y yeso) presentó un periodo de fructificación de 30 días, continuado por los sustratos B y F (mijo) con 20 días. No obstante, los sustratos C y E (salvado) duraron poco más de 10 días. Los resultados obtenidos demuestran que el yeso que contiene CaSO_4 (estimulador de crecimiento) y el azúcar (fuente de glucosa) proporcionan los nutrientes y la energía necesaria para producir una fructificación prolongada. La ausencia de fructificación en el sustrato A y las peores fructificaciones de los sustratos C y E, que están compuestos mayormente de salvado (al igual que el sustrato A), apoyan la hipótesis de que sea conveniente suplementar el sustrato con una fuente que le proporcione energía suficiente. Los granos como el mijo o materiales similares poseen un gran contenido de proteínas, hidratos de carbono y grasas (Kasahara et al., 1976; Lou, 1981; Harris, 1986). Además, en general, los complementos nutricionales elevan los niveles de nitrógeno incrementando así los rendimientos mientras que los hidratos de carbono aceleran la velocidad de colonización y degradación del medio de cultivo, reduciendo el tiempo del proceso de desarrollo hasta la fructificación (Miles y Jong, 1987; Murata et al., 1987).

En el caso de *A. aegerita* los resultados no son concluyentes porque sustratos como el A y D al final del ensayo presentaban una contaminación del 100% y del 66%, respectivamente, lo que influyó en el desarrollo de la fructificación. El sustrato C, que presentó los mejores resultados de fructificación con 29 días no se contaminó durante el proceso en ningún caso. Sin embargo, en el sustrato A, en el que la fructificación fue de 10 días, el 100% de los tacos se contaminaron. La optimización de la metodología para la obtención de *A. aegerita* no es un proceso que se halla desarrollado a nivel industrial y es probable que las condiciones a las que se le ha sometido no fueran las idóneas para este tipo de seta produciéndose así contaminación en gran parte de los tacos. El agente contaminante era *Trichoderma* spp, principal causante de pérdidas de cosecha en los cultivos de champiñones y su aparición puede deberse al acumulo de agua en ciertas zonas de

los tacos y por tanto, a la falta de drenaje de los mismos. Esta conclusión ha sido llevada a cabo mediante la observación de los resultados obtenidos.

Por otra parte, con respecto a la Eficiencia Biológica obtenida, en el caso de *L. edodes* los valores oscilaron entre el 60% (sustrato D) y el 30% (sustrato E), sin tener en cuenta el sustrato A en el que no hubo fructificación. Sin embargo, en el caso de *A. aegerita*, los valores oscilaron entre el 20% de los sustratos C y E y el 5% del sustrato D. Las Eficiencias Biológicas para un sustrato inoculado con inóculo convencional que se pueden encontrar en la bibliografía muestran que los resultados son muy variables dependiendo del sustrato utilizado como soporte del cultivo. Así, en paja de trigo se han indicado valores de Eficiencia Biológica del 59% (Mata y Savoie, 1998) y también del 15% (Delpech y Olivier, 1991). En residuos de café los valores oscilan entre el 64% (Mata y Gaitán-Hernandez, 1994) y el 86% (Leifa et al., 1999). En otro tipo de sustrato como la caña de azúcar los valores han sido muy elevados, rondando el 98% (Salmones et al., 1999) o bastante más bajos como en el caso de las brácteas de piña (Salmones et al., 1999). Con respecto al aserrín de otras especies arbóreas diferentes al de eucalipto, la Eficiencia Biológica varía entre el 40 y el 100% (Fuzisawa et al., 1978; Pegler, 1983; Kalberer, 1987). Hay que tener en cuenta a la hora de comparar los mencionados valores de Eficiencia Biología con los obtenidos en este estudio que corresponden a un total de 2 a 3 cosechas consecutivas, mientras que en este trabajo los valores corresponden únicamente a una cosecha.

Para explicar las diferencias encontradas hay que considerar que incluso utilizando un mismo sustrato, la Eficiencia Biológica varía dependiendo de las condiciones del cultivo. Un aspecto fundamental es la humedad, tanto del sustrato contenido en el bloque como del ambiente, que juega un papel determinante en el crecimiento micelial y en el desarrollo de los primordios (Chang S.L. y Miles, P.G., 1989). La humedad está determinada por la fórmula del sustrato, el tamaño de las partículas y la cantidad de agua que pierde durante la incubación. El rango óptimo oscila entre 55 y 70% antes del tratamiento térmico (Fuzisawa et al., 1978; Fulimoto, 1987). Sin embargo, con la aparición de los primordios la humedad relativa debe incrementarse y mantenerse en un rango de 80-90 % ya que es la situación óptima que evita que los bloques se sequen demasiado rápido y puedan provocar abortos (Regés Dalmaú, 2008). En este trabajo, los valores del sustrato dentro de la bolsa se ajustaron a un contenido de agua dentro de este rango (65%). Lamentablemente, no se pudo mantener un elevada humedad ambiental durante el periodo de fructificación ya que la habitación de cultivo tenía dañado el sistema de humidificación y no

mantenía niveles de humedad por encima del 65%. Para ayudar a mantenerla se introdujo un tubo de pequeño diámetro en cada bloque por el que suministrar agua al sustrato cada tres días y se rociaba diariamente la superficie de los bloques con un spray. Sin embargo, no fue suficiente para mantener unas condiciones de humedad adecuadas durante un largo periodo de tiempo, lo que produjo una desecación de los tacos y tuvo que darse el ensayo por terminado. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos es muy probable que la baja humedad haya afectado negativamente al rendimiento de los sustratos y haya condicionado el resultado final.

Otro dato a tener en cuenta es el tamaño de las setas. *Lentinula edodes* produjo unos carpóforos grandes y robustos mientras que los de la Seta de Chopo eran endebles y por tanto, difíciles de comercializar. Nuevamente, es probable que las condiciones de cultivo influyeran también en la morfología de las Setas de Chopo producidas. La temperatura, afecta la velocidad de madurez y la densidad del sombrero de las setas. Mientras que la luz es necesaria para desarrollar el color de las setas (aumenta a medida que sube la temperatura), los niveles de dióxido de carbono deben mantenerse por debajo de los 1200 ppm (Tokimoto y Komatsu, 1982; Leatham, 1983) ya que por encima de este nivel se producen sombreros pequeños, no carnosos y talos alargados (Ando, 1976; Kawamura y Goto, 1980).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio de la producción de *L. edodes* sobre aserrín de eucalipto, se pone de manifiesto que su utilización como componente principal es factible siempre que sea suplementada con una fuente de energía adecuada (mijo, azúcar). En el caso de *A. aegerita*, aunque sea una especie que en la naturaleza crece y fructifica asociada a troncos de chopo, este estudio muestra que puede ser cultivada sobre aserrín de eucalipto, aunque es necesario llevar a cabo un estudio en mayor profundidad sobre los suplementos y las condiciones medioambientales que puedan favorecer en mayor medida su crecimiento y fructificación cuando es cultivada en bolsa.

Finalmente, cabe destacar un aspecto importante, que es la marcada eficiencia del proceso biotecnológico de producción de hongos comestibles en comparación con otros cultivos convencionales y agroindustriales para utilizar y convertir el agua y la energía en alimento humano. Se ha estimado que para producir 1 kg de hongos comestibles empleando tecnologías rústicas se requieren 28 L de agua, en un periodo de 25-30 días después de la inoculación. Esta cantidad y período de producción son mucho menores que las estimaciones para otros alimentos y forrajes, tales como la papa (500 L/kg), trigo y alfalfa (900 L/kg), sorgo (1,110 L/kg), maíz

(1,400 L/kg), arroz (1,912 L/kg), soya (2,000 L/kg), carne de pollo (3,500 L/kg) y carne de res (100,000 L/kg). Por consiguiente, se necesitan 3,571 veces más agua para producir 1 kg de carne de res, que para obtener 1 kg de hongos comestibles (Mora y Martínez Carrera, 2007).

Con base en lo anteriormente mencionado, puede establecerse que el papel de la biotecnología de producción de hongos saprófitos comestibles puede fortalecer la sostenibilidad agrícola mediante el aprovechamiento y reciclaje de subproductos forestales, permitiendo obtener un alimento humano socialmente aceptado de alto valor medicinal, proteínico, y comercial. Además, adaptar la producción a las condiciones de la zona en la que se va a cultivar el hongo saprófito puede ayudar a mejorar problemas de mercado y competitividad.

BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Ando M. 1976. *Fruit-body formation of *Lentinus edodes* on artificial media*. Mushroom Science, 9(1):415-422.
- ✓ Arias G, Gutiérrez C, Ospina CA. 2008. *Propuesta del cultivo de hongo *Pleurotus* y *Lentinula edodes* a partir de la biomasa del café en las fincas cafeteras de manizales para el fortalecimiento de los programas de desarrollo alternativo*. Cuadernos Lationamericanos de Administración. Vol. 4 – Pp. 35-67.
- ✓ Boa E. 2004. *Wild edible fungi. A global overview of their use and importance to people*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma.
- ✓ Chang ST. 1999. *Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: nongreen revolution*. International Journal of Medicinal Mushrooms. Vol. 1- Pp. 1-7.
- ✓ Chang ST, Miles PG. 1989. *Edible mushrooms and their cultivation*. CRC Press Inc., Boca Raton.
- ✓ Chen AW. 2005. *Shiitake Mushroom Cultivation*. Handbook 2. MushWord
- ✓ Delpech P, Olivier JM. 1991. *Cultivation of Shiitake on Straw based pasteurized substrates*. Mushroom Science. Vol. 12 – Pp. 523-528.
- ✓ FAO-FAOSTAT. 2005. *Base de Datos Estadísticos*. <http://faostat.fao.org>.
- ✓ Fulimoto T. 1987. *Method of inoculating mushroom basidiospores seed basidiospore bed for inoculation, culture container for seed basidiospore bed, and boring apparatus for host wood for inoculation*. US, Patent N° 4.646.465

- ✓ Fuzisawa N, Maedai A, Hattori K. 1978. Method for cultivation of *Lentinula edodes*. U. S. Patent No 4.038.144.
- ✓ Harris R. 1986. *Growing Shiitake Commercially*. Science Technology Publ. Madison.
- ✓ Iizuka C, Takeuchi M. 1978. *Method of artificially growing edible fungi*. U: S: Patent N° 4.071.973.
- ✓ Kalberer PP. 1987. *Experiments on the cultivation of shiitake (Lentinus edodes) on sawdust*. Mushroom Science, 12.
- ✓ Kasahara N, Shiota A, Kitaguchi I. 1976. Process for the growth and production of mushroom tissue. U. S. Patent No 3.940.883
- ✓ Kawamura N, Goto M. 1980. *Biochemical characteristics of the isolates of shiitake mushroom (Lentinus edodes)*. Rept. Tottori Mycology Institute 18:217-224.
- ✓ Kazuko E. 2006. *The Complete Book of Japanese Cooking*. Hermes House. London, UK.
- ✓ Kleinmamm-Klar D, Schwantes HO. 1980. *Lentinus edodes culture and fruit body formation*. Zeitsch Mycol. Vol. 46(1) – Pp. 31-34.
- ✓ Kosaka A, Wani T, Hattori Y, Yamashita A. 1982. *Effect of Lentinan administration of adrenalectomized rats and patients with breast cancer*. Gan To Kagaku Ryoho. Vol. 9 – Pp. 1474-1481.
- ✓ Leatham GF. 1983. *A chemically defined medium for the fruiting of Lentinus edodes*. Mycologia 75(5): 905-908.
- ✓ Leifa F, Pandey A, Soccol CR. 1999. *Growth of Lentinus edodes on coffee industry residues and fruiting body production*. In: Broderick A, Nair T (eds). *Mushroom Biology and mushroom products*. WSMBP, Sydney. Pp. 285-292.
- ✓ Longvah T, Dosthale YG. 1998. *Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India*. Food Chemistry. Vol. 63 – Pp. 331-334.
- ✓ Lou L. 1981. *Production of Black Mushroom (Lentinus edodes)*. Beijing Agricultural University;. Popular Science Publishing House. Beijing – China.
- ✓ Maroto JV. 1995. *Horticultura herbácea especial*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- ✓ Martínez-Carrera A, Aliphath M, Aguilar A, Bonilla M, Martínez W. 2000. *La biotecnología de los hongos comestibles en la seguridad y soberanía alimentaria de México*. II Foro Nacional sobre Seguridad y Soberanía Alimentaria. Academia Mexicana de Ciencias-CONACYT. Mexico DF. Pp. 193-207.

- ✓ Mata G, Gaitán-Hernández R. 1994. *Avances en el cultivo del Shiitake en pulpa de café*. Revista Iberoamericana de Micología. Vol. 11 – Pp. 90-91.
- ✓ Mata G, Savoie JM, 1998. *Extracellular enzyme activities in six Lentinula edodes strains during cultivation in wheat Straw*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 14 – Pp. 513-519.
- ✓ Miller MW, Jong SC. 1987. *Commercial cultivation and shiitake in sawdust filled plastic bags*. En: Cultivation Edible Fungi, Wuest Pj, Royse Dj, Beelman RB (eds.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam. Pp. 421-426. Pages 421-426.
- ✓ Mizuno T. 1995. *Shiitake, Lentinus edodes: functional properties for medicinal and food purposes*. Food Reviews International. Vol. 11 – Pp. 111-128.
- ✓ Mora VM, Martínez Carrera D. 2007. Investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas (*Pleurotus*) en México. *El cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. Sánchez JE, Martínez D, Mata G, Leal H (eds.). ECOSUR, México.
- ✓ Murata H, Yamauchi M, Tanaka H. 1987. *Process of shiitake (Lentinus edodes) cultivation*. U. S. Patent N° 4.674.228.
- ✓ Ngai PHK, Ng TB. 2003. *Lentin, a novel and potent antifungal protein from shiitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells*. Life Sciences. Vol. 73 – Pp. 3363-3374.
- ✓ Pegler DN. 1983. *The genus Lentinula (Tricholomataceae tribe Collybieae)*. Sydowia 36: 227–239.
- ✓ Pellinen M, Mälkki Y, Niiskanen A. 1987. *Method of growing edible mushrooms*. US. Patent No 4.637.163.
- ✓ Philippoussis A, Diamantopoulou P, Zervakis G. 2003. *Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the Shiitake mushroom Lentinula edodes*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, ISSN 1573–0972, 19(6), 551–557.
- ✓ Regés Dalmaú R. 2008. *Shiitake. Curso General para el cultivo de Hongos, 6° parte*. Copyright C. D. E. E. A., San Andrés.
- ✓ Royse DJ. 1985. *Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of the shiitake mushroom*. Mycologia. Vol. 77(5) – Pp. 756-762.
- ✓ Royse DJ, Schisler LC, Diehle DA. 1985. *Shiitake mushrooms, consumption, production and cultivation*. Interdisc. Science Review. Vol. 10(4) – Pp. 329-335.

- ✓ Salmones D, Mata G, Ramos ML, Waliszewski. 1999. *Cultivation of shiitake mushroom, Lentinula edodes, in several lignocellulosic materials originating from the subtropics*. Agronomie. Vol. 19 – Pp. 13-19.
- ✓ Sánchez JA, Flórez J, Sierra JL, Guerra B, Chamorro M. 2005. *Los hongos. Manual y Guía didáctica de la micología*. IRMA
- ✓ Sasaki SH, Linhares REC, Nozawa CM, Moltalván R, Paccola-Meireles LD. 2001. *Strains of Lentinula edodes suppress growth of phytopathogenic fungi and inhibit Alagoas serotype of vesicular stomatitis virus*. Brazilian Journal of Microbiology. Vol. 32 – Pp. 52-55.
- ✓ Sasaki T, Takasuka N, Chihara G, Maeda YY. 1976. *Antitumor activity of degraded products of Lentinan: Its correlation with molecular weight*. Gann. Vol. 67 – Pp. 191-195.
- ✓ Sierra JL, López TM, Eiroa JA. 2002. *Lo que usted debe saber de setas cultivadas*. Sociedad Micológica Leonesa "San Jorge". Imprenta Rubín, León.
- ✓ Silva ES, Cavallazzi JRP, Muller G, Souza JVZ. 2007. *Biotechnological applications of Lentinus edodes*. Journal of Food, Agriculture Environment. Vol. 5 – Pp. 403-407.
- ✓ Singer R. 1961. *Mushrooms and Truffles: Botany, Cultivation and Utilization*. Interscience Publishers; New York – EE. UU.
- ✓ Suarez, C. y M. Stella Honguín. 2011. *Evaluación de medios de cultivo sintéticos y cereales para la producción de semilla de setas comestibles*. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas. Gerard Fischer (eds). Vol. 5 - No. 1 - Pp. 130-140.
- ✓ Taguchi, T. 1983. *Effects of lentinan in advanced or recurrent cases of gastric, colorectal, and breast cancer*. Gan To Kagaku Ryoho. Vol. 10 – Pp. 387- 393.
- ✓ Tokimoto K, Komatsu M. 1982. *Influence of temperature on mycelia growth and primordium formation in Lentinus edodes*; Trans. Mycologi Society Japan. 23: 385-390.
- ✓ Tritatana S, Tantikanjan T. 1987. *Effects of some environmental factors on the morphology and yield of Lentinus edodes (Berk.) Sing*. Mushroom Science.
- ✓ Villegas V, Milena A, Arredondo C. 2008. *Evaluación de la producción del hongo Lentinula edodes Pegler en bloques sintéticos a base de residuos agroindustriales*. Ingeniería y Ciencia. Vol. 3 – Pp. 23-39.
- ✓ Wasser, S. P. & A. L. Weis. 1999. *Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review)*. International Journal of Medicinal Mushrooms. Vol. 1 – Pp. 31-62.
- ✓ Zhong J J, Bai F W, Zhang W. 2009. *Biotechnology in China I: From Bioreaction to Bioseparation and Bioremediation*. Springer