

**EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DEL HONGO *Lentinula edodes* Berk Pegler EN  
RESIDUOS AGROINDUSTRIALES**

**CLARA ALEJANDRA ARREDONDO PEÑA**

**ANA MILENA PEREZ MARTINEZ**

**UNIVERSIDAD EAFIT**

**ESCUELA DE INGENIERIAS**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERIA DE PROCESOS**

**MEDELLIN**

**2007**

**EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DEL HONGO *Lentinula edodes* Pegler EN  
RESIDUOS AGROINDUSTRIALES**

**CLARA ALEJANDRA ARREDONDO PEÑA**

**ANA MILENA PEREZ MARTINEZ**

**Trabajo De Grado Para Optar Por El Titulo De Ingeniera De Procesos**

**Asesora:**

**MRes. Valeska Villegas**

**Ingeniera Química**

**UNIVERSIDAD EAFIT**

**ESCUELA DE INGENIERIAS**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERIA DE PROCESOS**

**MEDELLIN**

**2007**

Nota de aceptación

-----  
-----  
-----  
-----

Jurado

-----

Jurado

-----

Jurado

Medellín, Abril de 2007

*Ana Milena*

*A mis padres por su apoyo económico y moral durante mi carrera.*

*A Dios por haberme dado la oportunidad de llegar hasta este momento tan importante en mi vida.*

*A mi novio, Chucho por esas palabras de aliento en los momentos difíciles durante el desarrollo de este proyecto.*

*A clara que más que mi compañera de Tesis es mi amiga incondicional y que en el desarrollo de este trabajo me di cuenta que la amistad es muy fuerte porque en los momentos de estrés no faltaron las risas que nos dieron energías para continuar.*

Clara Alejandra

*Al Ser más importante de mi vida: Jesús. Que con su inmenso amor por mi, me acompañó poderoso y fiel durante mi trabajada carrera.*

*A mi mamá que con su cuidado y sacrificios me apoyó para llegar hasta aquí.*

*A mi papa que con su ejemplo de disciplina y orden aportó a lo que hoy soy como persona.*

*A mi abuelita Clarita quien con su amor y paciencia estuvo pendiente del apoyo que necesite para continuar con mis estudios.*

*A mis tíos Marco Tulio Arredondo, Jaime Arredondo, Oscar Alberto Arredondo, Ana Victoria Arredondo que a pesar de sus responsabilidades siempre estuvieron dispuestos a ayudarme.*

*Al departamento de Desarrollo Humano de la Universidad Eafit, Angela Echeverri, quienes aportaron a la culminación de mis estudios.*

*A Doña Lucia, Don Rodrigo, la tía Amparo y el tío Bush que me adoptaron y apoyaron como parte de su familia.*

*A Mile, que con la prueba de fuego que es esta tesis, me demostró su firmeza en nuestra amistad y el gran equipo de trabajo que somos. Gracias por tu paciencia y apoyo.*

*A Naty Alzate un regalo de Dios, a quien considero mi hermana y amiga.*

*A mis sobrinos a quienes amo y son fuente de inspiración al desear ser un ejemplo de constancia para ellos.*

## **Agradecimientos**

Las autoras del presente trabajo desean expresar lo más sinceros agradecimientos a las personas que contribuyeron de manera significativa a la realización de este proyecto:

- MRes. Valeska Villegas
- Felipe Caney y Raul Arango.
- Rodrigo Moreno
- Sigifredo Cardenas
- Personal de la Universidad EAFIT sede Llano grande: Mario Vargas, los jardineros Alberto y Oscar, y Estelita.
- A las personas que de una u otra forma colaboraron con este proyecto: Lucia Martínez, Rodrigo Pérez, Fabiola Peña, Sara Arredondo, Alejandro Restrepo, Yon Fredy Ramírez, Natalia Andrea Álzate, Mónica Andrea Borda, Judith Pérez, Liliam Pérez
- A nuestros jefes y empresas: PETPACK S.A, Juan José Restrepo; TECNIESENCIAS DE COLOMBIA S.A, Anabella Bonells, RCH COSMETICA S.A, Jorge Pérez.

## CONTENIDO

LISTA DE TABLAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE ANEXOS .....	xiii
INTRODUCCIÓN .....	xvi
1. OBJETIVO .....	18
1.1. OBJETIVOS ESPEÍFICOS .....	18
2. MARCO REFERENCIAL .....	20
2.1. GENERALIDADES DEL SHIITAKE .....	20
2.2. DESCRIPCIÓN .....	20
2.2.1. Sombrero o píleo .....	21
2.2.2. Himenio .....	21
2.2.3. Pie .....	21
2.2.4. Anillo O Velo .....	21
2.2.5. Volva .....	22
2.2.6. Micelio .....	22
2.3. COMPOSICION .....	23
2.4. PRODUCCIÓN Y CULTIVO .....	25
2.4.1. Cultivo en troncos: .....	26
2.4.2. Cultivo en bolsas o sustratos esterilizados .....	26
2.5. APLICACIONES Y USOS .....	31
2.6. MERCADO .....	32
2.7. ESTADO DEL ARTE: PRODUCCION DE SHIITAKE .....	33

2.8.	COMPONENTES IMPORTANTES EN EL SUSTRATO .....	36
2.8.1.	Sulfato de calcio: .....	36
2.8.2.	Carbonato de calcio:.....	37
2.8.3.	Nitrógeno:.....	37
2.8.4.	Maderas duras.....	38
2.9.	FACTORES DE CONTAMINACIÓN.....	39
3.	METODOLOGIA.....	40
3.1.	UBICACIÓN .....	40
3.2.	MICROORGANISMO .....	40
3.3.	MATERIALES .....	40
3.4.	REACTIVOS .....	42
3.5.	FORMACIÓN DE LA “SEMILLA”:	43
3.5.1.	Producción de micelio generación 2 en cajas Petri: .....	43
3.5.2.	Obtención de la “semilla”: .....	46
3.6.	PRODUCCION DE CUERPOS FRUCTIFEROS: .....	50
3.6.1.	Diseño de experimentos: .....	50
3.6.2.	Preparación de los sustratos. ....	50
3.6.3.	Siembra de la “semilla”: .....	51
3.6.4.	Adecuación de la salas de incubación y fructificación.....	52
3.6.5.	Choque térmico: .....	53
3.6.6.	Análisis bromatológicos. ....	53
3.6.7.	Resultados y análisis estadístico: .....	55
4.	RESULTADOS Y ANALISIS .....	56
4.1.	CRECIMIENTO DE <i>L. edodes</i> EN MEDIOS AGARIZADOS.....	56



4.2.	OBTENCION DE LA SEMILLA.....	61
4.3.	PRODUCCION DE CUERPOS FRUCTIFEROS .....	65
4.3.1.	Tiempo de colonización del sustrato:.....	65
4.3.2.	Producción de cuerpos fructíferos .....	74
4.3.3.	Análisis de los estudios bromatológicos.....	78
5.	CONCLUSIONES.....	84
6.	RECOMENDACIONES.....	86
	BIBLIOGRAFÍA Y CIBERGRAFÍA .....	88
	ANEXOS .....	98

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición del shiitake (Centro de Estudios Ecológicos Argentino, 1999) .....	24
Tabla 2. Compuestos del shiitake y su función. (Centro de Estudios Ecológicos Argentino, 1999) .....	24
Tabla 3. Parámetros de crecimiento (Stamets y Chilton, 1983).....	30
Tabla 4. Diseño de experimentos para producción de micelio en medios de cultivo agarizados.....	44
Tabla 5. Composición de los medios sólidos agarizados. ....	45
Tabla 6. Mezclas de sustratos para la obtención de “semilla” .....	46
Tabla 7. Componentes del medio de cultivo para la fermentación líquida .....	47
Tabla 8. Condiciones ambientales en el cuarto de incubación y fructificación.....	52
Tabla 9. Valores de la velocidad resultantes de las regresiones para los 18 tratamientos en el análisis del crecimiento del hongo <i>Lentinula edodes</i> en medios agarizados. ....	57
Tabla 10. Tabla de valores de la velocidad para los 4 tratamientos del segundo experimento con medios agarizados.....	59
Tabla 11. Calidad de micelio de <i>L. edodes</i> en diferentes sustratos para la producción de “semilla” .....	62
Tabla 12. Porcentaje de colonización del micelio de <i>L. edodes</i> en diferentes sustratos para la producción de “semilla” .....	62
Tabla 13. Ecuaciones que describen la relación entre pares de componentes independientes entre si.....	71
Tabla 14. Composición de los tratamientos 1, 11, 43 y 54 .....	75
Tabla 15. Eficiencia biológica, tamaño de píleo, rendimiento y precocidad de colonización para los tratamientos con cosecha.....	76
Tabla 16. Distribución de la relación C:N para los diferentes tratamientos.....	79
Tabla 17. Composición química hongos cosechados de los tratamientos 1 y 11* .....	79

Tabla 18. Porcentaje de Ca, Cenizas y humedad en el hongo <i>L.edodes</i> Manzi <i>et al.</i> , 1999* .....	81
Tabla 19. Composición química bloque 11 después de la cosecha* .....	82

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de un basidioma.....	20
Figura 2: Foto de <i>Lentinula edodes</i> (Centro de estudios ecológicos Argentino. 1999).....	22
Figura 3. Cultivo en troncos naturales (Lang, 2006).....	23
Figura 4. Bloques inoculados con semilla de <i>L.edodes</i> .....	51
Figura 5. Estanterías para la incubación y fructificación de <i>L. edodes</i> . ....	52
Figura 6. Crecimiento de <i>L. edodes</i> en medios de cultivo agarizados.....	56
Figura 7. Obtención de “semilla” en sustratos de trigo (T) y viruta de eucalipto (V).....	61
Figura 8. Tiempos de colonización de <i>L. edodes</i> en los diferentes sustratos. ....	73
Figura 9. Contaminación de bloques con <i>Trichoderma harzianum</i> .....	74
Figura 10. Cuerpos fructíferos del bloque # 11.. ....	78

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Diseño de experimentos para la producción de cuerpos fructíferos .....	98
Anexo 2. Análisis bromatológicos .....	100
Anexo 3. Composición de los componentes de los sustratos para la producción de cuerpos fructíferos. ....	105
Anexo 4. Relación Carbono/ Nitrógeno para los compuestos de los sustratos para la obtención de cuerpos fructíferos. ....	105
Anexo 5. Graficas de Cada tratamiento del análisis del crecimiento del hongo en medio agarizado con el promedio de los diámetros de las tres replicas y su correspondiente error estándar (Excel). ....	106
Anexo 6. Tabla ANOVA para Velocidad de crecimiento por Tratamiento.....	115
Anexo 7. Intervalos LSD para el factor tratamiento .....	115
Anexo 8. Análisis de varianza multifactorial para la velocidad de crecimiento por variaciones en el medio agarizado. ....	115
Anexo 9. Intervalos LSD para el factor valores de pH.....	116
Anexo 10. Intervalos LSD para el factor % de aserrín.....	116
Anexo 11. Intervalos LSD para el factor tipo de medio .....	117
Anexo 12. Tabla de análisis de varianza para la velocidad de crecimiento por % de aserrín y tipo de medio. ....	117
Anexo 13. Tabla ANOVA para la densidad de micelio por Tratamiento. ....	117
Anexo 14. Intervalos LSD para densidad de micelio por tratamiento .....	118
Anexo 15. Tabla ANOVA para días de colonización por Tratamiento .....	118
Anexo 16. Intervalos LSD para días de colonización por tratamiento.....	119
Anexo 17. Tabla ANOVA para días de colonización del bloque por Tipo de formulación	119
Anexo 18. Comparación entre modelos de regresión para el residuo del cacao, el residuo del algodón, la viruta y el cacao con respecto a los días de colonización del bloque. ....	119

Anexo 19. Coeficientes para la regresión de días colonización bloque vs la cascarilla de cacao.....	120
Anexo 20. Análisis de varianza para la cascarilla de cacao .....	120
Anexo 21. Coeficientes para la regresión de días colonización bloque vs la motosa de algodón.....	120
Anexo 22. Análisis de varianza para la motosa de algodón. ....	121
Anexo 23. Coeficientes para la regresión de días colonización bloque vs viruta de roble .....	121
Anexo 24. Análisis de varianza para la viruta de roble. ....	121
Anexo 25. Coeficientes para la regresión de los días colonización bloque vs trigo. ....	121
Anexo 26. Análisis de varianza para el trigo. ....	121
Anexo 27. Análisis de regresión múltiple para los días de colonización del bloque por Viruta de roble, motosa de algodón, cascarilla de cacao y salvado de trigo.....	122
Anexo 28. Matriz de correlación para la viruta de roble, motosa de algodón, cascarilla de cacao y salvado de trigo .....	122
Anexo 29. Tabla de análisis de regresión múltiple para los días de colonización del bloque, Viruta de roble, motosa de algodón y cascarilla cacao .....	122
Anexo 30. Matriz de correlación viruta de roble, motosa de algodón y cascarilla cacao	123
Anexo 31. Análisis de regresión múltiple para los días de colonización del bloque, Viruta y motosa de algodón. ....	123
Anexo 32. Matriz de correlación viruta y motosa de algodón. ....	123
Anexo 33. Tabla ANOVA para el tamaño del píleo por tratamiento aplicado.....	123
Anexo 34. Intervalos LSD para el tamaño del píleo por tratamiento.....	124
Anexo 35. Tabla ANOVA para precocidad de colonización por Tratamiento aplicado....	124
Anexo 36. Intervalos LSD para precocidad de colonización por Tratamiento aplicado...	124
Anexo 37. Tabla ANOVA para rendimiento y tratamiento aplicado .....	125
Anexo 38. Intervalos LSD para rendimiento por tratamiento aplicado .....	125

Anexo 39. Tabla ANOVA para Eficiencia biológica y Tratamiento aplicado.....	126
Anexo 40. Intervalos LSD para Eficiencia biológica y Tratamiento aplicado.....	127
Anexo 41. Diseño de un cuarto de fructificación. ....	127

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de shiitake se ha incrementado en los últimos años con el uso de bloques artificiales de aserrín y/o de residuos agrícolas suplementados con fuentes de carbono y nitrógeno. Estos ofrecen ventajas importantes con respecto a la producción en troncos naturales debido a que la producción se incrementa y es continua durante todo el año, y se disminuye el tiempo de cosecha (Royse *et al.*, 1990). Este cultivo ha tomado gran importancia en la economía agrícola de países templados y subtropicales; puesto que valoriza los residuos agrícolas de cereales, café, cacao, algodón, cacahuete, uva entre otros (Philippoussis *et al.*, 2003).

La mayoría de los estudios realizados con *L. edodes* a nivel internacional apuntan hacia la evaluación de medios de cultivo y sustratos que proporcionen las mejores condiciones de crecimiento del hongo y que ayuden a darle el mejor contenido nutricional para que pueda ser luego evaluado por sus propiedades alimenticias y medicinales. (Royse y Sánchez, 2000).

Hasta el momento, entre los estudios realizados y publicados en Colombia para buscar la forma de adecuar esta técnica de cultivo a las condiciones del país, se cuenta con el de Fung *et al.*, 2003 y Jaramillo y Rodríguez, 2001. Ambos arrojan resultados luego de una investigación con diferentes desechos agroindustriales como sustratos y bajo concentraciones fijas, procesos y condiciones adecuadas. Estas investigaciones, a escala de laboratorio, han tenido como objetivo determinar, entre cierto número de residuos agroindustriales (cascarilla de algodón, bagazo de caña de azúcar, cisco de café y fibrilla de coco) y residuos de madera (aserrín de roble, de eucalipto, y de pino), el mejor sustrato para la obtención del hongo (Fung *et al.*, 2003) y estudiar el comportamiento de un desecho (borra de café) como sustrato en el cultivo de shiitake (Jaramillo y Rodríguez, 2001). El valor de estos estudios es alto, pero se entiende que para generar procesos agroindustriales productivos es necesario, más que estudiar los desechos como sustratos,



optimizar su rendimiento mediante evaluaciones de diferentes concentraciones de éstos dentro de la formulación del bloque artificial.

El cultivo en bloques artificiales implica la formulación apropiada del sustrato y un preciso control de las condiciones de crecimiento. (Royse & Bahler, 1986; Sabota, 1996; Chen *et al.*, 2000), teniendo en cuenta esto, el objetivo del presente proyecto fue evaluar el crecimiento del hongo *L. edodes* en diferentes combinaciones de sustratos entre los cuales se encuentran algunos residuos estudiados y publicados como lo son la motosa de algodón (Fung *et al.*, 2003) y algunos desechos con estudios preliminares, mas no publicados, como la cáscara de la semilla de cacao.

## 1. OBJETIVO

Evaluar, a escala de laboratorio, el crecimiento de *Lentinula edodes* (shiitake) por medio de una fermentación sólida en diferentes mezclas de residuos agroindustriales y aserrín de eucalipto, con el fin de identificar la combinación que proporcione las condiciones más satisfactorias de crecimiento y aporte a las características nutricionales del hongo.

### 1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para que se cumpla el objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Identificar en cuál medio de cultivo el hongo crece mas rápido haciendo un seguimiento del crecimiento radial del micelio de siembra en caja Petri.
- Usar el mejor micelio de siembra para definir cual proporción de aserrín de eucalipto – trigo (0- 100, 100-0, 50-50, 80-20, 20-80) presenta mayor rapidez de colonización del hongo, midiendo el tiempo transcurrido entre la inoculación del medio hasta la obtención de la semilla (frasco de color blanco).
- Analizar la capacidad del hongo *L. edodes* para aprovechar el sustrato para la fructificación, calculando la eficiencia biológica del hongo sobre sustratos preparados con diferentes mezclas a base de residuos agrícolas por

medio de la relación (Kg. Cosecha húmedo / Kg. de sustrato peso seco) X 100%.

- Identificar el sustrato donde se desarrolla con mayor rapidez el cuerpo fructífero del hongo, estimando la precocidad de colonización (tiempo transcurrido entre la inoculación de la semilla al sustrato y el día en que aparecen los primeros carpóforos) en los diferentes sustratos.
- Diferenciar, entre los sustratos de menor tiempo en el desarrollo del cuerpo fructífero, el que genera el hongo de mayor calidad (tamaño de píleo y alto valor nutricional), por medio del seguimiento del tamaño del píleo en el tiempo y un estudio bromatológico al hongo para identificar la producción más rica en nutrientes.

## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1. GENERALIDADES DEL SHIITAKE

De las 676 especies de hongos comestibles (Fung *et al.*, 2003) que existen en el mundo, el hongo shiitake es uno de los de mayor interés económico, ya que presenta atractivas oportunidades de mercado, por su alto valor nutricional y sus propiedades medicinales.

Su nombre científico es *Lentinula edodes* (Berk) Pegler, descripción en latín a su forma de lente y "edodes" por comestible, es un hongo descomponedor de madera, típicamente saprofito, generalmente crece en troncos de árboles caídos del Japón, China y otros países asiáticos (Stamets y Chilton 1983).

### 2.2. DESCRIPCIÓN

De manera general la estructura de los hongos (basidiomas) están conformada por un sombrero o píleo, una lamina, una laminilla, un himenio, un anillo, un pie, una volva y el micelio (Figura 1) (Toharia, 1985)

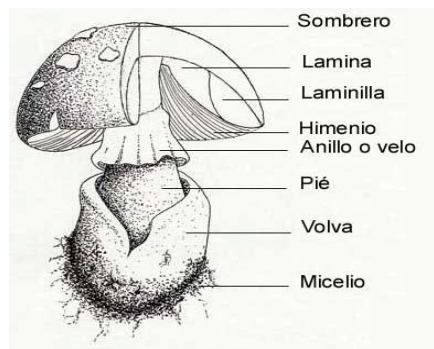


Figura 1: Esquema de un basidioma

### **2.2.1. Sombrero o píleo**

Es la parte superior y más carnosa del hongo, puede tener varias formas: redondeada, plana e incluso ahuecada hacia el interior como un embudo. Sus bordes pueden ser lisos o festoneados, con la cutícula (piel que cubre el sombrero) levantada ó agrietada e incluso con placas o verrugas en la parte superior. (Toharia, 1985)

### **2.2.2. Himenio**

Parte fértil ó reproductora del hongo, que contiene esporas y se encuentra debajo del sombrero. La estructura más común es en forma de laminillas, aunque también puede presentarse como tubos, arrugas o venosidades, o agujas. (Toharia, 1985)

### **2.2.3. Pie ó estípite**

Parte del hongo que soporta el sombrero, y puede tener diversas formas: grueso, fino, corto, abombado, retorcido, excéntrico, estas características son las que permiten clasificar las especies de hongos. (Toharia, 1985)

### **2.2.4. Anillo O Velo**

Parte encargada de proteger el himenio cuando el hongo esta joven y puede ser doble, sencillo y caído. (Toharia, 1985)

### 2.2.5. Volva

Es el resto del velo que cubre originariamente a algunas especies al momento de fructificar, que posteriormente puede quedarse encima del sombrero (como verruguitas), en el borde (como cortina), en el pie (como anillo) y en la base del pie (como volva). (Toharia, 1985)

### 2.2.6. Micelio

El Micelio es el conjunto de filamentos microscópicamente delgados, en forma de hilos llamados hifas. Las hifas pueden presentar septos, si los tabiques están ausentes se habla de micelio continuo. (Toharia, 1985)

El shiitake tiene un sombrero de 5-25 cm. de ancho, el cual es hemisférico, y se ensancha de manera convexa, es de color café oscuro, casi negro al principio (figura 2); comienza a ser café claro con la edad, ó cuando está seco y es enrollado al inicio, luego encorvado, plano en la maduración y frecuentemente ondulado con la edad. Las laminillas son blanquecinas, lisas al principio y con la edad comienzan a ser serradas ó irregulares. El pie es central, corto y usualmente se encuentra cubierto por pequeñas escamas fibrosas. (Stamets, 2000)

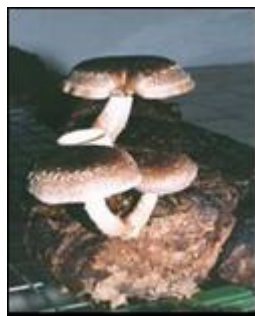


Figura 2: Foto de *Lentinula edodes* (Centro de estudios ecológicos Argentino. 1999)

### 2.3. COMPOSICION

Este hongo crece naturalmente en troncos de árboles de hoja ancha particularmente en el Shii y otros árboles asiáticos como roble y haya (figura 3). Aunque ocasionalmente puede crecer en troncos muertos, el shiitake es un hongo saprofita ya que se aprovecha solamente del tejido necrótico (Stamets, 2000).



Figura 3. Cultivo en troncos naturales (Lang, 2006)

Como se muestra en la Tabla 1 el shiitake contiene proteínas, grasas, carbohidratos, fibra soluble, vitaminas y minerales. En el cuerpo fructífero se encuentra el componente clave del shiitake que es un polisacárido llamado LENTINAN, el cual estimula a un tipo específico de glóbulos blancos llamados linfocitos T, potenciando la función del sistema inmune en infecciones cancerosas. En la Tabla 2 se muestran los principales compuestos activos de este hongo. (Centro de Estudios Ecológicos Argentino, 1999)

Entre otros compuestos importantes se encuentran el Interferón (hace a las células inmunes a infecciones víricas); el ergosterol (precursor de la vitamina D); la prostaglandina (producto de la transformación, en el cuerpo, del ácido linoleico presente en el hongo); antioxidantes (la enzima súper óxido dismutasa del shiitake, disminuye la peroxidación de lípidos); el zinc (aumenta los niveles de testosterona en plasma y la cantidad de esperma) y la quitina (80% de la fibra presente en el shiitake es este polisacárido: reduce el nivel de colesterol en la sangre). Además de esto hay cerca de 50 enzimas localizadas en el shiitake: celulasa, enzimas digestivas y asparaginasa (Centro de Estudios Ecológicos Argentino. 1999).

**Tabla 1. Composición del shiitake (Centro de Estudios Ecológicos Argentino, 1999)**

<b>FACTOR NUTRICIONAL</b>	<b>CONTENIDO*</b>
Calorías	39
Proteína	15-35 %
Colesterol	1 gr.
Carbohidratos	7.3 gr.
Fibra	8 gr.
Vitamina D2	200 i.u.
Tiamina	0.8 mg
Riboflavina	0.5 mg.
Niacina	5.5 mg.

\*Composición nutricional por cada 100 gr. de hongo peso seco.

**Tabla 2. Compuestos del shiitake y su función. (Centro de Estudios Ecológicos Argentino, 1999)**

<b>COMPUESTO</b>	<b>FUNCIÓN</b>
Nucleótidos o derivados	Inhibidor de agregación de ácidos nucleicos. Plaquetaria
Eritadenina	Hipolipidémico



<b>COMPUESTO</b>	<b>FUNCIÓN</b>
C-1-2 (polisacárido)	Inmunoactivo
Lectina	Inmunoactivo
Lentinan (polisacárido)	Inmunoactivo
Emitanina (polisacárido)	Inmunoactivo
EP3 (lignina)	Antiviral, inmunoactivo
KS-2, KS-2-B (péptido)	Antiviral, inmunoactivo antibacterial
Poli ribonucleótidos	Inmunoactivo
Ac2p (polisacárido)	Antiviral
FBP (proteína)	Antiviral
Thioprolina (TCA)	Eliminador de nitritos (aminoácido)

#### **2.4. PRODUCCIÓN Y CULTIVO**

La producción de hongos representa una importante alternativa para la utilización de desechos ricos en lignocelulosa, material que representa cerca del 40% de la biomasa producida por la fotosíntesis y que no puede ser aprovechada en forma directa para la alimentación humana y animal, debido a su baja digestión. El cultivo de los hongos representan un proceso de bioconversión de estos desecho, que ofrece un alternativa nutricional, porque los cuerpos fructíferos de los hongos contienen altos porcentajes de carbohidratos y de proteínas y su valor alimenticio es tan alto como la de los frijoles (Brisko *et al.*, 2002).

En Asia el shiitake ha sido tradicionalmente cultivado en troncos de madera dura, sin embargo recientemente en Europa y Estados Unidos se ha empleado el sistema de producción en bloques artificiales. (Cavallazzi *et al.*, 2004)

#### **2.4.1. Cultivo en troncos:**

Este cultivo fue desarrollado en Japón y China hace más de un milenio, todavía algunos cultivadores utilizan este tipo de cultivo en sus jardines para venderlo a los supermercados (Stamets, 2000).

La ventaja del cultivo en troncos es que es un método natural, pero requiere una labor intensiva y se considera un método estacional; puesto que no en todas las épocas del año se puede inocular y recoger cosecha. (Stamets, 2000)

#### **2.4.2. Cultivo en bolsas o sustratos esterilizados**

El aserrín de la madera dura es mundialmente el ingrediente básico más popular usado en formulaciones sintéticas de los sustratos (Royse, 1995; Smith, 1997). El cultivo de shiitake se ha incrementado en los últimos años con el uso de bloques artificiales de aserrín y/o de residuos agrícolas ya que ofrece ventajas importantes con respecto a la producción en troncos naturales. Entre ellas se encuentran la posibilidad de una producción continua a lo largo de todo el año, un incremento en la producción, y una disminución en el tiempo de cosecha (Royse *et al.*, 1990). Estas ventajas superan la desventaja del alto costo inicial de inversión en la compra de una autoclave industrial y el equipamiento de los recintos de cultivo. Otra ventaja que tiene este cultivo es que valoriza los residuos agrícolas (e.g. cereales, café, cacao, algodón, cacahuete, uva, etc.), lo cual ha tomado gran importancia en la economía agrícola de países templados y subtropicales (Philippoussis *et al.*, 2003).

El cultivo en bloques artificiales implica la formulación apropiada del sustrato y un preciso control de las condiciones de crecimiento. (Royse y Bahler, 1986; Sabota, 1996; Chen *et*

al., 2000). Además, es importante considerar que la velocidad en el desarrollo micelial depende del suministro de oxígeno, el cual se debe a los espacios de aire presentes en el sustrato y a la pequeña perforación en la parte frontal de la bolsa tapada con microporo. (Leatham y Stahmann, 1987; Donoghue y Deninson, 1995; Royse y Sanchez, 2000).

Las especies de hongos que más se cultivan en el mundo son el champiñón de París cuyo nombre científico es *Agaricus bisporus* (*A. brunnescens*), las girgolas u hongos ostras (especies del género *Pleurotus*) y el shiitake u hongo japonés (*Lentinula edodes*). (Universidad Nacional General San Martín, 2005).

#### ***Etapas del cultivo en bloques sintéticos:***

- Preparación del sustrato: mezcla de materiales donde crecerán los hongos.
- Desinfección, pasteurización o esterilización: el sustrato una vez preparado debe esterilizarse para garantizar la no competencia del sustrato por otros microorganismos. Generalmente se realizan tratamientos térmicos.
- Semilla o inóculo: Se adquiere en diferentes laboratorios o puede ser producido en el mismo establecimiento.
- Siembra: en esta etapa se mezcla el sustrato con el inóculo o semilla.
- Incubación: el sustrato sembrado es colocado en bolsas o en cajones a la oscuridad a 25 °C durante 30 a 60 días aproximadamente.
- Inducción: con un descenso de la temperatura (15-18 °C) y en algunos casos mediante luz natural se logra que el hongo pase de la etapa de crecimiento vegetativo a la de fructificación o producción.
- Producción: durante esta etapa se debe regar y cosechar. Los hongos generalmente se producen en oleadas, de tal modo que, al cabo de una semana se cosecha todo lo producido por bolsa o cajón y comienzan a desarrollarse tardando nuevamente una semana en llegar al estado adulto.

- Descarte: luego de finalizadas las cosechas el sustrato se descarta y se debe comenzar el ciclo nuevamente. (Universidad Nacional General San Martín.2005)

### ***Parámetros de crecimiento***

A un nivel más detallado y enfocado hacia el crecimiento del hongo, se encuentran las siguientes etapas y parámetros de crecimiento correspondientes:

- Incubación

Comprende desde el mismo día de la inoculación hasta que se evidencia la presencia de ampollas en las bolsas o “popcorning” y los primeros síntomas de coloración café (que evidencia que el primordio está próximo a formarse), (Stamets y Chilton, 1983).

- ✓ pH inicial: 5.5-5.6
- ✓ Temperatura de incubación: 21-27°C
- ✓ Humedad relativa: 95-100%
- ✓ Duración: 25-35 días
- ✓ Concentración de CO<sub>2</sub>: >10.000 ppm
- ✓ Intercambio de aire fresco: 0-1 volumen de aire/hora
- ✓ Requerimiento de luz: 50-100 Lux. Es el ideal, pero antes de la fructificación puede descender a 35-45 Lux.

- Browning o formación de micoderma café

Este periodo se da una vez se halla colonizado todo el sustrato y el metabolismo del interior del bloque halla comenzado a disminuir (se evidencia por la disminución de la temperatura del núcleo). Se caracteriza por la formación, al principio, de unas ampollas (popcorning) y posteriormente de una coloración café (micoderma café) que sirve de escudo protector del bloque para evitar la deshidratación. (Stamets y Chilton, 1983)

- ✓ Temperatura: 10 - 21°C

- ✓ Humedad relativa: > 90%
- ✓ Duración: 20-30 días
- ✓ Concentración de CO<sub>2</sub>: < 1.000 ppm
- ✓ Requerimiento de luz: 50-100 Lux.

- Formación de primordios

Comprende desde el “popcorning” hasta la formación de los primeros primordios. Una vez se evidencie el popcorning, se realice un choque térmico sumergiendo los bloques en agua a 5-16°C durante 12 a 24 horas o reduciendo la temperatura ambiental (destaparlos durante la noche) ó enfriándolos a 4-8°C durante 12-24 horas, en nevera. (Stamets y Chilton, 1983)

- ✓ pH inicial: 4.2-4.6
- ✓ Temperatura de iniciación: 10-16°C para cepas de clima frío, 16-21°C para cepas de clima caliente.
- ✓ Humedad relativa: 95-100%
- ✓ Duración: 5-7 días
- ✓ Concentración de CO<sub>2</sub>: <1000 ppm
- ✓ Intercambio de aire fresco: 4 -7 volumen de aire/hora
- ✓ Requerimientos de luz: 500-2000 Lux.

- Desarrollo del cuerpo fructífero y cosecha (Stamets y Chilton, 1983)

- ✓ Temperatura: 16-18°C cepas de clima frío; 21-27°C cepas de clima cálido
- ✓ Humedad relativa: 60-80%
- ✓ Duración: 5-8 días
- ✓ Concentración de CO<sub>2</sub>: <1000 ppm
- ✓ Intercambio de aire fresco: 4 - 8 volumen de aire/hora
- ✓ Requerimientos de luz: 500-2000 Lux. Niveles de luz por debajo de 500 Lux causan elongación considerable del estípite de muchas cepas.

La cosecha ocurre cada 2 a 3 semanas durante 8 a 12 semanas y muchas veces

hasta 16 semanas.

- Inactivación de los bloques

Comprende desde el día en que se realiza la cosecha hasta cuando se forma una capa café de células muertas en el bloque (Stamets y Chilton, 1983).

- ✓ Temperatura: 21-25°C
- ✓ Humedad relativa: 30-50%
- ✓ Duración: 7-10 días

La siguiente tabla resume los parámetros de crecimiento:

**Tabla 3. Parámetros de crecimiento (Stamets y Chilton, 1983)**

<b>Etapa</b>	<b>Incubación</b>	<b>Micordema Café</b>	<b>Formación de primordios</b>	<b>Fructificación y Cosecha</b>	<b>Inactivación.</b>
pH inicial	5.5 - 5.6	-	4.2 - 4.6	-	-
Temperatura (°C)	21 - 27	10 - 21	10 - 21	16 – 27	21 - 25
Humedad (%)	25 - 100	> 90	95 - 100	60 – 80	30 - 50
CO <sub>2</sub> (ppm)	>10.000	< 1.000	<1000	<1000	No Aplica
Intercambio de aire (vol. de aire/hora)	0 - 1	-	4 - 7	4 – 8	-
Luminosidad (lux)	50 - 100	50 - 100	500 - 2000	500 – 2000	No aplica
Duración máxima	4 semanas	4 semanas	2 semanas	2 semanas	2 semanas

Los niveles altos de humedad son necesarios durante la fructificación para reducir evaporación del sustrato, de tal modo que se promueva la formación de los primordios. El

mejor crecimiento de los carpóforos puede correlacionarse con la alta humedad atmosférica; y el crecimiento micelial cambia considerablemente con el contenido de agua del sustrato. Se asume generalmente que la capacidad del sustrato para retener agua se relaciona con la etapa del cultivo. Se espera una excelente capacidad de proporcionar agua en la última etapa de maduración del hongo, en la cual hay una alta densidad de colonización micelial. El micelio del *Lentinula edodes* tiene un alto potencial para absorber agua, lo que da lugar a un alto contenido de humedad en el sustrato colonizado. Los primordios desarrollados requieren altos niveles de humedad para provocar el transporte de agua libre desde el sustrato al primordio. Lo más interno del sustrato requiere más consumo de energía para que el agua sea absorbida por el hongo. Para obtener buenas producciones de cuerpos fructíferos así como hongos de buena calidad, la humedad del sustrato debe ser alta y constante durante el crecimiento de los cuerpos fructíferos. (Shoji, 1998)

La inmersión del sustrato es una práctica común en la industria para proveer la humedad perdida durante el período de producción y para iniciar el proceso de fructificación. El abastecimiento de agua al sustrato afecta considerablemente la cantidad y la calidad de la cosecha. (Shoji, 1998)

## **2.5. APLICACIONES Y USOS**

Una atractiva característica de este hongo comestible es que puede utilizar una amplia variedad de residuos agroindustriales y convertir la biomasa lignocelulósica en un alimento de buen sabor y alto valor nutritivo. (Shoji, 1998)

El shiitake puede ser comercializado como hongo fresco, deshidratado, en polvo ó como extracto. En el mercado Japonés se puede encontrar vino de shiitake, galletas y dulces de

shiitake (Stamets, 2000).

Este hongo ha sido llamado nutraceutico por sus cualidades alimenticias (buena fuente de proteina) y medicinal, como potenciador del sistema inmunologico. (Jaramillo y Rodriguez, 2001). Entre otras propiedades medicinales se encuentran:

- ✓ Es anticancerígeno: posee Lentinan, un polisacárido soluble en agua aprobado como un agente anticancerígeno en Japón. Chihara, en 1978, publicó las propiedades anticancerígenas del shiitake, afirmando que el Lentinan inhibía el tumor del Sarcoma 180 y otros tipos de tumores. El modo de acción probablemente se deba a la activación de células "T". Además, tiene antioxidantes, vitaminas A, E y C y selenio (Chihara, 1978).
- ✓ Antitumoral: presencia de polisacáridos antitumorales.
- ✓ Antiviral: posee ácidos nucleicos.
- ✓ Reduce el colesterol: tiene sustancias activas contra el colesterol.
- ✓ Posee sustancias inhibitorias de la aglutinación de plaquetas. (Jaramillo y Rodriguez, 2001).

## **2.6. MERCADO**

La demanda de las setas se encuentra en restaurantes de comida mexicana, italiana, española, china y francesa principalmente. De igual forma que estos productos se comercializan principalmente en tiendas gourmet, su comercialización también puede darse en supermercados, pues el empaque y sello del producto proporcionan confianza al consumidor y seguridad de que son hongos 100 por ciento comestibles.

Algunas de las razones por las que los expertos aseguran que el cultivo de setas sí es



negocio se debe a que: las setas se pueden producir todo el año, se producen a partir de materiales poco útiles para el hombre o de desecho, el mercado no está saturado, se pueden vender empacadas en supermercados, se pueden comercializar en lata, existe un mercado potencial en los restaurantes de comida gourmet, hay oportunidades para exportar, se pueden almacenar y/o vender en conserva, una vez secas se comercializan en polvo como condimento, son un producto 100 por ciento natural, libre de fertilizantes y fumigantes, no tienen colesterol, su contenido es alto en vitaminas y minerales y son de fácil digestión (Lynn, 1999).

## **2.7. ESTADO DEL ARTE: PRODUCCION DE SHIITAKE**

La mayoría de los estudios realizados con *L. edodes* apuntan hacia la evaluación de medios de cultivo y sustratos que proporcionen las mejores condiciones y velocidades de crecimiento del hongo y que ayuden a darle el mejor contenido nutricional posible para que pueda ser luego evaluado por sus propiedades alimenticias y medicinales. (Royse, y Sánchez, 2000). Los métodos modernos usan un sustrato basado en madera dura, arreglado con un suplemento rico en nitrógeno (arroz, centeno de trigo, harina de avena, harina de trigo), (Stamets, 2000).

Un ejemplo de esto es el estudio realizado Silva *et al.*, 2005 para evaluar el crecimiento y la producción enzimática de las variedades de *L. edodes* en residuos de eucalipto, constituido por cortezas de suelo, ramas y hojas. Inicialmente aislaron el microorganismo para cultivarlo en un medio compuesto de residuos de eucalipto y salvado de arroz (80:20). Este residuo resultó un material conveniente para el crecimiento micelial con un rendimiento de 1.4–20.2 mg de micelio / gr. de residuo. Se encontró entonces que este medio compuesto es ideal para la producción de las enzimas extracelulares del hongo, pero también para cultivo de la biomasa micelial, demostrando la utilidad de emplear la actividad enzimática para controlar su crecimiento vegetativo. Las respuestas de dichos

experimentos involucraron la producción de enzimas como celulasa, hemicelulasa y ligninasa, las cuales permitieron medir la colonización del sustrato.

Debido a que el Shiitake crece de forma silvestre sobre troncos muertos, la mayoría de los sustratos usados para su producción tienen como ingrediente principal la madera. Es por eso que resulta tan importante el trabajo realizado sobre la influencia del tamaño de las partículas de madera (astillas) en el rendimiento del sustrato en Shiitake. En él se realizó un experimento con tres cultivos del hongo con el fin de determinar el efecto de 4 clases de partículas (clases **1**:  $2.8 \pm 4$  mm; **2**:  $1.7 \pm 2.8$  mm; **3**:  $0.85 \pm 1.7$  mm; **4**:  $< 0.85$  mm) sobre el rendimiento de este. El rendimiento de los sustratos preparados con la clase 4 fueron bajos comparados con los rendimientos obtenidos de las cosechas con las clases 1, 2 y 3 (27.7%, 12.4% y 2% respectivamente), encontrando que los sustratos que contienen astillas de madera de tamaño menor a 0.85 mm no son óptimos para la producción de shiitake ya que estas pequeñas partículas forman espacios con aire tan pequeños que se disminuye el intercambio de aire entre el interior y el exterior del medio. Así, la restricción del intercambio de gas fue considerada como el principal responsable de los bajos rendimientos observados, (Royse y Sánchez, 2000).

En cuanto al interés nutricional del shiitake cabe destacar un estudio que se basa en la comparación de nutrientes entre diferentes especies de hongos comestibles (Manzi *et al.*, 1999). Este estudio fue realizado para varios componentes de interés nutritivo como el agua, proteína, aminoácidos totales, ceniza y minerales, en hongos de especies *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*. Estos fueron cultivados en el mismo sustrato (salvado de trigo con 15% de remolacha). Se encontró que la humedad de los hongos estudiados es alta (85.2 a 94.7%) y los volúmenes de ceniza van de 6.9 a 10.5% en base seca. El potasio fue el elemento mineral más abundante seguido por el magnesio. El nitrógeno total varió de 3.47 a 7.93% (base seca), y la especie *Pleurotus ostreatus* presentó la variabilidad más grande entre las muestras analizadas. Los aminoácidos más abundantes encontrados, expresados como los

porcentajes de aminoácidos totales, son el ácido glutámico ( $12.8 \pm 20.9\%$ ), ácido aspártico ( $9.1 \pm 12.1\%$ ) y arginina ( $3.7 \pm 11.7\%$ ), pero en las variedades *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes* se observó un porcentaje particularmente bajo de arginina (3.7 y 5.7%).

Hasta el momento, entre los estudios realizados y publicados en Colombia para buscar la forma de adecuar esta técnica de cultivo a las condiciones del país, se cuenta con el de Fung *et al.*, 2003 y Jaramillo y Rodríguez, 2001. Ambos arrojan resultados luego de una investigación con diferentes desechos agroindustriales como sustratos y bajo concentraciones fijas, procesos y condiciones adecuadas. Estas investigaciones, a escala de laboratorio, han tenido como objetivo determinar, entre cierto número de residuos agroindustriales (cascarilla de algodón, bagazo de caña de azúcar, cisco de café y fibrilla de coco) y residuos de madera (aserrín de roble, de eucalipto, de pino y de roble), el mejor sustrato para la obtención del hongo (Fung *et al.*, 2003) y estudiar el comportamiento de un desecho (borra de café) como sustrato en el cultivo de Shiitake (Jaramillo y Rodríguez, 2001). El valor de estos estudios es alto, pero se entiende que para generar procesos agroindustriales productivos es necesario, más que estudiar los desechos como sustratos, optimizar su rendimiento mediante evaluaciones de diferentes concentraciones de éstos dentro de la formulación del bloque artificial.

Recientemente Gaitan *et al.*, 2006, evaluaron la producción del hongo shiitake por medio de una fermentación sólida de ciruela pasa, cebada y salvado de trigo; encontrando que la ciruela pasa es un gran potencial para el cultivo del hongo; puesto que obtuvo el menor de tiempo de formación de primordios (28 días), la mayor eficiencia biológica (93.25%) y el mejor rendimiento (37.46%). Philippoussis *et al.*, 2003, seleccionaron dos variedades de *L. edodes* (S4080 y SIEF0231) y las cultivaron en aserrín de roble (OS), salvado de trigo (WS) y granos de maíz (CC), para estudiar la influencia en el crecimiento del micelio y la producción de cuerpos fructíferos. Los resultados de este estudio demuestran que para las dos variedades del hongo los medios OS y WS mostraron una rápida colonización del

micelio. Los primordios aparecieron entre 4 - 5 días después de someter a los sustratos a un choque térmico; obteniéndose un tiempo de fructificación de 58 días en WS y 62 días en CC. Con el sustrato WS se obtuvo la mayor productividad (BE 54.17%), presentando tiempos más cortos de cultivo a través de las diferentes cosechas.

## **2.8. COMPONENTES IMPORTANTES EN EL SUSTRATO**

Minerales como magnesio, calcio, hierro, cobre, manganeso, zinc y, algunas veces molibdeno, son requeridos para el crecimiento de los hongos (Jennings, 1995). El calcio se considera el mineral más importante dentro del crecimiento micelial; por lo tanto algunos cultivadores adicionan  $\text{CaCO}_3$  y/o  $\text{CaSO}_4$  a los sustratos suplementados con viruta de madera. (Royse y Sanchez, 2003).

### **2.8.1. Sulfato de calcio:**

El crecimiento micelial es estimulado por la adición de este compuesto y genera una disminución del pH y un incremento de la biomasa. (Fernández, 2001).

Leatham y Stahlman, 1987 demostraron que la presencia del sulfato de calcio posibilita la foto-sensitividad del micelio del shiitake, afectando la formación y el desarrollo del cuerpo fructífero. El calcio y el sulfuro son elementos esenciales que afectan el rendimiento. Adicionalmente realizaron ensayos con shiitake en medios químicamente definidos, que mostraron que la ausencia de calcio hizo el micelio insensible al estímulo de la luz y suspendió la formación del primordio. Royse y Sánchez 2003 encontraron que la adición de  $\text{CaSO}_4$  en rangos no mayores al 2% del peso seco a un sustrato que contenía aserrín de roble, mijo, salvado de trigo y arroz no afectaron la producción ni el tamaño del hongo.

### **2.8.2. Carbonato de calcio:**

El calcio juega un importante papel en el crecimiento del micelio, así como en su fructificación. Royse y Sánchez 2003 probaron que tanto la eficiencia biológica como el tamaño del hongo aumentaron cuando se adicionó 0.2%, 0.4% y 0.6% (base seca) de  $\text{CaCO}_3$  al sustrato que contenía aserrín de roble, mijo, salvado de trigo y arroz.

El uso preferencial por los cultivadores del calcio como  $\text{CaCO}_3$  o  $\text{CaSO}_4$  parece haberse desarrollado empíricamente y los datos experimentales no están disponibles para determinar niveles óptimos de su uso (Royse y Sánchez, 2003). Se sabe que el  $\text{CaCO}_3$  tiene un efecto profundo en el pH, mientras que el  $\text{CaSO}_4$  puede tener ó no un efecto mínimo en el pH del sustrato.

El  $\text{CaCO}_3$  proporciona más calcio para el crecimiento del micelio que el  $\text{CaSO}_4$ ; puesto que libera más fácilmente iones  $\text{Ca}^{+2}$ . Puede ser importante realizar varios ensayos para determinar que cantidad de calcio y otros minerales afectan la cosecha de hongos, además incrementar las concentraciones de minerales para analizar el aumento en el valor nutricional de los hongos. (Royse y Sánchez, 2003).

Se necesitan más estudios para comparar las variedades de shiitake, en varias maderas, con niveles de calcio variables. (Stamets, 2000).

### **2.8.3. Nitrógeno:**

Las fuentes de nitrógeno complejas como la caseína hidrolizada aumentan más el crecimiento e inhiben menos la degradación de lignina que las fuentes de nitrógeno simples. La disponibilidad de nitrógeno limita el crecimiento del hongo sobre madera, mientras que los micronutrientes o vitaminas, no. La degradación de lignina es un factor importante para el desarrollo de shiitake, ya que permite acceder a los componentes nitrogenados de la madera (Boyle, 1998). La cantidad y la calidad de lignina y compuestos

fenólicos solubles son los principales componentes que varían con los sustratos; en consecuencia, la capacidad diferencial para producir polifenoloxidasas es probablemente un factor importante para la adaptación de diferentes cepas de shiitake a diversos sustratos (Savoile, 1998).

Componentes como arroz, centeno de trigo, harina de avena, harina de trigo y salvado de trigo se consideran fuentes de nitrógeno.

#### **2.8.4. Maderas duras**

El shiitake es un hongo que degrada y se alimenta de la celulosa y la lignina presente en la madera, por ello la madera dura (roble y eucalipto) es el ingrediente más utilizado en Asia y Norte América para cultivo de shiitake en bloques sintéticos. (Royse y Sánchez, 2000).

Los hongos comestibles pueden ser comercialmente cultivados sobre muchas variedades de madera, la elección de la mejor madera como sustrato depende de las características de cada hongo. En Japón, hongos como shiitake, nameko [*Pholiota nameko* (T. Ito)], y maitake [*Grifola frondosa* (Dicks. Marco ex)] se cultivan principalmente en medios basados en madera dura. El crecimiento de los hongos en troncos de madera caídos es controlado por muchos factores, incluyendo la estructura del tejido, la gravedad específica, el tipo de duramen, la dureza, el contenido de la lignina y el contenido de extractivos en la madera. (Hu *et al.*, 2003)

## 2.9. FACTORES DE CONTAMINACIÓN

*L. edodes* tiene una historia de más de 100 años de cultivo en troncos naturales y la plaga que lo ataca es el hongo parásito *Trichoderma spp.*, (Komatsu, 1976; Tokimoto, 1985) y recientemente se comprobó que este hongo también parásita en sustratos de aserrín de madera en la etapa de cosecha (Togashi *et al.*, 1996; Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat, Japan 1997). Se sabe experimentalmente que la contaminación con este hongo causa una disminución en la cantidad y calidad de los cuerpos fructíferos.

Yoshie *et al.*, 2002 realizó unos experimentos con sustratos inoculados con *L.edodes*; e infectados con *Penicillium brevicompactum* y otros con *Trichoderma.harzianum*. El crecimiento micelial de *L. edodes* continuó hasta cierto tiempo después del contacto con *P. brevicompactum*. En cambio, cuando el micelio del *L. edodes* estuvo en contacto con *T. harzianum* el crecimiento se detuvo más rápido que cuando entro en contacto con *P. brevicompactum*. El aspecto superficial de los sustratos de aserrín infectados con *P. brevicompactum* fue igual que el aspecto de los sustratos no infectados, mientras que los sustratos infectados con *T. harzianum* estaban cubiertos con conidias y fatalmente dañados.

Los hongos parásitos están divididos en dos grupos: competidores y patógenos. Los primeros compiten con los hongos por la nutrición del sustrato y causan posiblemente infección secundaria con otros patógenos, y el último ataca los hongos cultivados (Stamets y Chilton, 1983; Furukawa y Nobuchi, 1996). El hongo *P. brevicompactum* es categorizado como el competidor y el hongo *T. harzianum* como el patógeno. Cuando hay contaminación con un hongo parásito patógeno, la biomasa micelial del *L. edodes* en los sustratos se ve enormemente influenciada; ya que se reduce la calidad de los cuerpos fructíferos. (Yoshie *et al.*,2002).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. UBICACIÓN**

La producción de micelio en caja Petri y la obtención de la “semilla” se realizaron en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT, sede Medellín, Antioquia, Colombia.

La preparación de los sustratos e inoculación de los bloques se llevó a cabo en una finca ubicada en guarne; considerando la disponibilidad de un autoclave grande.

El crecimiento del hongo en los bloques artificiales y la fructificación se realizó en la Universidad EAFIT, sede Llanogrande, Antioquia, Colombia bajo las siguientes condiciones ambientales: altitud sobre el nivel del mar 2125 metros, temperatura promedio 17°C, precipitación promedio entre 1.800 y 2.500 milímetros y humedad relativa entre 80 y 85%. (Administración Municipal de Rionegro, 2007).

#### **3.2. MICROORGANISMO**

La cepa jumbo de *L. edodes* Pegler, perteneciente a la colección de Fungi Perfecti® LLC de Estados Unidos se conservó a temperatura ambiente en aceite mineral.

#### **3.3. MATERIALES**

Agitador magnético

Agitador orbital New Brunswick Scientific

Algodón



Asas circulares

Autoclave tipo horizontal Eastern Modelo EA

Balanza analítica

Balanza analítica Sartorius MA45

Beakers de 250, 500 y 1000 ml

Cabina de Flujo laminar Flow 100V

Cajas Petri

Erlenmeyers de 250, 500 y 1000ml

Frascos de "Gatorade"

Mechero

Micropipetas de 100 µl marca Gilson, 1000µl marca Nichiryo y Wilson

Papel de aluminio

pH-metro Metrohm

Probetas

Puntas marca BRAND, Gilson y QSP

Termómetro

Hidrómetro

### **3.4. REACTIVOS**

Ácido clorhídrico 0.01 N

Agar agar (Merck)

Agar extracto de malta (Oxoid)

Agua destilada

Etanol al 70%

Extracto de levadura (Oxoid)

Hipoclorito de sodio al 3 y 13%

NaOH 1 N

Peptona Universal (Merck)

PDA (Merck)

Avena Instantánea marca Éxito

Aserrín de eucalipto (aserrío Rionegro)

Sulfato de calcio

Salvado de trigo (Concentrados Judeval)

Motosa de algodón (Concentrados Judeval)

Cascarilla de cacao (Nacional de chocolates)

Viruta de roble (Sr. Raul Arango)

### **3.5. FORMACIÓN DE LA “SEMILLA”:**

Esta etapa consistió en dos procesos:

#### **3.5.1. Producción de micelio generación 2 en cajas Petri:**

Para esta etapa se obtuvo inicialmente la generación uno (G1) al replicar la cepa en agar extracto de malta (MA) a pH 5.5 y se conservó a temperatura ambiente por 15 días.

A partir de un diseño de experimentos con 3 factores (tipo de medio, porcentaje de aserrín de eucalipto y pH), con tres niveles para los dos primeros factores y dos niveles para el pH, se encuentra un total de 18 tratamientos (Tabla 4) los cuales se hicieron por triplicado. En todos los ensayos se realizaron controles negativos sin presencia de *L. edodes* con el fin de identificar posible contaminación por otros microorganismos. Posteriormente, se

realizó un diseño de experimentos de dos factores (medio de cultivo) de dos niveles (MYA pH 5.5; OMYA modificado pH 5,5) y porcentaje de aserrín de eucalipto (0,3% y 0,0%) por triplicado.

**Tabla 4. Diseño de experimentos para producción de micelio en medios de cultivo agarizados.**

TRATAMIENTO	FACTOR		
	Medio de cultivo	pH	Aserrín de eucalipto (%)
1	MYA	5,5	0,2
2	MYA	5,5	0,3
3	MYA	5,5	0
4	MYA	5	0,2
5	MYA	5	0,3
6	MYA	5	0
7	PDYA	5,5	0,2
8	PDYA	5,5	0,3
9	PDYA	5,5	0
10	PDYA	5	0,2
11	PDYA	5	0,3
12	PDYA	5	0
13	OMYA	5,5	0,2
14	OMYA	5,5	0,3
15	OMYA	5,5	0
16	OMYA	5	0,2
17	OMYA	5	0,3
18	OMYA	5	0

Debido al difícil manejo del medio de cultivo OMYA y a la similitud con el medio de cultivo MYA, se repitió el experimento con dichos medios (OMYA modificado y MYA a pH 5,5, con aserrín (0,3%) y sin aserrín de eucalipto).

El aserrín de eucalipto fue calculado teniendo en cuenta que cada caja Petri tiene una capacidad de 20 ml de medio y se trabaja seis cajas con 0,2% y 6 cajas con 0,3% de este. El aserrín de eucalipto utilizado pertenecía a un aserrío en Rionegro que solamente trabaja con maderas de eucalipto, asegurando así que el sustrato no estaba contaminado con otros tipos de maderas

La composición de los medios sólidos para el cultivo en agar se describe en la tabla 5:

**Tabla 5. Composición de los medios sólidos agarizados.**

<b>Componentes</b>	<b>MYA</b>	<b>PDYA</b>	<b>OMYA</b>	<b>OMYA modificado</b>
Agar agar (g/l)	20	20	20	20
Extracto de malta (g/l)	20			
Levadura (g/l)	2	2	2	2
Peptona (g/l)	1	1		
Agua de papa (g/l)		300		
Dextrosa (g/l)		10		
Avena instantánea (g/l)			80	40
Azúcar de malta (g/l)			10	10

Los medios preparados fueron esterilizados en un autoclave tipo horizontal Eastern Modelo EA por 20 minutos a 121°C y 15 psig. Estos se sirvieron en la cámara de flujo laminar en cajas Petri previamente esterilizadas y una vez solidificado el medio se inocularon en la cámara de flujo laminar con cuadros de 1 cm<sup>2</sup> de la cepa G1 y fueron incubados a 22 ± 2°C.

En esta etapa se identificó el medio de cultivo que proporcionó el crecimiento radial del micelio más rápido y de mejor calidad. El crecimiento radial se determinó midiendo el diámetro del micelio cada dos días hasta que se colonizaron completamente las cajas Petri de 9 cm.

### 3.5.2. Obtención de la “semilla”:

Para esta etapa del proceso se trabajaron cinco mezclas de sustrato por triplicado como se muestra en la tabla 6. La humedad relativa y temperatura se mantuvieron aproximadamente constantes entre  $50 \pm 2\%$  y  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  respectivamente. La humedad relativa fue determinada con una balanza sartorius por medio de la evaporación del agua a  $70^\circ\text{C}$  hasta la obtención de peso constante.

**Tabla 6. Mezclas de sustratos para la obtención de “semilla”**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>VIRUTA DE EUCALIPTO (%)</b>	<b>SEMILLA DE TRIGO (%)</b>
1	100	0
2	50	50
3	80	20
4	20	80
5	0	100

La preparación de los sustratos para la generación de la “semilla” se realizó por triplicado de la siguiente manera:

1. Se eliminaron las impurezas del trigo y del aserrín hirviéndolos durante 15 minutos en agua y realizando dos enjuagues con agua.

2. El sustrato de viruta de eucalipto se dejó remojando por 12 horas y el trigo por 2 horas. Esto con el fin de obtener la humedad requerida para la obtención del “semilla” (aproximadamente 50 %),
3. El sustrato fue almacenado en frascos de 500 ml según el diseño de experimentos.

La obtención de la “semilla” se realizó por medio de la técnica de inoculación líquida (Kawai *et al.*,1996; Stamets, 2000); teniendo en cuenta que esta técnica proporciona mayor velocidad de colonización, mayor pureza de la “semilla” y el medio es de fácil manipulación (Stamets,2000).

Para obtener el medio líquido se llevó a cabo una fermentación en 2 erlenmeyers de capacidad de 500 ml con un contenido de 200 ml de medio de cultivo cada uno (Tabla 7). La inoculación de los medios se realizó con 2 cuadros de 1 cm<sup>2</sup> del micelio cultivado en MYA con pH 5,5 y 0,3% de aserrín de eucalipto y se agitaron a 100 rpm por 72 horas en un agitador orbital (Stamets, 2000).

**Tabla 7. Componentes del medio de cultivo para la fermentación líquida**

<b>Material</b>	<b>Cantidad</b>
Agua (ml)	200
Extracto de malta (g)	8
Extracto de levadura (g)	0,4
Aserrín de eucalipto (g)	0,6
Sulfato de calcio (g)	0.2

Se utilizaron 15 ml de este inóculo por cada 250 g de sustrato (Stamets, 2000; Yang y Jong, 1987). Las muestras con “semilla” fueron agitadas en el momento de adicionar el inóculo y mantenidas a 22 ± 2°C durante 15 días.

El análisis estadístico se realizó con un análisis de varianza (ANOVA) en Statgraphics 5.0 de la siguiente forma:

Factor: combinaciones de sustrato

VARIABLES DE RESPUESTA: tiempo de obtención de la semilla y calidad del micelio

Cinco niveles: cinco combinaciones diferentes

### **Variables de respuesta:**

El seguimiento al crecimiento del micelio se realizó cada dos días hasta el día 17 observando el porcentaje del frasco colonizado y la densidad del micelio. En todos los ensayos se realizaron controles negativos sin presencia de *L. edodes* con el fin de identificar posible contaminación por otros microorganismos

#### *Calidad del micelio:*

Para determinar la calidad del micelio se realizó una observación cualitativa y se calificó de acuerdo a las siguientes convenciones:

1-2: micelio poco denso (0-30% del grano cubierto por micelio)

2-3: micelio medianamente denso (30 - 80% del grano cubierto por micelio).

3-5: micelio denso (80 - 100% del grano cubierto por micelio)

#### *Tiempo de obtención de la semilla:*

Para establecer el número de días necesarios para colonizar el frasco, se tuvo en cuenta el día en que se colonizó completamente (100%)



Con este análisis se eligió la mejor mezcla (80% trigo, 20% viruta de eucalipto) para ser utilizada en el estudio de la producción de cuerpos fructíferos.

Con ayuda del diseño de experimentos para la obtención de cuerpos fructíferos, se realizaron los siguientes cálculos para la cantidad de inóculo líquido:

$$S = 1.27 * .N * W * I$$

Donde:

S: total de semilla a producir, en gramos, para la cantidad de sustrato a inocular.

N: # muestras o niveles.

W: peso promedio del bloque.

I: porcentaje de inoculación recomendado por Stamets, 2000.

1.27: factor de aumento para prever una contaminación del 27%.

Para la cantidad de preinóculo se siguen las recomendaciones de Stamets, 2000 y Yang y Jong, 1987 de una proporción de 15ml de inóculo por cada 250 g de sustrato. Y para el preinóculo se consideró un 10% del total de inóculo a preparar.

$$Volumen\ preinoculo = \left( \left( \frac{S * 15}{250} \right) * 0,10 \right)$$

Donde:

V: Volumen del inóculo (ml)

S: total de gramos de semilla a producir.

### **3.6. PRODUCCION DE CUERPOS FRUCTIFEROS:**

Esta parte del proyecto se dividió en diferentes etapas:

#### **3.6.1. Diseño de experimentos:**

El diseño de experimentos se realizó de la siguiente forma:

Factor de estudio: Combinaciones de los sustratos (residuos agroindustriales, viruta de roble, salvado de trigo,  $\text{CaSO}_4$  y  $\text{CaCO}_3$ )

Variables de respuesta: tiempo de colonización del sustrato, eficiencia biológica, rendimiento, precocidad de colonización, tamaño del píleo.

Niveles: número de combinaciones de sustrato (los residuos agroindustriales y la viruta de roble se variaron en un 25, 50 y 75%; el salvado de trigo en un 20 y 25%, y el  $\text{CaSO}_4$  y el  $\text{CaCO}_3$  en un 0, 2.5 y 5% en peso seco, para un total de 55 combinaciones referenciadas en el anexo 1).

Para lo anterior se realizaron 5 repeticiones por nivel para obtener una mayor confiabilidad. Para garantizar que las muestras tienen un comportamiento representativo se respetará el principio de aleatoriedad en la toma de datos.

#### **3.6.2. Preparación de los sustratos.**

Los sustratos utilizados para la preparación de los bloques artificiales fueron: motosa de algodón y cascarilla de cacao como residuos agroindustriales; viruta y aserrín de roble

como suplemento maderable; salvado de trigo como fuente de nitrógeno, y  $\text{CaSO}_4$  y  $\text{CaCO}_3$  como estimulador de crecimiento (Rasca, 1990) y como regulador de pH respectivamente.

La humedad de cada bloque fue ajustada con agua hasta alcanzar un valor  $50 \pm 3\%$ .

Todos los sustratos fueron vertidos en bolsas de polipropileno con un agujero de  $1 \text{ cm}^2$  y tapado con microporo de  $3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$  para el intercambio gaseoso. Las bolsas fueron selladas con cinta de enmascarar para ser esterilizadas a  $121^\circ\text{C}$  por 3 horas a 15 psig.

### 3.6.3. Inoculación de la “semilla”:

Luego de obtenida la “semilla” y los bloques armados y esterilizados se procedió a inocular de la siguiente forma:

1. Se desinfectó el área a utilizar con hipoclorito al 13% y con etanol al 70% y se prendieron mecheros alrededor del mesón de trabajo.
  2. Se retiró la cinta de enmascarar y se inoculó con  $6 \pm 1\%$  de “semilla” sólida de 15 días de maduración.
  3. Se sellaron las bolsas con una selladora por calentamiento.
  4. Se agitaron las bolsas para garantizar la distribución de la “semilla” en el sustrato.
- (figura 4)



Figura 4. Bloques inoculados con semilla de *L.edodes*

### 3.6.4. Adecuación de la salas de incubación y fructificación

Se diseñaron tres estanterías de 4 tendidos de 1.90 m de largo, 0.8 m de ancho y 0.35 m de espacio entre tendidos. Se ubicaron alrededor de 21 bloques por tendido para el área de incubación (figura 5) y 10 bloques para el área de fructificación.



Figura 5. Estanterías para la incubación y fructificación de *L. edodes*.

Las condiciones ambientales para cada cuarto están especificadas en la tabla 8

**Tabla 8. Condiciones ambientales en el cuarto de incubación y fructificación**

	<b>AREA INCUBACION</b>	<b>AREA FRUCTIFICACION</b>
Luminosidad	Oscuridad parcial	8 horas diarias de luz natural
TEMPERATURA	21-27°C	16-18°C
HUMEDAD RELATIVA	70-80%	60-80%

Los cuartos de incubación y fructificación se ubicaron en el oriente antioqueño, el cual presenta temperaturas entre 12 - 24°C y humedades entre 75-85% (Conexcol, 2006) para

garantizar las condiciones ambientales de los cuartos. Para verificar estas condiciones dentro de los cuartos se adaptó un hidrómetro y un termómetro.

Con el fin de mantener la humedad en el cuarto de fructificación, se realizaron aspersiones de agua dos veces al día por 30 minutos. Adicionalmente se colocaron ventiladores para disminuir la probabilidad de contaminación por otros hongos invasores.

### **3.6.5. Choque térmico:**

El choque térmico se realizó una vez el micelio colonizó todo el sustrato formando ampollas (popcorning) de coloración café (micoderma café). La bolsa fue removida y el bloque fue transferido al cuarto de fructificación donde se realizó el choque térmico por una reducción natural de la temperatura ambiental ( $10 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante la noche.

### **3.6.6. Análisis bromatológicos.**

Se realizaron análisis bromatológicos a cada uno de los componentes (cascarilla de cacao, motosa de algodón, viruta de roble, salvado de trigo) utilizados en la preparación de los sustratos, a los hongos producidos por las dos mejores formulaciones y al bloque de menor tiempo de desarrollo del cuerpo fructífero y que generó hongos de mayor calidad (mayor tamaño del píleo y alto valor nutricional).

Los análisis bromatológicos se hicieron en el laboratorio de análisis químico y bromatológico de la Universidad Nacional de Medellín. Las características estudiadas tanto de los hongos como del mejor sustrato fueron:

% Calcio (Ca) (espectrofotometría A.A.)

% Cenizas (Cen.) (Incineración directa)  
% extracto etéreo (EE) (extracción Soxhlet con inmersión)  
% Fibra Cruda (FC) (Weende)  
% Fibra Detergente Ácido (FDA) (Van Soest)  
% Fibra en Detergente Neutro (FDN) (Van Soest)  
% Fósforo (P) (espectrofotometría U.V.)  
% Humedad (Hum.) (Termogravimétrico por secado)  
% Lignina (Van Soest)  
% Materia Seca (MS) (Termogravimétrico por secado)  
% Proteínas (Pr) (KJEDAHL).

A partir de la información suministrada por los análisis bromatológicos de los residuos agroindustriales, de la viruta de roble y del salvado de trigo (anexo 2) los cuales fueron tabulados en el anexo 3, se calculo la relacion C:N de la siguiente forma:

Se sumaron los totales de Pr+FDN+FDA+Lignina+EE con lo que se obtiene una tendencia aceptable acerca del contenido de materia Orgánica. Este valor se divide por 1.724 para obtener la cantidad de carbono.

La cantidad de nitrógeno (N) se calcula dividiendo el valor Pr por 6.25 (factor de conversión para la proteína) y con estos dos valores se efectuó el cociente C/N. (Schuldt.,2002) (Anexo 4)

### 3.6.7. Resultados y análisis estadístico:

Las variables cuantitativas determinadas fueron:

- Tiempo de colonización: se define como el tiempo necesario para que el micelio colonice todo el sustrato.
- Precocidad de colonización: tiempo necesario desde la inoculación de la “semilla” hasta la obtención de los primeros primordios
- Rendimiento: Kg. de hongo fresco cosechado por unidad de área en m<sup>2</sup>.
- Eficiencia biológica y tamaño del píleo: para esta medición los hongos fueron cosechados después de observar que la lamina (himeneo) estuvo expuesta y el sombrero estuvo completamente extendido. Luego de cosechados fueron pesados y medidos (sombrero y pie). La eficiencia biológica se determinó mediante la ecuación:

$$\%BE = \frac{\text{Kg de hongos frescos}}{\text{Kg de sustrato seco}} \times 100 \quad (\text{Stamets, 2000})$$

El análisis estadístico se realizó por medio de un Análisis de Varianza (ANOVA) con un nivel de confianza de 95% con ayuda del software Statgrafics 5.0.

## 4. RESULTADOS Y ANALISIS

### 4.1. CRECIMIENTO DE *L. edodes* EN MEDIOS AGARIZADOS

El micelio de *L. edodes* creció en todos los medios de cultivo, pHs y porcentajes de aserrín de eucalipto evaluados, alcanzando un diámetro de 9cm en aproximadamente 14 días (Figura 6) y ningún control negativo presentó síntomas de contaminación.

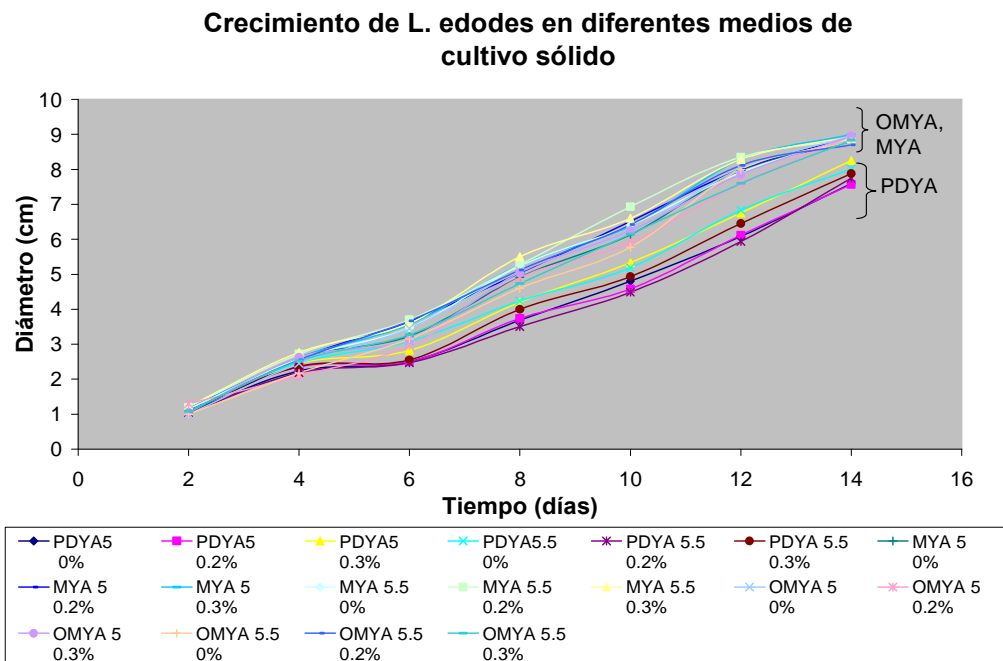


Figura 6. Crecimiento de *L. edodes* en medios de cultivo agarizados.

De la figura 6 solo se puede observar que los tratamientos con el medio PDYA presentan la menor pendiente, mientras que los tratamientos con MYA y OMYA comparten pendientes similares.



Para poder determinar el mejor tratamiento para el crecimiento del hongo se calcula la velocidad de crecimiento (cm/día), teniendo en cuenta que los datos tomados corresponden a la fase exponencial o de crecimiento.

Cada tratamiento es graficado con el promedio de los diámetros de las tres replicas y su correspondiente error estándar (anexo 5) con el fin de observar la similitud de datos (error menor al 5%) y entrar a determinar con seguridad la velocidad de crecimiento (pendiente de la recta que describe el crecimiento).

Para el análisis de la velocidad, se realizó un análisis de varianza para los valores de las pendientes (Tabla 9) como variable de respuesta y los 18 tratamientos como factor (anexo 6)

**Tabla 9. Valores de la velocidad resultantes de las regresiones para los 18 tratamientos en el análisis del crecimiento del hongo *Lentinula edodes* en medios agarizados.**

# Tratamiento	Tratamiento	pendiente=Velocidad (cm./día)
1	PDYA, pH 5, 0%	0,53
2	PDYA, pH 5.5, 0%	0,56
3	MYA, pH 5, 0%	0,66
4	MYA, pH 5.5, 0%	0,66
5	OMYA, pH 5, 0%	0,67
6	OMYA, pH 5.5, 0%	0,67
7	PDYA, pH 5, 0.2%	0,52
8	PDYA, pH 5.5, 0.2%	0,53
9	MYA, pH 5, 0.2%	0,66
10	MYA, pH 5.5, 0.2%	0,67
11	OMYA, pH 5, 0.2%	0,64
12	OMYA, pH 5.5, 0.2%	0,66
13	PDYA, pH 5, 0.3%	0,58
14	PDYA, pH 5.5, 0.3%	0,55

# Tratamiento	Tratamiento	pendiente=Velocidad (cm./día)
15	MYA, pH 5, 0.3%	0,67
16	MYA, pH 5.5, 0.3%	0,66
17	OMYA, pH 5, 0.3%	0,65
18	OMYA, pH 5.5, 0.3%	0,65

Los resultados del análisis de varianza para la velocidad de crecimiento y tratamiento (anexo 6) refleja la significancia estadística del tipo de tratamiento en la velocidad de crecimiento ( $p=0.0336$ ) y permite determinar:

1. En la grafica de los intervalos LSD (anexo 7) se observa que los tratamientos 1,2,7,8,13 y 14 son los que presentan menor velocidad de crecimiento. Estos corresponden a los 6 experimentos con el medio PDYA. El no estar superpuestos con los otros tratamientos (poca semejanza con los tratamientos de mayor velocidad de crecimiento) permite descartarlo como medio adecuado para el crecimiento del shiitake.
2. El traslape entre barras que describen el comportamiento de la velocidad en cada tratamiento, puede verse influenciado por una no significancia estadística de los factores (medio, pH y % aserrín) tomados independientemente.

Teniendo en cuenta la ultima observación, se hace un análisis de varianza multifactorial con los tres factores que determinan los 18 tratamientos (anexo 8).

***Para el pH y % aserrín:***

La grafica de intervalos LSD para el factor pH (anexo 9) y % aserrín (anexo 10) muestra el traslape casi total de los datos (baja significancia estadística). Esto significa que no se diferencian entre si, lo cual se analiza con el valor de p para el análisis multifactorial (0.6510 y 0.2229 respectivamente) y permite asegurar la no influencia del pH y el % aserrín en el crecimiento del hongo.

**Para el medio:**

Los intervalos LSD muestran la diferencia clara entre PDYA con los otros dos medios y la similitud entre MYA y OMYA (anexo 11), corroborando lo observado en la figura 6. El análisis de varianza para el tipo de medio muestra que el medio influye directamente en el crecimiento del hongo (valor de  $p= 0,000$ )

**Experimento con MYA y OMYA modificado**

Para el análisis de este segundo experimento se hicieron regresiones lineales y se obtuvo la tabla de valores de la velocidad para los 4 tratamientos (Tabla 10). Con los datos de la velocidad como variable de respuesta se realiza un análisis de varianza multifactorial para el tipo de medio y % de aserrín. (Anexo 12)

**Tabla 10. Tabla de valores de la velocidad para los 4 tratamientos del segundo experimento con medios agarizados.**

# Tratamiento	Tratamiento	Pendiente=velocidad (cm./día)
1	MYA 0 % aserrín	0,8375
2	MYA 0,3 % aserrín	0,7725
3	OMYA 0 % aserrín	0,784167
4	OMYA 0,3 % aserrín	0,7725

Los valores de  $p$  para ambos factores son mayores a 0.05, lo que indica que no existen diferencias significativas para estos factores con relación al crecimiento radial del micelio en el tiempo.

Todos los medios de cultivo evaluados poseen nutrientes que permitieron crecimientos de diferente magnitud para el micelio de *L. edodes*. Para analizar estos resultados es

necesario identificar las diferencias entre los componentes de los diferentes medios:

1. Se conoce que el fin de la levadura, la cebada, la peptona y la avena es proporcionar vitaminas como la tiamina y aminoácidos (proteínas) (Stamets, 2000). Los tres medios tienen estos componentes (Tabla 5: Composición de medios sólidos agarizados) lo que nos asegura un contenido de proteínas apto para el crecimiento del hongo, pero no permite identificar las razones de la diferencia entre el comportamiento del hongo en los diferentes medios y la similitud entre el MYA y OMYA.
2. Analizando las fuentes de carbohidratos (azúcares), los cuales son esenciales para el saludable crecimiento del micelio, encontramos una similitud entre los medios MYA y OMYA y una diferencia de estos con el medio PDYA: para el medio PDYA la fuente de carbohidratos o azúcares es la dextrosa (monosacárido) y para los otros dos medios (MYA y OMYA) es el azúcar de malta o maltosa (disacárido compuesto por dos moléculas de glucosa) (Stamets, 2000). Es importante aclarar que para el MYA la fuente de carbohidratos está incluido dentro del extracto de malta el cual contiene aproximadamente 90-92% de carbohidratos (hexosas como la glucosa y la fructosa; disacáridos como la maltosa y la sacarosa; trisacáridos como la maltotriosa, dextrinas) y sustancias nitrogenadas donde se incluyen proteínas, péptidos, aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas (Mateos, 2007). Estas diferencias nos llevan a deducir la importancia de la fuente de carbohidratos en el crecimiento del micelio y a identificar como mejores medios de siembra el OMYA y MYA (sin diferencias significativas) por el tipo de carbohidrato (azúcar complejo).

La gran diferencia en la densidad del micelio obtenida en el medio OMYA con relación al MYA puede deberse al contenido de avena. Los cereales son una fuente rica en proteínas

y calorías. Mertz (1975) reportó que la base de aminoácidos en la avena es la mejor de todos los granos de cereal, con un porcentaje de lisina del 70% aproximadamente del ideal. La concentración de proteína de la avena varía de un 10,25% a un 15,69% en peso seco y la grasa de un 5,7% a un 10,41%, y un porcentaje bajo de cenizas y taninos (Eggum y Guillord 1983).

Se elige el medio MYA por su fácil manipulación, el pH 5.5 por ser el pH que alcanza el medio en su preparación y 0,3% de aserrín de eucalipto por la posibilidad de activar enzimas lignocelulósicas como es reportado por Stamets 2000, Hatvani y Mécs 2001, Silva *et al.* 2005.

#### 4.2. OBTENCION DE LA SEMILLA

El micelio de *L. edodes* creció en todas las combinaciones que contenían semillas de trigo y viruta de eucalipto, sin embargo la calidad y vigorosidad es muy diferente en cada uno de ellos (ver figura 7).



Figura 7. Obtención de “semilla” en sustratos de trigo (T) y viruta de eucalipto (V).

A) 100T, b)80T – 20V, c) 50T – 50V, d) 20T – 80V, e) 100V.

Para ninguno de los controles se reportó signos de contaminación.

**Tabla 11. Calidad de micelio de *L. edodes* en diferentes sustratos para la producción de “semilla”.**

TTO	REPLICA	Día 3	Día 5	Día 7	Día 11	Día 14	Día 17
100 % V	1	-	-	1	1	1.5	2
	2	-	-	1	1,5	1.5	2
	3	-	-	1	1	1.5	2
	C	-	-	-	-	-	-
80% V - 20% T	1	1	1.5	2	2.5	3	3.5
	2	1	1.5	2	2.5	2.5	3.5
	3	-	-	1.5	2	2.5	3.5
	C	-	-	-	-	-	-
50% V - 50% T	1	1	1.5	1.5	2	2.5	3
	2	1	1	1.5	2	2.5	3
	3	1	1.5	1.5	2	2.5	3
	C	-	-	-	-	-	-
100% T	1	-	-	1.5	3	3	4
	2	-	1	1.5	3	3.5	4
	3	1	1.5	2	3	3.2	4
	C	-	-	-	-	-	-
20% V - 80% T	1	1	2	2.5	3	4	4.5
	2	1	2.5	2.5	3.5	4	4.5
	3	-	2	2.5	4	4.5	5
	C	-	-	-	-	-	-

**Tabla 12. Porcentaje de colonización del micelio de *L. edodes* en diferentes sustratos para la producción de “semilla”.**

TTO	REPLICA	Día 3	Día 5	Día 7	Día 11	Día 14	Día 17
100 % V	1	-	-	20	20	20	25
	2	-	-	20	20	20	25

TTO	REPLICA	Día 3	Día 5	Día 7	Día 11	Día 14	Día 17
	3	-	-	20	20	20	20
80% V - 20% T	1	20	20	25	50	65	80
	2	20	25	50	60	70	80
	3	-	-	25	50	60	75
	C	-	-	-	-	-	-
50% V - 50% T	1	20	25	50	75	80	100
	2	15	20	40	50	70	95
	3	20	30	60	70	80	100
	C	-	-	-	-	-	-
100% T	1	-	-	25	50	90	100
	2	-	20	25	60	90	100
	3	20	25	25	55	90	100
	C	-	-	-	-	-	-
20% V - 80% T	1	25	60	75	90	100	100
	2	25	60	80	90	100	100
	3	-	30	60	90	100	100
	C	-	-	-	-	-	-

Nota: Para efectos estadísticos se asume que para los tratamientos que no alcanzaron la colonización completa de la "semilla", su número de días de colonización es igual a 18 (numero mayor a 17 días)

***Para la calidad del micelio:***

El análisis de varianza (anexo 13) arrojado para la densidad del micelio por el tratamiento, con un 95% de confianza, muestra que la calidad del micelio medida en el día 17 presenta diferencias significativas entre los tratamientos (valor de  $p < 0.05$ ).

Observando la grafica de intervalos LSD (anexo 14) para el tratamiento por la densidad del micelio, se puede determinar que el tratamiento con mejor calidad de micelio presentada es el tratamiento 80% semilla de trigo, 20% viruta de eucalipto. Todos los tratamientos presentan una densidad de micelio diferente entre si (ninguna barra esta superpuesta en la grafica intervalos LSD (anexo 14), lo que da una mayor confiabilidad en asegurar que la calidad del micelio esta relacionada con el tratamiento aplicado al sustrato para la “semilla”.

#### ***Para el tiempo de obtención de semilla.***

En el análisis de varianza para el tiempo de obtención de semilla por tratamiento (anexo 15) se observa que el tratamiento influye directamente en el tiempo de obtención del semilla (valor de  $p$  menor a 0,05) y el anexo 16 permite identificar las diferencias en cada tipo de combinación de sustrato, pudiendo determinar como mejor tratamiento el compuesto por 80% semilla de trigo – 20% viruta de eucalipto.

Al estar los sustratos compuestos por dos únicos componentes se puede analizar que lo que afecta directamente la calidad del micelio es la cantidad de cada uno de estos. Siendo la semilla de trigo el componente que aporta la diferencia en la obtención de una “semilla” mas densa y de mejor calidad.

Estos resultados pueden estar respaldados al conocerse que, la semilla de trigo, es un suplemento que proporciona un alto contenido de carbohidratos y proteínas, y por ende un mejor crecimiento del micelio. Boyle 1998 evaluó el crecimiento de *L. edodes* en maderas suplementadas con diferentes nutrientes, hallando que la velocidad de



crecimiento del micelio no era limitada por la disponibilidad de carbohidratos y que muchos suplementos que contenían nitrógeno lo incrementaban sin inhibir la degradación de la lignina. Muchos autores han reportado que las fuentes de nitrógeno inhiben la degradación de la lignina por muchos hongos (Eriksson *et. al.*, 1990; Boyle *et al.*, 1992) pero *L. edodes* y *P. ostreatus* se han identificado como excepciones (Boyle 1998). Es entonces de esperar que el suplemento de trigo no afecte la degradabilidad de la lignina del eucalipto y que su crecimiento aumente en presencia de semillas de trigo.

### **4.3. PRODUCCION DE CUERPOS FRUCTIFEROS**

Para esta parte del proyecto se obtuvieron pocos datos (solo 4 de los 55 tratamientos presentaron cosecha) debido, en gran parte, a grandes índices de contaminación. Se realizaron análisis a cada variable involucrada para obtener resultados que ayuden a mejorar la obtención de cuerpos fructíferos.

#### **4.3.1. Tiempo de colonización del sustrato:**

Esta variable de respuesta fue medida en el cuarto de incubación. Se hicieron observaciones de cada uno de los 275 bloques al azar y llevada a la bitácora de seguimiento de la colonización del bloque cada siete días.

Los datos para el análisis del tiempo de colonización del sustrato se sacaron de esta bitácora, reportando en una tabla el tiempo que tardó cada bloque en colonizarse completamente (color blanco).

Con los datos del tiempo (en días) arrojados por estas observaciones se realizó un análisis de varianza unifactorial (tipo de formulación) con una variable de respuesta (días

colonización bloque), para 55 niveles con cinco repeticiones cada uno y un total de 275 observaciones. La tabla ANOVA muestra que el tipo de formulación y el tiempo de colonización del sustrato tienen una relación estadísticamente significativa (valor  $p < 0.05$ ) (anexo 17).

Al asegurar con el análisis estadístico que el tipo de formulación afecta la colonización del sustrato, se busca la mejor combinación de residuos para disminuir el tiempo de colonización de este, haciendo un análisis estadístico para cada variable del factor (cantidad de viruta de roble, residuo de algodón, cascarilla de cacao, salvado de trigo).

#### ***Análisis estadístico para cada variable del factor:***

El análisis estadístico de las variables del factor “tipo de formulación” se limita por la falta de sensibilidad en los datos tomados de la variable respuesta (tiempos de colonización con valores muy altos comparados con los valores de las variables) y la cantidad de muestra por valor de cada componente.

Inicialmente se realizaron regresiones lineales para obtener la tabla de comparación entre modelos de regresión (anexo 18) y se hizo un análisis de varianza a cada uno con el mejor modelo para identificar su relación con el tiempo de colonización del sustrato.

En el anexo 18 se muestran valores de R-cuadrado y correlaciones bajas para todas las variables evaluadas, lo cual no permite tener una buena aproximación para una ecuación resultante de estas regresiones para predecir valores óptimos.

Sin embargo se analizan las varianzas para cada variable con las regresiones sugeridas

(color rojo en la tabla del anexo 18) para observar la tendencia de la pendiente y determinar la relación con el número de días de colonización del bloque.

Cascarilla de cacao:

Una regresión con el modelo “cuadrado en Y – raíz cuadrada en X” (Mejor valor de R-cuadrado para el cacao referenciada en el anexo 18) con días de colonización del bloque como variable dependiente, y tipo de sustrato (cacao) como variable independiente (anexo 19) arroja la siguiente ecuación:

$$t = \left( 3347,71 + 1157,15 * (C)^2 \right)^2$$

t: tiempo de colonización del bloque (días)

C: kg de cascarilla de cacao

El valor p arrojado por el análisis de varianza (anexo 20) muestra una relación estadísticamente significativa entre los días de colonización del bloque y la cantidad de cacao presente en el sustrato (valor-p menor a 0.05). Lo que significa que la cantidad de cacao afecta el tiempo de colonización del bloque.

El valor positivo de la pendiente (anexo 19) detecta la relación directamente proporcional entre la cantidad de cacao y el número de días de colonización del bloque, es decir, a mayor cantidad de cacao mayor es el número de días de colonización del bloque.

Motosa de algodón:

Para una regresión con el modelo “Inverso en Y – Cuadrado en X” (Mejor valor de R-cuadrado para el algodón en el anexo 18) con días de colonización del bloque como variable dependiente, y tipo de sustrato (motosa de algodón) como variable independiente (anexo 21) arroja la siguiente ecuación:

$$t = \frac{1}{(0.0194177 - 0.00197768 * (A)^2)}$$

A: kg de residuo de algodón

El valor-p arrojado por el análisis de varianza (anexo 22) podría asegurar una relación estadísticamente significativa entre los días de colonización del bloque y la cantidad de algodón presente en el sustrato (valor-p menor a 0.05).

Es posible que el residuo del algodón afecte el tiempo de colonización, pero su débil correlación puede llevar a deducir que este siempre debe estar combinado con otro residuo para mejores resultados.

Viruta de roble:

Para una regresión con el modelo “Logarítmico en Y – Raíz cuadrado en X” (Mejor valor de R-cuadrado para la viruta relacionado en el anexo 18) con días de colonización del bloque como variable dependiente, y tipo de sustrato (viruta de roble) como variable independiente (anexo 23) arroja la siguiente ecuación:

$$t = \exp(4,362 - 0,228015 * (V)^2)$$

V: kg de viruta de roble

Tomando como base que el valor-p arrojado por el análisis de varianza muestra una relación estadísticamente significativa entre los días de colonización del bloque y la cantidad de viruta presente en el sustrato (valor-p menor a 0.05), podríamos determinar con los valores de sus coeficientes (anexo 24), que su relación es inversamente proporcional, es decir, a mayor cantidad de viruta menor es el número de días de colonización del bloque.

### Salvado de Trigo:

Para una regresión con el modelo “Cuadrado en Y – Raíz cuadrado en X” (Mejor valor de R-cuadrado para el salvado de trigo relacionado en el anexo 18) con días de colonización del bloque como variable dependiente, y tipo de sustrato (salvado de trigo) como variable independiente arroja la siguiente ecuación:

$$t = (3682,46 + 909,422 * (T)^2)^2$$

T: kg de salvado de trigo

El valor-p arrojado por el análisis de varianza (anexo 26) muestra una relación estadísticamente significativa entre los días de colonización del bloque y la cantidad de trigo presente en el sustrato (valor p menor a 0.05).

Es posible que el trigo, al igual que las otras variables, afecte el tiempo de colonización, pero su débil correlación (anexo 18) puede llevar a deducir que este siempre debe estar combinado con otro residuo para mejores resultados.

Los anteriores análisis pueden definir la relación (directa o indirecta) de cada componente del sustrato con el tiempo de colonización del bloque, pero para obtener formulaciones óptimas con un número determinado de días de colonización, se deben evaluar combinaciones entre residuos:

### **Regresiones múltiples**

#### Viruta de roble, motosa de algodón, cascarilla de cacao y salvado de trigo:

En esta regresión múltiple se encontró que el valor-p para todos los factores estudiados es demasiado alto (anexo 27) y las correlaciones (anexo 28) muestran una alta dependencia de las variables entre si (valores muy cercanos a 1), lo que podría estar interfiriendo para dar valores mas correctos en una regresión múltiple.

El hacer análisis con estos resultados estaría llevando a un error, es por ello que para simplificar el modelo y tener una relación más aproximada que la de esta regresión, se excluye el salvado de trigo del análisis por ser la variable que presenta mayor valor-p.

*Viruta de roble, motosa de algodón, y cascarilla de cacao:*

El análisis de regresión múltiple para los días de colonización del bloque, viruta de roble, motosa de algodón y cascarilla cacao (Anexo 29) arroja una ecuación poco confiable debido a que la matriz de correlación (Anexo 30) arroja valores mayores que 0,5 lo que implica una alta correlación (dependencia de las variables entre si).

*Viruta de roble y motosa de algodón:*

Se hace una exclusión del cacao (mayor valor de p en el anexo 29) y se obtiene una regresión (anexo 31) que permite observar la relación apropiada entre algodón y viruta de roble para nuestro factor de estudio: “días de colonización del sustrato” (valores de p menores a 0,05 relacionados en el anexo 31 y correlaciones menores a 0,5 relacionados en el anexo 32).

La ecuación resultante de esta regresión múltiple (tabla 13) permite ver una relación entre la cantidad de viruta de roble, la cantidad de motosa de algodón y los días de colonización del bloque. Esta relación es confiable debido a los valores de correlación (anexo 32) los cuales muestran que las variables son independientes entre si.

Partiendo de estas dos variables independientes (viruta de roble y motosa de algodón) se pudo hallar, por medio de regresiones múltiples con las otras variables, combinaciones que permiten predecir formulaciones de sustrato para un determinado número de días deseado (tabla 13).

**Tabla 13. Ecuaciones que describen la relación entre pares de componentes independientes entre si.**

	Segundo componente	Ecuación que los relaciona*	Coef correlación (entre variables)
<b>Viruta de roble</b>	cascarilla de cacao	$t = 68,1248 - 6,35307*V + 2,82027*C$	0,4718
	salvado de trigo	$t = 69,2826 - 7,43382*V + 5,21932*T$	0,1345
<b>Motosa de Algodón</b>	cascarilla de cacao	$t = 48,752 + 4,37184*A + 7,88061*C$	0,4718
	salvado de trigo	$t = 56,6312 + 1,05707*A + 8,42699*T$	0,1345
<b>Viruta de roble y Motosa de algodón</b>		$t = 80,1248 - 9,48757*V - 3,82301*A$	0,4718

\* t: tiempo de colonización del bloque, C: Cascarilla de cacao, A: Motosa de Algodón, V: Viruta de roble, T: Salvado de trigo.

Al analizar cada una de las ecuaciones resultantes de las regresiones múltiples, se encuentra que todas las combinaciones con viruta de roble predicen disminuciones en días por cada gramo de este residuo adicionado (pendientes negativas). (Tabla 13)

Combinaciones entre motosa de algodón y salvado de trigo, y entre motosa de algodón y cascarilla de cacao no son recomendables debido a que sus pendientes son positivas y el número de días solo podría aumentar con estas combinaciones.

Los tratamientos que mejor tiempo de colonización presentaron (17 días) fueron los tratamientos 11 y 54 los cuales están compuestos solo por viruta de roble y salvado de trigo (anexo 1).

Con respecto al aporte de la viruta de roble se conoce que la utilización de sustratos lignocelulosicos para cultivar hongos es dependiente de su capacidad para sintetizar

enzimas hidrolíticas y oxidativas (biosíntesis) las cuales convierten componentes individuales (celulosa, hemicelulosa, lignina) en componentes de bajo peso molecular que puede ser asimilados por nutrición (Buswell et al. 1996). Es por ello que la producción de estas enzimas por el micelio del hongo es una parte crucial del proceso de colonización y un determinante en el rendimiento de los hongos. (Jaramillo y Rodríguez, 2001) Teniendo en cuenta que el trigo es el componente con mayor cantidad de nitrógeno (Anexo 4), se podría decir que el micelio de *L.edodes* en este tipo de sustrato (combinación de viruta de roble y trigo) logró una mejor producción de enzimas como respuesta al nitrógeno como nutriente, el cual es considerado como factor limitante del crecimiento (Kaal *et al.*, 1995) y permitió una biosíntesis mas rápida (tiempo menor de colonización del bloque).

Es importante evaluar el tiempo de colonización del sustrato como un indicativo de la rapidez para metabolizar el alimento por parte del hongo. Los resultados estadísticos arrojaron que el tipo de formulación del sustrato afecta el tiempo de colonización del bloque. El valor p (anexo 17) permitió asegurar con un 95% de confianza que existe un efecto real del tipo de formulación del sustrato sobre el tiempo que tarda en colonizarse el bloque.

En la figura 8 se puede observar que el 56 % de los tratamientos tuvieron tiempos de colonización mayores a 70 días, lo cual es mayor a lo reportado por Fung *et al.*, 2003, quienes usaron residuos agroindustriales como la motosa de algodón para la producción del shiitake (70 días de incubación). De este 56%, alrededor del 70 %, no colonizaron totalmente el bloque. (Para efectos estadísticos se asumió para estos experimentos 73 días de colonización del sustrato).



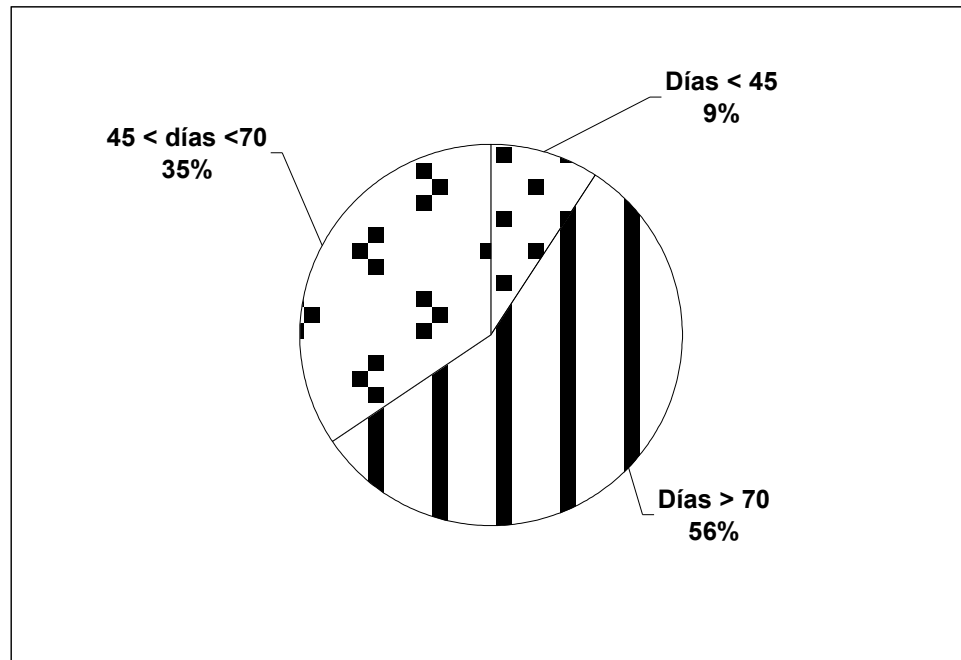


Figura 8. Tiempos de colonización de *L. edodes* en los diferentes sustratos.

■ : Días de colonización mayor a 70 días, □ días de colonización menores a 45 días

□ : Días de colonización entre 45 a 70 días.

Un tiempo de colonización alto puede generarse debido a varios factores: el pH de la formulación y el exceso de CO<sub>2</sub>. El pH es controlado por la adición de 1 a 2% de CaCO<sub>3</sub> y se encontró que el 58% de los bloques con tiempos de colonización mayores a 70 días no contenían carbonato de calcio. El exceso de CO<sub>2</sub> puede ser generado por exceso de nitrógeno (relación carbono/nitrógeno menor de 40:1), el cual es perdido en forma amoniacal. Este proceso fermentativo genera un aumento de temperatura y una alta oxidación de la materia orgánica hasta agua y CO<sub>2</sub> (Fundases, 2007). El 12% de los bloques con tiempos de colonización superiores a 70 días contenían una relación C/N menor a 40:1, hecho que también puede justificar los altos tiempos requeridos para su colonización.

Para el 22% restante de los bloques con altos tiempos de colonización, se tienen casos puntuales de exceso de  $\text{CaCO}_3$ , contaminación y ausencia de viruta de eucalipto

#### 4.3.2. Producción de cuerpos fructíferos

Después de 73 días muchos bloques no habían formado micoderma café (según lo reportado en la literatura esta cantidad de días es muy alta y por tanto no es viable económicamente o probablemente no forme cuerpo fructífero). Se decide abrir las bolsas para aumentar la aireación del bloque y disminuir así los niveles de  $\text{CO}_2$ .

Al abrirlas, no ocurre lo esperado (acelerar el proceso de maduración del micelio al disminuir cantidades de  $\text{CO}_2$ ) y comienza un brote de contaminación en algunos de los bloques en el cuarto de fructificación. De dichos bloques no hubo producción alguna de cuerpos fructíferos.

Para encontrar una relación entre el hongo invasor y la inhibición de los carpóforos se caracterizó dicho hongo y se encontró que de igual forma que el *Trichoderma sp.*, el hongo tuvo un crecimiento en forma circular y sus esporas eran de color verde.

Teniendo en cuenta los siguientes aspectos se puede terminar de identificar al hongo invasor posiblemente como *Trichoderma sp* (Figura 9):

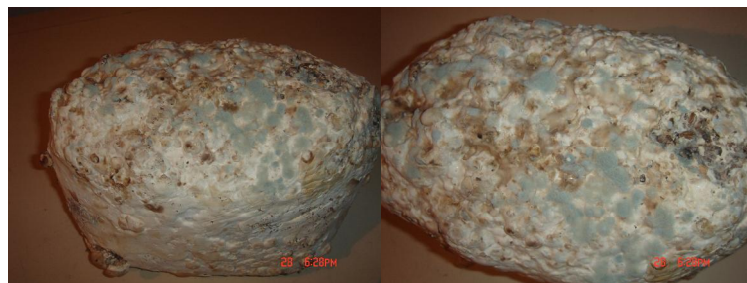


Figura 9. Contaminación de bloques con *Trichoderma harzianum*

Es un hongo que frecuentemente parasita a los hongos.

- Que puede inhibir ó reducir los cuerpos fructíferos.
- Es uno de los contaminantes más recurrentes en los cultivos de hongos comestibles y en menor grado en el cultivo agar y semilla.
- Prolifera durante la cosecha.
- Prefiere pH ácidos (4 - 5,5). (Stamets y Chilton, 1983; Yoshie *et al.*, 2002)

Los grandes índices de contaminación con este hongo, no permitieron obtener los suficientes resultados para determinar las variables de respuesta que solo se pueden medir después de la cosecha (eficiencia biológica, rendimiento, precocidad de colonización, tamaño de píleo) compararlas estadísticamente y determinar el mejor tratamiento. Solo pueden ser medidas para 4 tratamientos a los que se les realizó el choque térmico cuando se evidencio micoderma café, y analizadas solo para dos de estos cuatro por ser los únicos que poseían replica con producción de cuerpos fructíferos.

***Variables cuantitativas en la producción de cuerpos fructíferos:***

Se obtuvieron cosechas de los tratamientos 1, 11, 43 y 54 los cuales están compuestos como se muestra en la Tabla 14 y arrojan las variables de respuesta mostradas en la tabla 15.

**Tabla 14. Composición de los tratamientos 1, 11, 43 y 54**

Tratamiento	% Viruta de roble	% Motosa de algodón	% Cáscara de cacao	% Salvado de trigo	% CaCO <sub>3</sub>	% CaSO <sub>4</sub>
1	75	25	0	0	0	0

Tratamiento	% Viruta de roble	% Motosa de algodón	% Cáscara de cacao	% Salvado de trigo	% CaCO <sub>3</sub>	% CaSO <sub>4</sub>
11	75	0	0	20	5	0
43	75	0	0	20	2,5	2,5
54	75	0	0	25	0	0

**Tabla 15. Eficiencia biológica, tamaño de píceo, rendimiento y precocidad de colonización para los tratamientos con cosecha.**

	Bloque 11 B	Bloque 11 E	Bloque 1 A	Bloque 1 B	Bloque 43 D	Bloque 54 A
<b>Eficiencia biológica (%)</b>	12,7	12,3	7,5	3,1	16,1	21,5
<b>Tamaño promedio de píceo (cm.)</b>	9,5	7,3	10,1	6,0	4,7	9,3
<b>Rendimiento (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	2,1	2,1	1,2	0,5	2,5	3,8
<b>Precocidad de colonización. (días)</b>	66,0	72,0	66,0	80,0	125,0	74,0

El estudio comparativo (análisis de varianza para cada variable de respuesta) solo se pudo realizar para los tratamientos 1 y 11 por ser los únicos que poseen replica.

### **Análisis estadístico para tratamientos 1 y 11**

Los análisis de varianza obtenidos para el tamaño de píceo y precocidad de colonización (anexos 33 y 35) indica que no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), es decir, el tratamiento no influye en el tamaño del píceo y la precocidad de colonización. Este valor  $p$  es el resultado de la similitud de los datos para los dos tratamientos con respecto al tamaño del píceo evidenciado en los intervalos LSD (anexo 34 y 36)

El resultado para la precocidad de colonización puede deberse a que los choques térmicos para tres de los tratamientos se realizaron el mismo día. Es decir, si la precocidad de colonización es el tiempo transcurrido desde la inoculación hasta la aparición de los primeros carpóforos, y la aparición de estos esta relacionada con el choque térmico, los valores se ven influenciados y se tornan similares.

El tamaño de píleo mayor reportado por Philippoussis *et al.*, 2003 es de 6,83 cm., por Gaitan *et al.*, es de 15 cm. y por González *et al.*, 2006 es de 10,8 cm. Estos valores dejan ubicar los tratamientos reportados en este estudio en una buena posición, por tamaño de píleo, comparado con los encontrados en la literatura

Para las variables rendimiento y eficiencia biológica, se encuentran algunas diferencias significativas (anexos 38 y 40). Los valores que se sobreponen logran que el valor p arrojado (0.0808 y 0,0847 respectivamente) permita asegurar con solo un 92% de confiabilidad que el tratamiento influye en el rendimiento.

Analizando los tratamientos 1 y 11 se encuentra que el tratamiento # 11 presentó la mejor eficiencia biológica (12.66 y 12.25%) con respecto a la eficiencia biológica del tratamiento 1 (7.52 y 3.09%) (tabla 15) para la primera cosecha. Teniendo en cuenta que existen diferencias significativas, se puede elegir al tratamiento 11 con respecto al 1 como el sustrato donde mejor se comportó el hongo. Debemos anotar que las eficiencias de los bloques 43 y 54 son mayores que estas pero que no se pueden compara estadísticamente y sería necesario repetir el experimento para poder hacerlo. Las eficiencias biológicas reportadas por Gaitan *et al.*, 2006 (EB desde 37,02% a 93,25%), Jaramillo y Rodríguez año (EB alrededor del 75%), Philippoussis *et al.*, 2003 (EB 54,17%) y González *et al.*, 2006 (EB 55,5% y 44,2%) son mucho mayores a las halladas en esta investigación debido a que estas corresponden a un total de 2 a 3 cosechas consecutivas mientras que en esta investigación solo se logró obtener la primera cosecha debido a

problemas de contaminación.

En la siguiente fotografía (Figura 10) se pueden observar los cuerpos fructíferos del bloque # 11 con 4 días de formación del cuerpo fructífero y una vez cosechados.

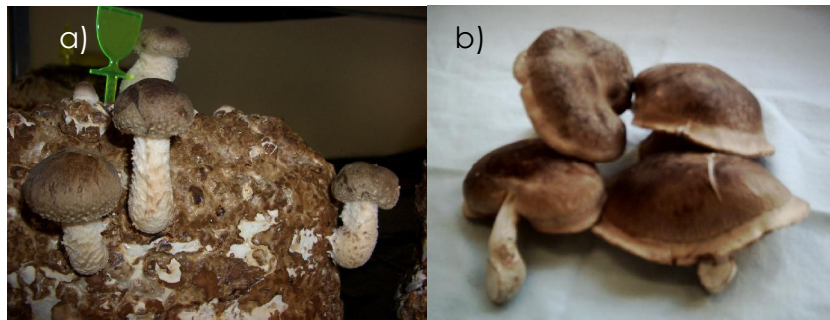


Figura 10. Cuerpos fructíferos del bloque # 11. a) Fructificación 4 días después de la obtención de los primeros primordios, b) shiitake cosechado.

#### **4.3.3. Análisis de los estudios bromatológicos**

Estos análisis permitieron determinar las cualidades nutricionales del sustrato para los hongos (relación C:N), valor nutricional de hongos cosechados y evaluación de la posible utilización de los bloques después de la cosecha como alimento para rumiantes.

#### **Análisis bromatológicos para componentes del sustrato.**

Salmones *et al.*, 2006 reportó para altas eficiencias biológicas una relación carbono nitrógeno de 159,6:1 para el bagazo de caña y 131,1:1 para la hoja de la caña de azúcar. Se encuentra importante identificar la importancia de estos valores en los resultados de este proyecto.

Se realiza una distribución de la relación C:N en los diferentes tratamientos (tabla 16), donde se encuentra que solo 14 tratamientos están en el rango de datos reportados por salmones *et al.*, 2006.

**Tabla 16. Distribución de la relación C:N para los diferentes tratamientos**

<b>Rango de valores para la relación C:N</b>	<b># tratamientos</b>	<b>%</b>
Menores que 51	16	29,09%
entre 50 y 100	25	45,45%
Entre 100 y 150	9	16,36%
mayores a 150	5	9,09%

Es importante resaltar que entre este 16% (valores entre 100 y 150: 1) se encuentran 3 de los sustratos que produjeron cuerpos fructíferos y con menor tiempo de colonización del sustrato (menores a 23 días).

#### **Análisis bromatológicos para hongos:**

Considerando que los tratamientos 1 y 11 fueron los sustratos que proporcionaron menor tiempo en el desarrollo del cuerpo fructífero, se realizaron análisis bromatológicos a los hongos producidos por estos, para identificar la producción más rica en nutrientes. En la tabla 17 se muestra la composición nutricional de los hongos:

**Tabla 17. Composición química hongos cosechados de los tratamientos 1 y 11\***

<b>Composición química (%)</b>	<b>Muestras</b>	
	<b>Hongos sustrato # 1</b>	<b>Hongos sustrato # 11</b>
Calcio (Ca)	0.03	0.03

	<b>Muestras</b>	
Cenizas (Cen)	5.8	6
Extracto Etéreo (EE)	1.1	1.2
Fibra cruda (FC)	23.1	19.1
Fósforo (P)	0.34	0.32
Humedad	79	77.2
Proteínas (Pr)	20.8	26.1

\* Resultados expresados en base seca

El valor contenido de proteína hallado en los hongos producidos por el tratamiento # 11 (26.1%) fue superior al obtenido con el tratamiento # 1 e incluso se obtuvo un porcentaje más alto que el reportado en base seca por Gaitan *et al.*, 2006 en sustratos de ciruela pasa, cebada y salvado de trigo (14.87, 16.12 y 14.72, respectivamente).

La cantidad de proteínas presentes en los hongos de los tratamientos 1 y 11, (20.8 y 26.1, respectivamente) son mayores que las que contiene la carne (15-20%) (Castillo, 2007), que las presentes en el huevo (13%) (Anónimo 1) y en la leche (3-3.5%) (Anónimo 2); por tanto el shiitake puede ofrecerse como un alimento alternativo para una dieta que requiera altos consumos de proteína.

El contenido de fibra cruda es el segundo valor más alto encontrado en los hongos, el tratamiento # 1 posee mayor cantidad de FC (23.1%) que el tratamiento # 11 (19.1%). Comparando los resultados de FC (en base seca) reportados por Gaitan *et al.*, 2006 para *L. edodes* en sustratos de ciruela pasa, cebada y salvado de trigo (1.95, 2.15 y 2.2, respectivamente), se observa que los valores obtenidos en este trabajo son mayores, por lo que se podría recomendar su consumo para mejorar la actividad digestiva del cuerpo humano.



El extracto etéreo representa el contenido de grasa, el cual no es muy diferente entre los tratamientos 1 y 11 (1.1 y 1.2%, respectivamente). El bajo contenido encontrado con respecto al reportado por Morais *et al.*, 2000 para shiitake cultivados en viruta de madera (1.82-2.76 % en base seca) confirma el bajo contenido de grasa de los hongos.

El fósforo es un elemento importante dentro de la nutrición humana porque interviene en la formación y el mantenimiento de los huesos, el desarrollo de los dientes, la secreción normal de la leche materna, la formación de los tejidos musculares y el metabolismo celular (Licata,2007), sin embargo no puede ser mayor a 0.7 % del alimento consumido diariamente (Demirci,2006). El contenido de fósforo hallado en los cuerpos fructíferos de *L. edodes* para los tratamientos 1 y 11 son menores a este valor por lo tanto pueden ser consumidos diariamente.

El porcentaje de calcio encontrado en los hongos de los dos tratamientos es acorde a la cantidad de calcio reportado por Manzi *et al.*, 1999, pero el porcentaje de cenizas y humedad son bajos si se comparan con los resultados obtenidos por dichos autores (tabla 18).

**Tabla 18. Porcentaje de Ca, Cenizas y humedad en el hongo *L.edodes* Manzi *et al.*, 1999\***

Composición química %	<i>L.edodes</i> en salvado de trigo y remolacha
Ca	0.014-0.042
Cenizas	6.9-10.5
Humedad	90

\* Resultados reportados en base seca.

Los resultados obtenidos de la humedad para los tratamientos #1 y #11 (79 y 77.2, respectivamente) pueden estar respaldados por parámetros como el tiempo después de la

cosecha, la temperatura y la humedad relativa durante el crecimiento del hongo (Bano y Rajarathnam,1988); ya que los hongos pudieron haber perdido un poco de humedad mientras fueron trasladados desde Rionegro hasta las instalaciones de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín y algunas veces la temperatura osciló entre  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ , que fue un poco más alta que la recomendada en la literatura para el cuarto de fructificación ( $16-18^\circ \text{C}$ ) (Stamets y Chilton, 1983).

#### **Análisis bromatológico para mejor bloque:**

Los hongos con mayor contenido proteico son los del tratamiento # 11, por ello son considerados los de más alto valor nutricional. Teniendo en cuenta estos resultados se realizó un análisis bromatológico al sustrato # 11 para evaluar la posibilidad de utilizar dicho bloque, después de la cosecha, como alimento para rumiantes (tabla 19).

**Tabla 19. Composición química bloque 11 después de la cosecha\***

<b>Composición química %</b>	<b>Bloque # 11</b>	<b>Forrajes**</b>
Ca	2.47	0.8-0.9
FDN	59.8	50-70
P	0.32	0.2-0.4
Lignina	14.1	6-10
Pr	4.4	15

\*Resultados en base seca

\*\* Información suministrada por Cuellar, 2007

Comparando los resultados de los análisis bromatológicos para el bloque # 11 y la información suministrada por Cuellar (tabla 19), se observa que el porcentaje de calcio y de lignina son muy altos; el porcentaje de FDN, el porcentaje de fósforo se encuentran dentro del rango permitido y, el contenido proteico es muy bajo. Considerando estos resultados se puede analizar que el bloque # 11 no es conveniente usarlo para

alimentación animal; ya que su alto valor de lignina no permite que sea un alimento digerible y además la alta cantidad de calcio no es conveniente para el rumiante porque el exceso de calcio reduce la actividad cardíaca asociada con fallas respiratorias y por consiguiente, puede llegar a producir paros cardíacos (Navarro, 1987).

## 5. CONCLUSIONES

El tipo de medio de cultivo agarizado influencia significativamente el crecimiento del micelio de *L. edodes* sin importar el porcentaje de aserrín (0.2%, 0.3%) y el pH utilizado (5 y 5.5), obteniendo como mejores medios de cultivo el MYA y OMYA en comparación con el PDYA. Probablemente esto sea causado por la calidad nutricional del MYA y OMYA ya que estos poseen altos contenidos de carbohidratos más complejos comparados con el PDYA.

El pH y el porcentaje de aserrín de eucalipto no influencia significativamente el crecimiento micelial de *L. edodes* en los diferentes medios de cultivo agarizados evaluados. Esto implica mayor rapidez y agilidad en la preparación de los medios de cultivo.

El OMYA modificado a pH 5.5 no presentó diferencias significativas con relación al MYA pH 5.5, por lo tanto se puede utilizar como medio de cultivo para *L. edodes* presentando beneficios en costos y facilidad de preparación.

Todos los tratamientos para la obtención de la semilla, presentaron una densidad de micelio diferente entre si, lo que muestra una relación entre la calidad del micelio y el tratamiento aplicado.

El micelio de *L. edodes* creció en todas las combinaciones que contenían semillas de trigo, diferenciándose en la calidad y vigorosidad del hongo. Se identifica como mejor tratamiento el compuesto por 80% semilla de trigo – 20% viruta de eucalipto por su tiempo de colonización de la semilla y calidad de micelio.

Los tratamientos que menor tiempo de colonización presentaron (17 días) fueron los tratamientos 11, 51 y 54 (compuestos por viruta de roble y salvado de trigo); posiblemente por la activación de enzimas como respuesta a la cantidad de nitrógeno (trigo). Esto probablemente permitió un crecimiento del micelio en un menor tiempo gracias a la rápida degradación de la lignina contenida en la viruta de roble.

El tamaño del púleo y la precocidad de colonización obtenida con los tratamientos 1 y 11 no presentan diferencias significativas. Por ende la presencia de motosa de algodón o el salvado de trigo no proporciona elementos que diferencien estas dos variables.

Los hongos obtenidos con 75% viruta de roble, 20% de salvado de trigo y 5% CaSO<sub>4</sub> (tratamiento # 11) contienen el mayor porcentaje proteico de los cuerpos fructíferos evaluados (26,1%), y mayor a aquellos reportados por *Gaitan et al.*, 2006 donde obtienen valores de 14.9, 16.1 y 14.7%.

El sustrato resultante del proceso de transformación con *L. edodes* del tratamiento con 75% viruta de roble, 20% de salvado de trigo y 5% CaSO<sub>4</sub> (# 11) no es apto para alimentación de rumiantes por su alto valor de lignina y calcio; además de su bajo contenido proteico.

La cascarilla de cacao no es un buen suplemento para la obtención de cuerpos fructíferos de *L. edodes* bajo las condiciones y sustratos evaluados. La cascarilla aunque posee muchos contenidos proteicos, genera compactación en el bloque.

## 6. RECOMENDACIONES

Evaluar la importancia del uso de aserrín de eucalipto en la activación de enzimas lignocelulósicas de *L. edodes* en medios agarizados y su influencia en la adaptación del micelio en el sustrato de la etapa del semilla.

Evaluar la densidad y calidad del micelio en la obtención de semilla con lupa o al estereoscopio estableciendo el porcentaje de colonización de la superficie del grano, con el fin de establecer una técnica más reproducible y medible.

Para obtener resultados satisfactorios en la producción de shiitake, es necesario proporcionarle las condiciones adecuadas para su crecimiento y fructificación. Esto se refiere a sustratos celulósicos que contengan los nutrientes básicos para su crecimiento, además del control de las condiciones ambientales como la temperatura, humedad, incidencia de la luz, asepsia y concentración de oxígeno.(Fung *et al.*, 2003). Y para ellos se presenta un diseño de un cuarto de fructificación (anexo 41).

Para disminuir la posibilidad de contaminación en los cuartos de incubación y fructificación por exceso de humedad, se recomienda utilizar estanterías con niveles perforados.

La eficiencia biológica para los tratamientos 54 y 43 fueron significativamente altas

comparadas con los resultados de 1 y 11. Esto nos lleva a recomendar un segundo estudio con estos 4 tratamientos (con 7 replicas cada uno por vulnerabilidad del sustrato a contaminaciones) para identificar con mas claridad el mejor tratamiento

El análisis estadístico de las variables del factor “tipo de formulación” se limita por la falta de sensibilidad en los datos tomados de la variable respuesta (tiempos de colonización con valores muy altos comparados con los valores de las variables) y la cantidad de muestra por valor de cada componente. Se recomienda para próximas investigaciones reducir el tiempo de medición, tratando de ser más exacto en la variable tiempo.

Debido a la no existencia de estudios en Colombia del *L.edodes* como antioxidante se recomienda realizar una investigación sobre el uso de este hongo en su función de antioxidante.

## BIBLIOGRAFÍA Y CIBERGRAFÍA

Administración Municipal de Rionegro. 2007. Ubicación Geográfica Ciudad Santiago de Arma Rionegro. [En línea] [Consulta: mayo 24 de 2007] Disponible en: [www.rionegro.gov.co/plantillas/contenidoestatico/informacion\\_general/info\\_geografica.htm](http://www.rionegro.gov.co/plantillas/contenidoestatico/informacion_general/info_geografica.htm)

Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat, Japan .1997. Analysis on outbreak mechanism of mushroom pest fungi and insects and development of ecological control techniques (in Japanese). En Influence of contamination by *Penicillium brevicompactum* and *Trichoderma harzianum* during *Lentinula edodes* spawn run on fruiting in sawdust-based substrates.

Anónimo 1. 2007. La perfección nutricional. [En línea] [Consulta: abril 20 de 2007] Disponible en: [www.prama.com.ar/alimentos\\_saludables/huevo.htm](http://www.prama.com.ar/alimentos_saludables/huevo.htm).

Anónimo 2. 2007. Las propiedades de la Leche. [En línea] [Consulta: abril 20 de 2007]. Disponible en: [www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/novedades/leche%202.htm](http://www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/novedades/leche%202.htm).

Bano, Z., Rajarathnam, S. 1988. Pleurotus mushrooms. Part ii, nutritional value, post-harvest physiology, preservation and role as human food. En Nutrients in edible mushrooms: An inter-species comparative study. Food Chemistry, 65, 477–482.

Boyle D. 1998. Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other white-rot fungi in wood. Soil Biol. En: Biochem, 30: 817-823.



Boyle C. D., Kropp B.R., Reid I.D. 1992. Solubilization and mineralization of lignin by white-rot fungi. En: Applied and Environmental Microbiology, 58: 3217-3224.

Brisko NA, Babitskay VG, Bilay VT, Mitropolskaya NY. 2002 Biologically active substances from *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*. En Bioconversion of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potential of viticulture residues.

Buswell J.A., Cai Y.J., Chang S.T., Peberdy J.F., Fu S.Y. y Yu H.S. 1996. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. En: World Journal of Microbiology & Biotechnology 12: 537-542

Castillo J. I. 2007. Carne y sus derivados. [En línea] [Consulta: abril 20 de 2007]. Disponible en: [www.monografias.com/trabajos15/contaminacion-carne/contaminacion-carne.shtml](http://www.monografias.com/trabajos15/contaminacion-carne/contaminacion-carne.shtml)

Cavallazzi, R. Brito, Oliveira M, Villas-Bôas S & Kasuya M. 2004 Lignocellulolytic enzymes profile of three *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler strains during cultivation on eucalyptus bark-based medium Food. En: Agriculture & Environment Vol.2 (1) : 291-297. 2004.

Centro de estudios ecológicos Argentino. 1999. La Página Micológica Argentina SHIITAKE. [En línea] [: Abril 13 de 2007]. Disponible en: [www.cdeea.com/shitake.htm](http://www.cdeea.com/shitake.htm).

Chen, A.W., Arrol, N. & Stamets, P. 2000 Shiitake cultivation systems. En Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*. En: World Journal of Microbiology & Biotechnology 19: 551–557, 2003.

Chihara, G. 1978. Capítulo 21. Growth Parameters for gourmet and medicinal mushrooms species. En *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Stamets, Paul Editorial Ten speed press.2000

Conexcol. 2006 . [En línea] [Consulta: septiembre de 2006]. Disponible en: <http://clima.conexcol.com/cgi-bin/index.mpc?click=1&estado=Ver+%3E%3E&ciudad=Rionegro>).

Cuellar A.G. 2007 Coordinador del laboratorio de análisis químico y bromatológico. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

Demirci, M. (2006). Gıda Kimyası (pp. 105–131). En *The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds*.

Donoghue, J.D. & Denison, W.C. 1995 Shiitake cultivation: gas phase during incubation influences productivity. En *Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes**. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19: 551–557, 2003

Eggum B.O, y Guillord M, 1983. The nutritional quality of some oat varieties cultivated in Norway. En: *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)* 32: 67-73.

Eriksson K.E.L., Blanchette R.A., Ander P. 1990. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components. En: Springer-Verlag, New York.

Fernández, M. 2001. Cultivo comercial del Champiñón 4 [En línea] [Consulta: Septiembre 17 de 2005]. Disponible en: [www.zoetecnocampo.com/Documentos/champi/champi4.htm](http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/champi/champi4.htm).

Fundases.2007. Compostaje con EM. [En línea] [Consulta: Febrero 17 de 2007]. Disponible en: [www.fundases.com/p/pub-compostaje02.html](http://www.fundases.com/p/pub-compostaje02.html)

Fung, Y. W. Fung, T. W. Franco, M. 2003. Evaluación del crecimiento y producción de *Lentinula edodes*, Berk. Pegler (Shiitake) sobre diferentes sustratos a base de residuos agroindustriales colombianos. En: Rev. Asoc. Col.Ciencias. Biol (Col),15 (1):53-69.

Furukawa y Nobuchi 1996 Handbook of pest fungi and insects of cultivating mushrooms (in Japanese). En Influence of contamination by *Penicillium brevicompactum* and *Trichoderma harzianum* during *Lentinula edodes* spawn run on fruiting in sawdust-based substrates Mycoscience (2002) 43:277–280.

Gaitán, R; Esqueda M; . Gutiérrez A; Sánchez A; Beltrán M y Mata G. 2006. Bioconversion of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potential of viticulture residues. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2006) 71: 432–439

González T. B., Mata G. Catarino M. C. Gutiérrez G.2006. Cultivo experimental del hongo shiitake, *Lentinula edodes*, sobre dos subproductos agrícolas en Guerrero, México. [En línea] [Consulta: abril 20 de 2007]. Disponible en: [www.inecol.edu.mx/smdm/rmm/rmm\\_vol\\_23/9.%20SHIITAKE%20TEODORO%20BERBERN.pdf](http://www.inecol.edu.mx/smdm/rmm/rmm_vol_23/9.%20SHIITAKE%20TEODORO%20BERBERN.pdf)

Hatvani N, Mécs I. 2001. Production of laccase and manganese peroxidase by *Lentinula edodes* on malt-containing by-product of the brewing process. En: Process Biochem, 37:491–6.

Hu Changqing . Meguro Sadatoshi y Kawachi Shinsaku. 2003 Effects of physical properties of wood on the water activity of wood meal media for the cultivation of edible mushrooms. En: J Wood Sci (2004) 50:365–370.

Jaramillo, C. y Rodríguez, N. 2001. Cultivo de Shiitake en subproductos del café. En: Avances técnicos Cenicafé. 287: 1-3.

Jennings, D.H., 1995. The Physiology of Fungal Nutrition. En Influence of precipitated calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>) on shiitake (*Lentinula edodes*) yield and mushroom size. En: Bioresource Technology 90: 225–228.

Kawai, G., H. Koboyashi, Y. Fukumisha & Ohsaki, K.. 1996, Effect of liquid mycelial culture used as spawn on sawdust cultivation of shiitake (*Lentinula edodes*). En: Mycoscience 37: 201-207

Komatsu M (1976) Studies on *Hypocrea*, *Trichoderma* and allied fungi antagonistic to shiitake, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (in Japanese). En nfluence of contamination by *Penicillium brevicompactum* and *Trichoderma harzianum* during *Lentinula edodes* spawn run on fruiting in sawdust-based substrates.

Kaal, E.E., Field, J.A. y Joyce, T.W. 1995 Increasing lignolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogensufficient media En Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*.

Lang S. 2006. Mushroom demo slated for July 30 [En línea] [Consulta: 09 de abril de 2007]. Disponible en: [www.news.cornell.edu/stories/July06/photo.mushrooms.ssl.html](http://www.news.cornell.edu/stories/July06/photo.mushrooms.ssl.html).

Leatham, g. y Stalham. 1987. Capítulo 21. Growth Parameters for gourmet and medicinal mushrooms species. En Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Stamets, Paul Editorial Ten speed press. 2000.

Licata M. 2007. El fosforo en la nutrición. [En línea] [Consulta: Abril 14 de 2007]. Disponible en: [www.zonadiet.com/nutricion/fosforo.htm](http://www.zonadiet.com/nutricion/fosforo.htm)

Lynn, J. 1999. ¡Qué Hongo.! Las setas: un producto rico en ganancias [En línea] [Consulta: Agosto 13 de 2005]. Disponible en: [www.soyentrepreneur.com/pagina.hts?N=8865](http://www.soyentrepreneur.com/pagina.hts?N=8865)

Manzi, P., Gambelli, L., Marconi, S., Vivanti, V., y Pizzoferrato, L. 1999. Nutrients in edible mushrooms: An inter-species comparative study. En: Food Chemistry, 65, 477–482.

Mateos G. P. 2007. Nutrición de los microorganismos industriales. [En línea] [Consulta: Febrero 17 de 2007]. Disponible en: <http://nostoc.usal.es/sefin/MI/tema05MI.html>

Mertz ET (1975) Breeding for improved nutritional value in cereals. En: Friedman, Mendel (eds) Protein nutritional quality of foods and feeds, vol 2. New York: M Dekker, pp 1-12

Morais MH, Ramos AC, Matos N y Santos-Olivera EJ. 2000. Production of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) on lignocellulosic residues. En Bioconversion of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potential of viticulture residues.

Navarro D. L. Suplementación mineral en ovinos: ¿Por qué y cómo? FONAIAP DIVULGA N° 25 Julio- Septiembre 1987 [En línea] [Consulta: Abril 20 de 2007]. Disponible en: [www.ceniap.gov.ve/bdigital/fdivul/fd25/texto/suplementacion.htm](http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/fdivul/fd25/texto/suplementacion.htm)

Philippoussis, A; Diamantopoulou, P y Zervakis G. 2003. Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*. En: World Journal of Microbiology & Biotechnology 19: 551–557, 2003.

Rasca, L. 1990. Production of *Lentinula edodes* mycelia in liquid media: Improvement of mycelial growth by medium modification. Mushroom Journal of the Tropics, 10: 79-92.

Rojas, A;, Chaves A y Aguirre, D.2007. Características nutricionales y fermentativas de ensilajes de mezclas de forraje King Grass (*Pennisetum purpureum*) y pulpa de fruto integral de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) [En línea] [Consulta: Enero 17 de 2007]. Disponible en: [www.pejibaye.ucr.ac.cr/NutricionAnimal/Nutricion%20animal6](http://www.pejibaye.ucr.ac.cr/NutricionAnimal/Nutricion%20animal6).

Royse, D.J. & Bahler, C.C. 1986 Effects of genotype, spawn run time and substrate formulation on biological efficiency of shiitake. En Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*.

Royse, D. Bahler B. y Bahler C. 1990. Enhanced Yield of Shiitake by Saccharide Amendment of the Synthetic Substrate. En: Applied and environmental microbiology, Feb. 1990, p. 479-482

Royse, D.J. 1995 Specialty mushrooms. En Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*.

Royse, D.J. y Sanchez J.E. 2000 Influence of substrate wood-chip particle size on shiitake (*Lentinula edodes*) yield. En: Bioresource Technology 76, 229–233.

Royse, D.J., y Sanchez – Vazquez J.E. 2003. Influence of precipitated calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>) on shiitake (*Lentinula edodes*) yield and mushroom size. En: Bioresource Technology 90: 225–228.

Sabota, C. 1996 Strain of shiitake mushroom [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] and wood species affect the yield of shiitake mushrooms. En Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*.

Salmones, D., G. Mata, L.M. Ramos, K.N. Waliszewski, 2006. Cultivation of shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, in several lignocellulosic materials originating from the subtropics. En Cultivo experimental del hongo shiitake, *Lentinula edodes*, sobre dos subproductos agrícolas en Guerrero, México.

Savoile. 1998. En Resumen de conferencia. [En línea] [Consulta: Agosto 7 de 2005]. Disponible en: [www.reuna.edu.co/.../memorias/especies/Magistrales/](http://www.reuna.edu.co/.../memorias/especies/Magistrales/)

38\_CONFERENCIA%20hongos%20medicinales-%20UN.2003.htm

Shoji Ohga.1998. Effect of water potential on fruit body formation of *Lentinula edodes* in sawdust-based substrate. En: J Wood Sci (1999) 45:337-342.

Schuldt M. 2002. Relaciones Carbono/Nitrógeno [En línea] [Consulta: Febrero 17 de 2007]. Disponible en: [www.manualdelombricultura.com/wwwboard/messages2/2272.html](http://www.manualdelombricultura.com/wwwboard/messages2/2272.html)

Silva, E.; Machucab. A. y Milagres. A. 2005. Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains. En: Process Biochemistry, 40 (1): 161 – 164.

Smith, C. 1997 Commercial production of shiitake substrates. En Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*.

Stamets, P. y Chilton, J. 1983. The mushroom cultivator; a practical guide to growing mushrooms at home. Washington. Agarikon press.

Stamets, P. 2000. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Editorial Ten speed press. Washington.

Togashi I, Itoh K, Giusi S, Harada A 1996. Fungal contamination of fruiting houses for the sawdust-based cultivation of *Lentinula edodes* in Hokkaido and the effects of benomyl on *Trichoderma spp.* Growth (in Japanese). En Influence of contamination by *Penicillium brevicompactum* and *Trichoderma harzianum* during *Lentinula edodes* spawn run on fruiting in sawdust-based substrates.



Toharia, M.1985. El libro de las setas. Madrid. Editorial Alianza.

Tokimoto K (1985) Physiological studies on antagonism between *Lentinus edodes* and *Trichoderma* spp. in bedlogs of the former (in Japanese). En Influence of contamination by *Penicillium brevicompactum* and *Trichoderma harzianum* during *Lentinula edodes* spawn run on fruiting in sawdust-based substrates.

Universidad Nacional General San Martín.2005. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas. Requerimientos básicos para el Cultivo del Hongo Comestible *Lentinula edodes* (Shiitake) [En línea] [Consulta: Abril 13 de 2007]. Disponible en: [www.iib.unsam.edu.ar/](http://www.iib.unsam.edu.ar/).

Yang, Q. Y. Jong S.C., 1987. A quick and efficient method of making mushroom spawn. En: Mushroom Science XII, p 317-324.

Yoshie T. Hisao I. Shoji O. 2002. Influence of contamination by *Penicillium brevicompactum* and *Trichoderma harzianum* during *Lentinula edodes* spawn run on fruiting in sawdust-based substrates. En: Mycoscience (2002) 43:277–280.

## ANEXOS

### Anexo 1. Diseño de experimentos para la producción de cuerpos fructíferos

TTO	% Viruta de roble	% Motosa de algodón	% Cáscarilla de cacao	% Salvado de trigo	% CaCO <sub>3</sub>	% CaSO <sub>4</sub>
1	75	25	0	0	0	0
2	25	50	0	25	0	0
3	25	50	0	20	2,5	2,5
4	0	25	50	20	0	5
5	50	25	0	20	5	0
6	50	25	0	25	0	0
7	50	0	50	0	0	0
8	25	0	50	20	5	0
9	25	25	25	25	0	0
10	25	0	50	25	0	0
11	75	0	0	20	5	0
12	0	25	75	0	0	0
13	0	0	75	20	2,5	2,5
14	75	0	0	20	0	5
15	25	50	0	20	5	0
16	25	0	50	20	0	5
17	75	0	25	0	0	0
18	0	75	0	20	0	5
19	0	75	0	20	5	0
20	50	50	0	0	0	0
21	0	50	50	0	0	0
22	50	0	25	20	0	5
23	50	0	25	20	2,5	2,5
24	0	0	75	25	0	0
25	50	25	25	0	0	0
26	50	25	0	20	0	5
27	25	25	25	20	5	0
28	25	0	50	20	2,5	2,5

TTO	% Viruta de roble	% Motosa de algodón	% Cáscarilla de cacao	% Salvado de trigo	% CaCO <sub>3</sub>	% CaSO <sub>4</sub>
29	0	0	100	0	0	0
30	0	50	25	20	5	0
31	0	50	25	20	0	5
32	0	25	50	25	0	0
33	25	50	0	20	0	5
34	50	0	25	25	0	0
35	0	25	50	20	2,5	2,5
36	0	25	50	20	5	0
37	0	50	25	20	2,5	2,5
38	25	50	25	0	0	0
39	25	0	75	0	0	0
40	25	25	50	0	0	0
41	50	0	25	20	5	0
42	25	25	25	20	0	5
43	75	0	0	20	2,5	2,5
44	25	25	25	20	2,5	2,5
45	0	100	0	0	0	0
46	0	0	75	20	0	5
47	0	50	25	25	0	0
48	25	75	0	0	0	0
49	0	75	0	20	2,5	2,5
50	0	0	75	20	5	0
51	100	0	0	0	0	0
52	0	75	0	25	0	0
53	50	25	0	20	2,5	2,5
54	75	0	0	25	0	0
55	0	75	25	0	0	0

## Anexo 2. Análisis bromatológicos

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MEDELLÍN  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL  
LABORATORIO DE ANALISIS QUIMICO Y BROMATOLOGICO  
CALLE 59 A # 63 - 20 BLOQUE 11 OFICINA 116  
TELEFAX: 4309034  
E-mail: bromatol@unal.edu.co



**Informe No:** 33318

**Fecha:** 2006-07-12

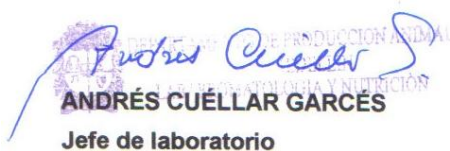
**Nombre del interesado:** UNIVERSIDAD EAFIT  
**Tipo de alimento:** CASCARILLA DE ALGODÓN

CALCIO %	0,12
CENIZAS %	3,76
EXTRACTO ETereo %	2,69
FIBRA CRUDA %	57,42
FIBRA DETERGENTE ACIDO %	67,40
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO %	86,60
FOSFORO %	0,08
HUMEDAD %	11,80
LIGNINA %	7,10
MATERIA SECA %	88,20
PROTEINAS %	3,93

### OBSERVACIONES

Resultados expresados en base seca.

Factor de conversión para la proteína: 6,25.

  
**ANDRÉS CUELLAR GARCÉS**  
Jefe de laboratorio

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MEDELLÍN  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL  
LABORATORIO DE ANALISIS QUIMICO Y BROMATOLOGICO  
CALLE 59 A # 63 - 20 BLOQUE 11 OFICINA 116  
TELEFAX: 4309034  
E-mail: bromatol@unal.edu.co



**Informe No:** 33316

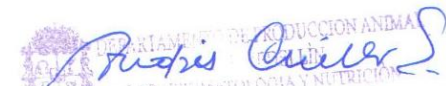
**Fecha:** 2006-07-12

**Nombre del interesado:** UNIVERSIDAD EAFIT  
**Tipo de alimento:** CASCARILLA DE CACAO

CALCIO %	0,43
CENIZAS %	10,97
EXTRACTO ETereo %	1,94
FIBRA CRUDA %	26,46
FIBRA DETERGENTE ACIDO %	43,00
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO %	45,00
FOSFORO %	0,30
HUMEDAD %	5,80
LIGNINA %	8,20
MATERIA SECA %	94,20
PROTEINAS %	13,78

#### OBSERVACIONES

Resultados expresados en base seca.  
Factor de conversión para la proteína: 6,25.

  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL  
LABORATORIO DE ANALISIS QUIMICO Y BROMATOLOGICO  
**ANDRÉS CUÉLLAR GARCÉS**  
Jefe de laboratorio

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MEDELLÍN  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL  
LABORATORIO DE ANALISIS QUIMICO Y BROMATOLOGICO  
CALLE 59 A # 63 - 20 BLOQUE 11 OFICINA 116  
TELEFAX: 4309034  
E-mail: bromatol@unal.edu.co



Informe No: 33319

Fecha: 2006-07-12

Nombre del interesado: UNIVERSIDAD EAFIT  
Tipo de alimento: SALVADO DE TRIGO

CALCIO %	0,11
CENIZAS %	5,41
EXTRACTO ETereo %	3,63
FIBRA CRUDA %	11,40
FIBRA DETERGENTE ACIDO %	13,70
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO %	41,30
FOSFORO %	1,02
HUMEDAD %	10,20
LIGNINA %	3,20
MATERIA SECA %	89,80
PROTEINAS %	17,74

#### OBSERVACIONES

Resultados expresados en base seca.  
Factor de conversión para la proteína: 6,25.

  
ANDRÉS CUÉLLAR GARCÉS  
Jefe de laboratorio

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MEDELLÍN  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL  
LABORATORIO DE ANALISIS QUIMICO Y BROMATOLOGICO  
CALLE 59 A # 63 - 20 BLOQUE 11 OFICINA 116  
TELEFAX: 4309034  
E-mail: bromatol@unal.edu.co



Informe No: 33317


Fecha: 2006-07-12

Nombre del interesado: UNIVERSIDAD EAFIT  
Tipo de alimento: VIRUTA DE ROBLE

CALCIO %	0,07
CENIZAS %	0,89
EXTRACTO ETereo %	0,94
FIBRA CRUDA %	74,65
FIBRA DETERGENTE ACIDO %	83,80
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO %	88,90
FOSFORO %	0,02
HUMEDAD %	12,00
LIGNINA %	6,20
MATERIA SECA %	88,00
PROTEINAS %	0,64

#### OBSERVACIONES

Resultados expresados en base seca.  
Factor de conversión para la proteína: 6,25.

 DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL  
*Andrés Cuéllar*  
ANDRÉS CUÉLLAR GARCÉS  
Jefe de laboratorio

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MEDELLÍN  
 FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
 DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL  
 LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO Y BROMATOLÓGICO  
 E-mail: bromatol@unalmed.edu.co  
 Autopista Norte Carrera 64\* Calle 65 Bloque 11 Oficina 116 (Medellín)  
 Tel/Fax: 430 90 34



Informe No: 35126

Fecha Impresión: 13/02/2007

Fecha aviso:

**RESULTADOS DE ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS**

Nombre del interesado: UNIVERSIDAD SAFIT  
 Dirección: Carrera 49 7SUR-50, Tel: 261 95 00 EXT 668  
 Tipo de alimento: SUSTRATO  
 Descripción: 11-B

		Método de análisis
CALCIO %	2.47	ESPECTROFOTOMETRÍA A. A.
CENIZAS %	10.7	INCINERACION DIRECTA
EXTRACTO ETHEREO %	0.3	EXTRACCIÓN SOXHLET CON INMERSIÓN
FIBRA CRUDA %	42.8	WEENDE
FIBRA DETERGENTE ACIDO %	55.9	VAN SOEST
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO %	59.8	VAN SOEST
FÓSFORO %	0.32	ESPECTROFOTOMETRÍA U. V. V. S.
HUMEDAD %	52.6	TERMOGRAVIMÉTRICO POR SECADO
LIGNINA %	14.1	VAN SOEST
MATERIA SECA %	47.4	TERMOGRAVIMÉTRICO POR SECADO
PROTEÍNAS %	4.4	KJELDAHL

**OBSERVACIONES**

Factor de conversión para la proteína: 6.25  
 Resultados expresados en base seca

\*Este informe no se puede reproducir en forma parcial ni total.  
 \*En caso de requerir una copia del informe de resultados solicítelo al Coordinador del Laboratorio.  
 \*Los resultados son aplicables sólo a la muestra de ensayo.

ANDRÉS CUÉLLAR GARCÉS  
 Coordinador del Laboratorio de Análisis Químico y Bromatológico



**Anexo 3. Composición de los componentes de los sustratos para la producción de cuerpos fructíferos.**

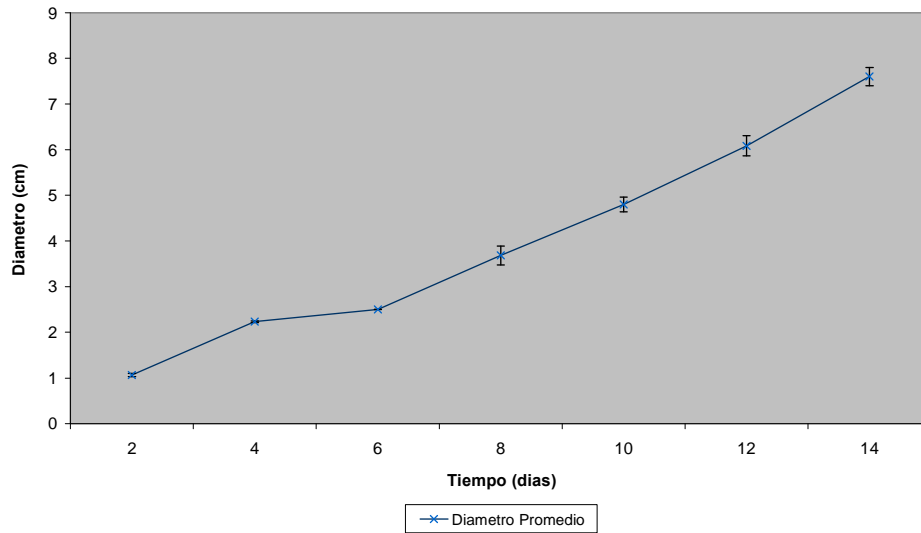
<b>ANALISIS BROMATOLOGICOS</b>				
	<b>VIRUTA</b>	<b>ALGODÓN</b>	<b>CACAO</b>	<b>TRIGO</b>
CALCIO	0,07%	0,12%	0,43%	0,11%
CENIZAS	0,89%	3,76%	10,97%	5,41%
EXTRACTO ETereo	0,94%	2,69%	1,94%	3,63%
FIBRA CRUDA	74,65%	57,42%	26,46%	11,40%
FIBRA EN DETERGENTE ACIDO	83,80%	67,40%	43,00%	13,70%
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO	88,90%	86,60%	45,00%	41,30%
FOSFORO	0,02%	0,08%	0,30%	1,02%
HUMEDAD	12,00%	11,80%	5,80%	10,20%
LIGNINA	6,20%	7,10%	8,20%	3,20%
MATERIA SECA	88,00%	88,20%	94,20%	89,80%
PROTEINAS	0,64%	3,93%	13,78%	17,74%

**Anexo 4. Relación Carbono/ Nitrógeno para los compuestos de los sustratos para la obtención de cuerpos fructíferos.**

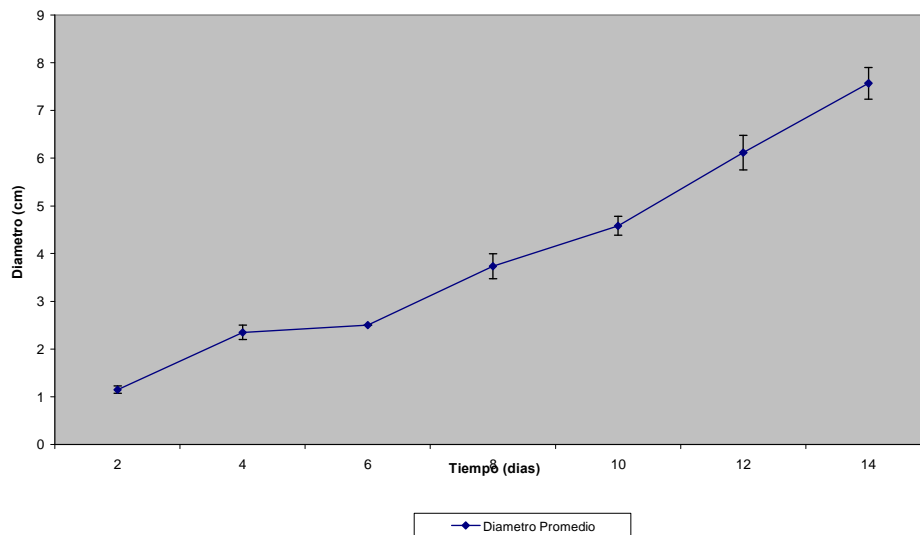
<b>CALCULOS PARA RELACION DE CARBONO NITROGENO</b>				
	<b>VIRUTA</b>	<b>ALGODÓN</b>	<b>CACAO</b>	<b>TRIGO</b>
CONTENIDO MATERIA ORGANICA	180,48%	167,72%	111,92%	79,57%
CANTIDAD DE CARBONO	104,68%	97,29%	64,92%	46,15%
CANTIDAD DE NITROGENO	0,10%	0,63%	2,20%	2,84%
C: N	1022,25	154,7159396	29,44430039	16,2606723

**Anexo 5. Graficas de Cada tratamiento del análisis del crecimiento del hongo en medio agarizado con el promedio de los diámetros de las tres replicas y su correspondiente error estándar**

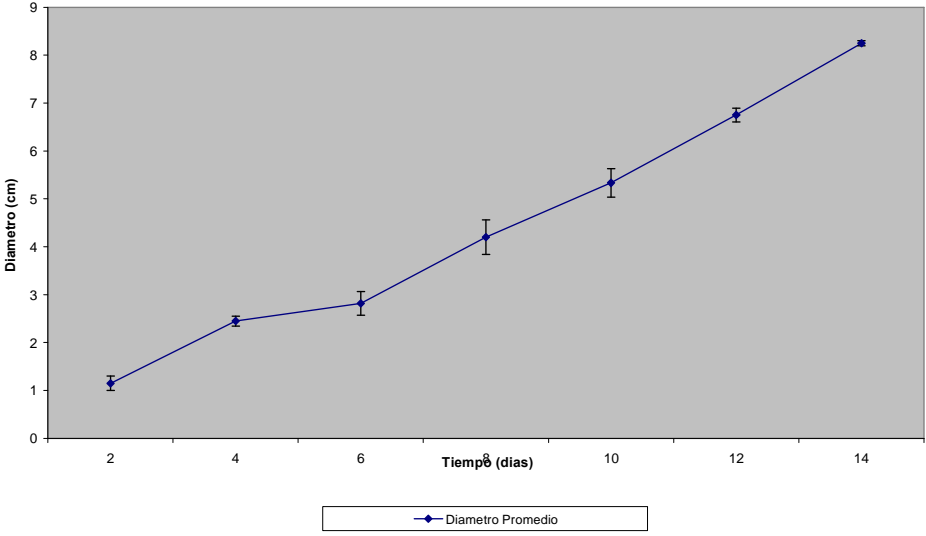
**Error estandar para el diametro promedio del tratamiento PDYA, pH 5, 0% aserrin**



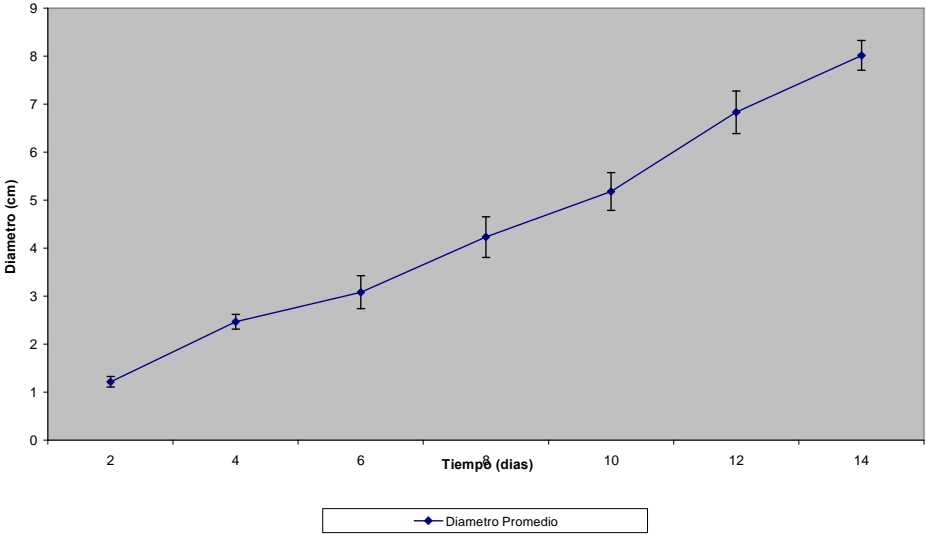
**Error estandar para el diametro promedio del tratamiento PDYA, pH 5 y 0,2% aserrin**



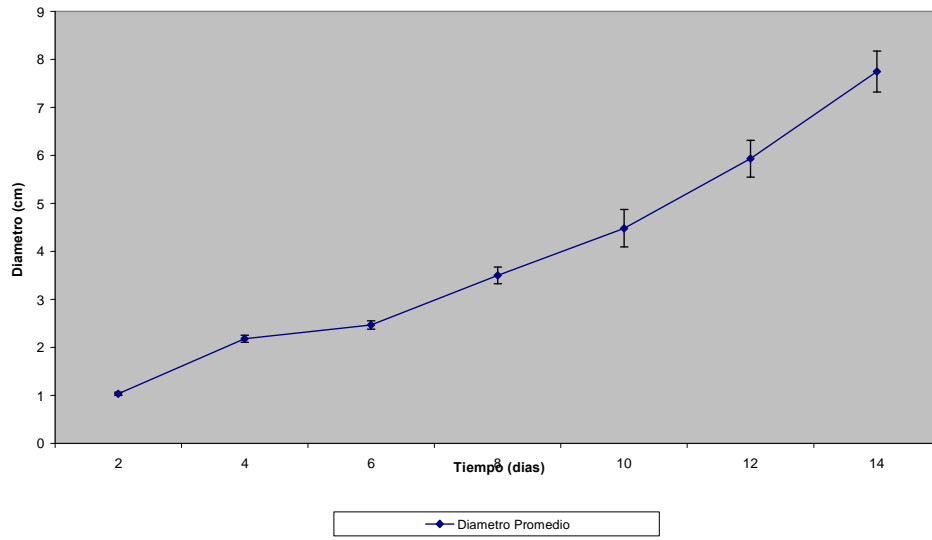
**Error estandar para el diametro promedio del tratamiento PDYA, pH 5, 0,3% aserrin**



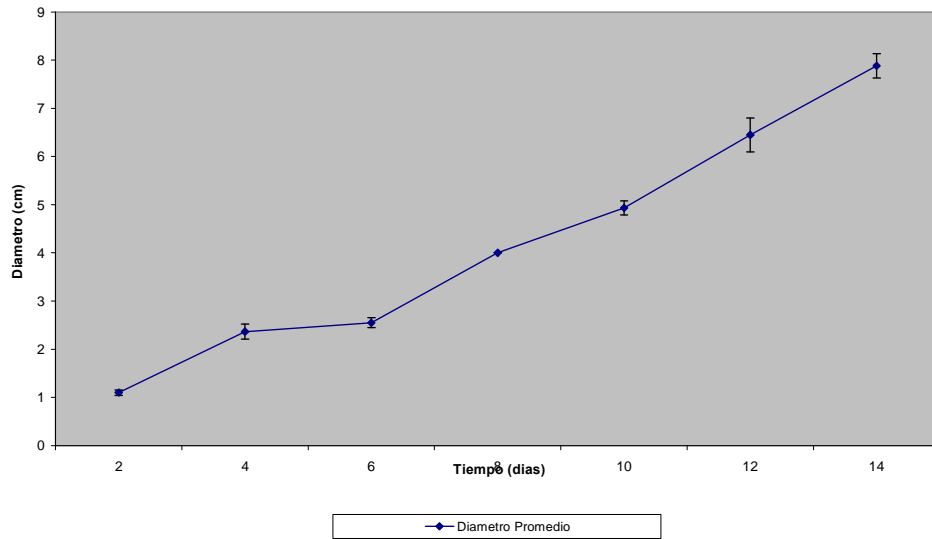
**Error estandar para el diametro promedio del tratamiento PDYA, pH 5.5, 0% aserrin**



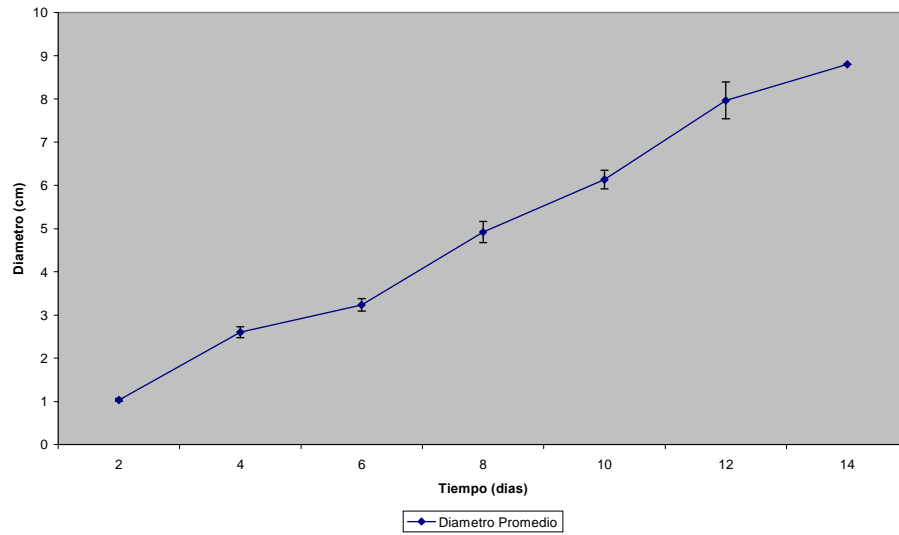
**Error estandar para el diametro promedio del tratamiento PDYA, pH 5.5,  
0,2%**



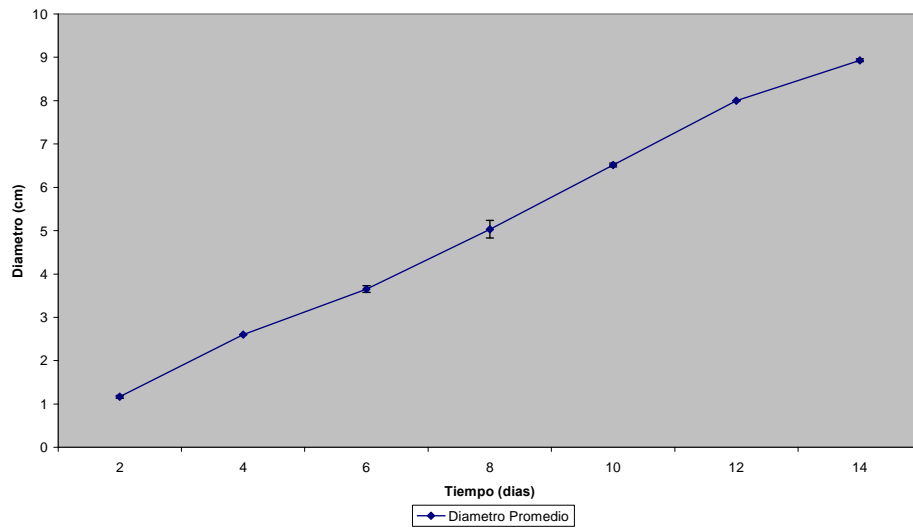
**Error estandar para el diametro promedio del tratamiento PDYA, pH  
5.5, 0,3% Aserrin**



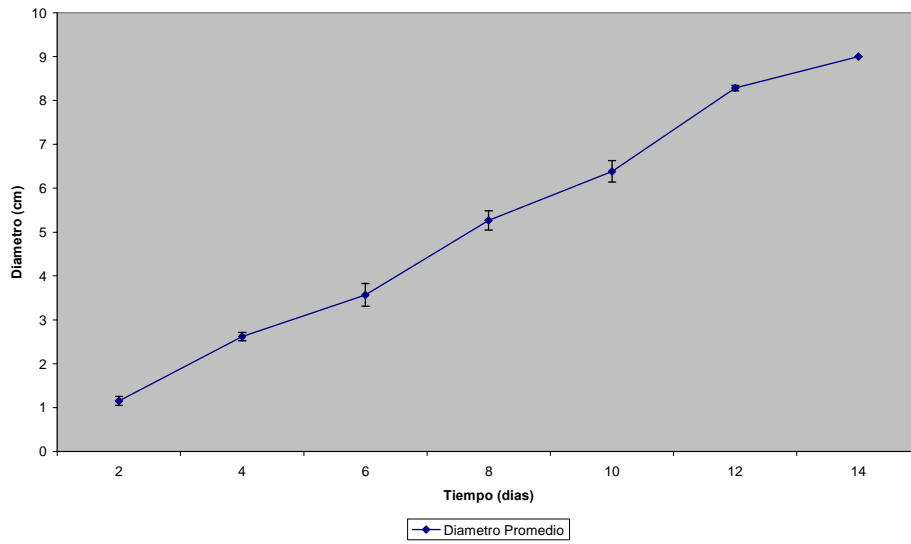
**Error estandar para el diametro promedio del tratamiento MYA, pH 5,  
0% aserrin**



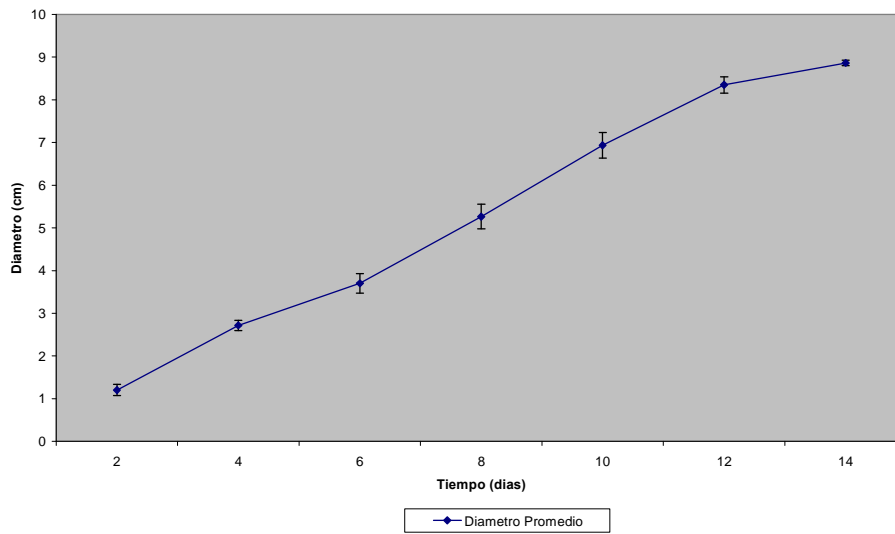
**Error estandar para el diametro promedio del tratamiento MYA, pH 5,  
0,2 % aserrin**



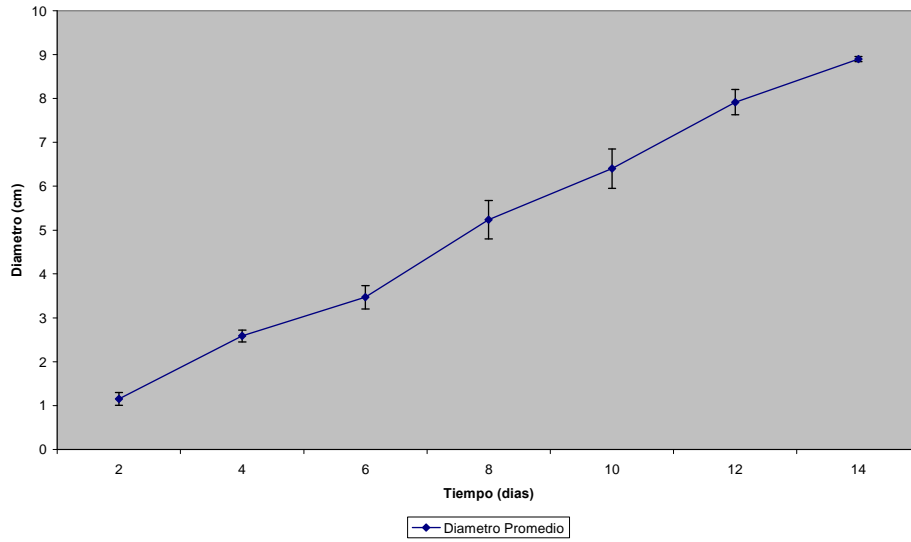
**Error estandar para el diametro promedio del tratamiento MYA, pH 5,  
0,3% aserrín**



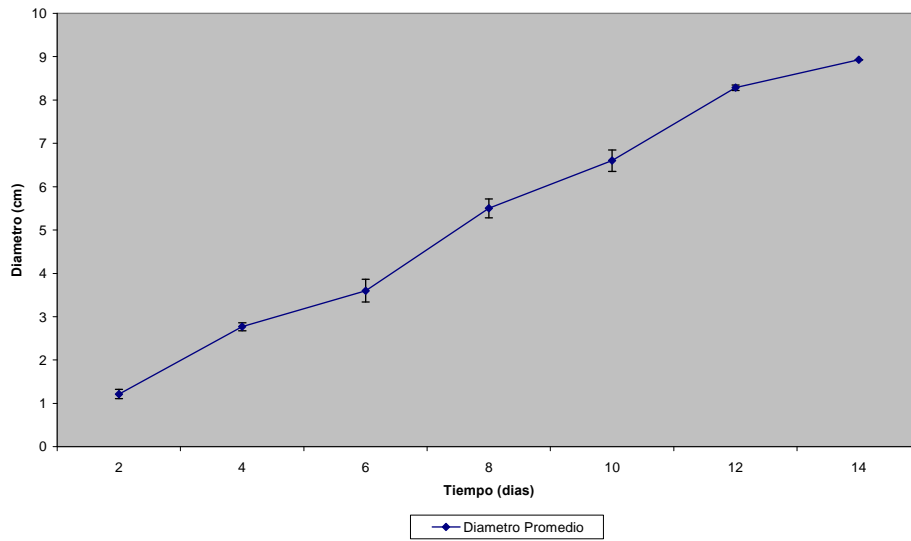
**Error estandar para el diametro promedio del tratamiento MYA, pH  
5.5, 0.2% aserrín**



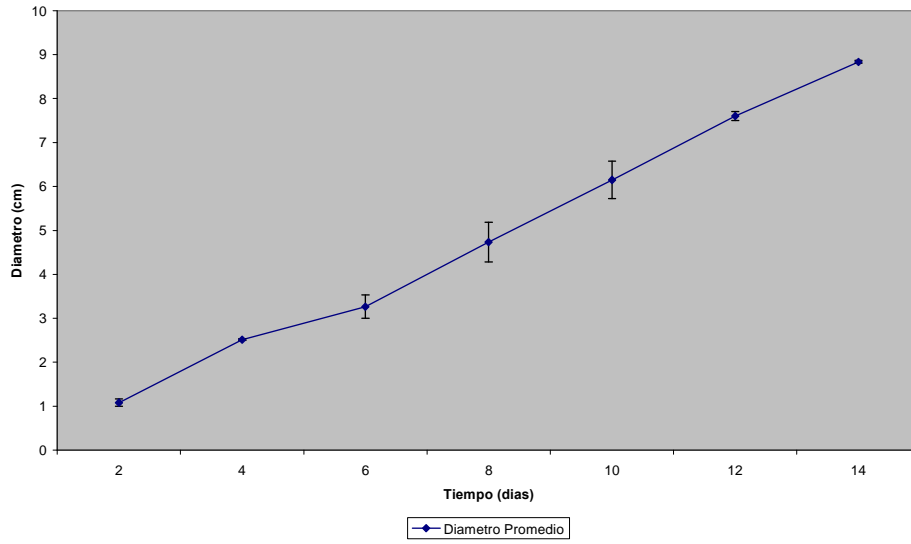
**Error estandar para el diametro promedio del tratamiento MYA, pH 5.5, 0 % aserrín**



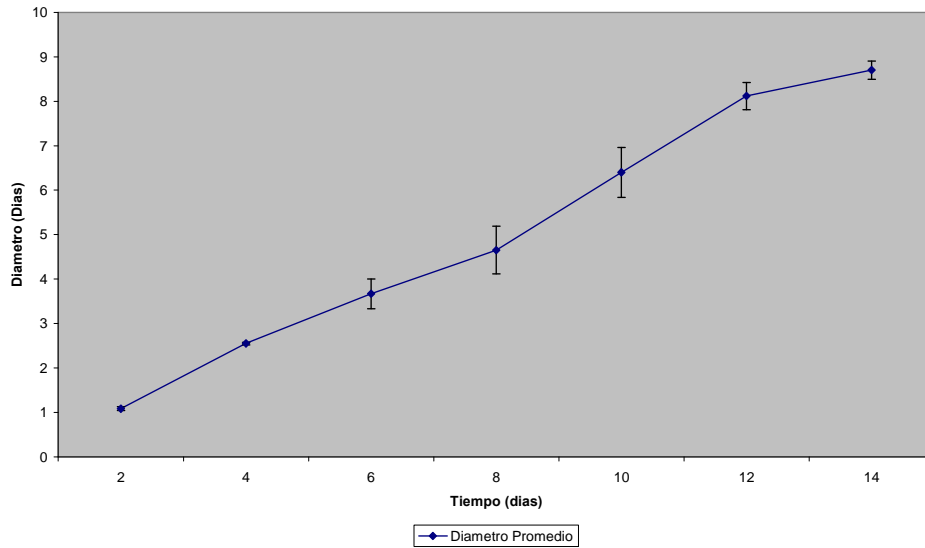
**Error estandar para el diametro promedio del tratamiento MYA, pH 5.5, 0.3% aserrín**



**Error estandar para el diametro promedio del tratamiento OMYA, pH 5.5, 0,3%**

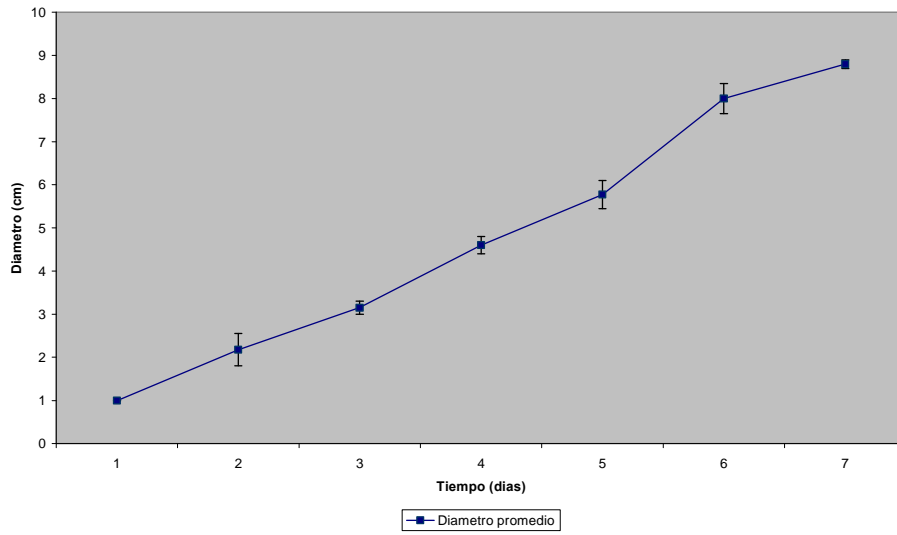


**Error estandar para el diametro promedio del tratamiento OMYA, pH 5.5, 0,2% aserrin**

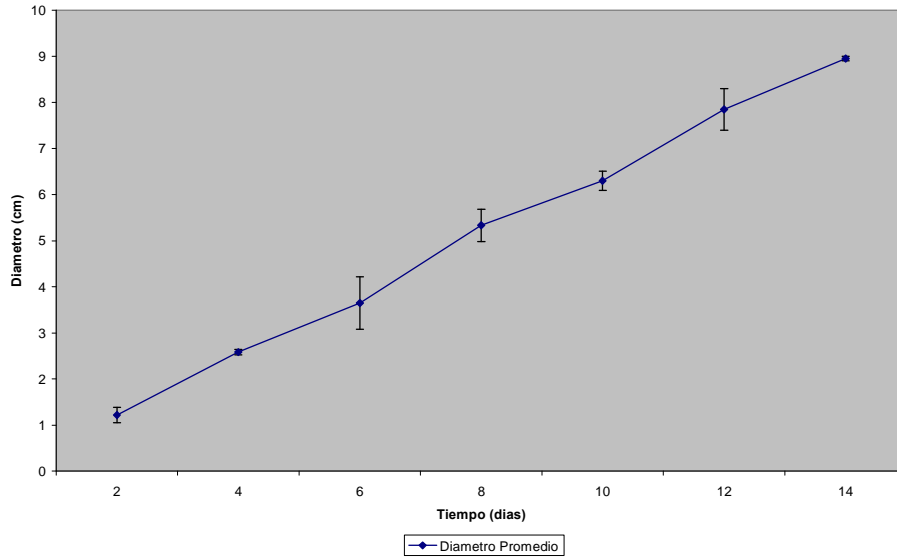




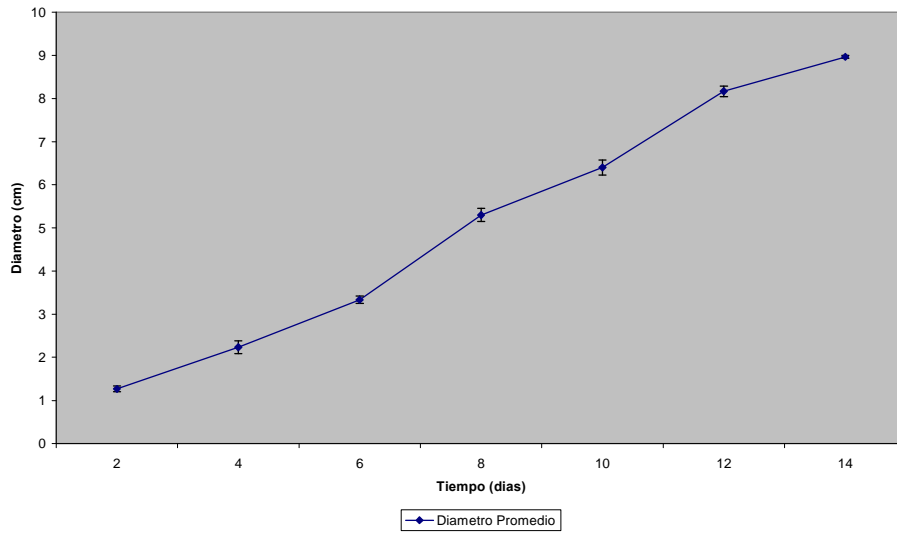
**Error estandar para el diametro promedio del tratamiento OMYA, pH 5.5, 0% aserrin**



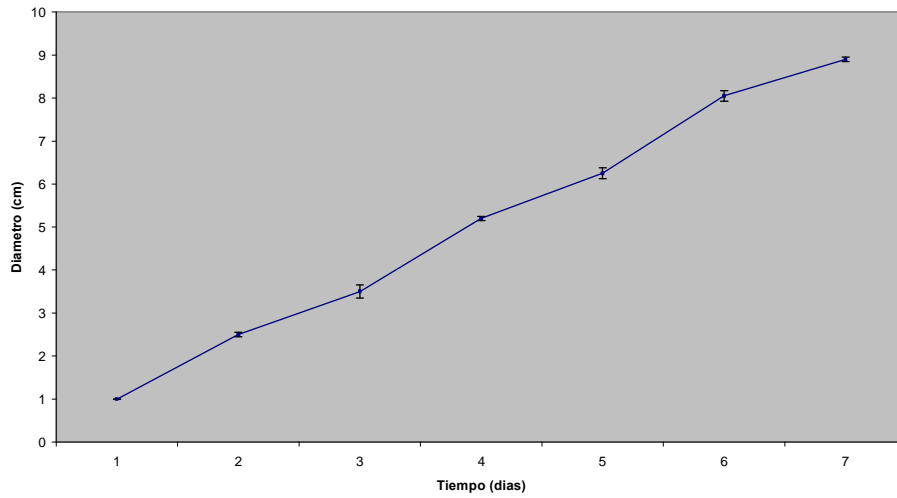
**Error estandar para el diametro promedio del tratamiento OMYA, pH 5, 0,3% aserrin**



**Error estandar para el diametro promedio del tratamiento OMYA, pH 5, 0,2% aserrín**



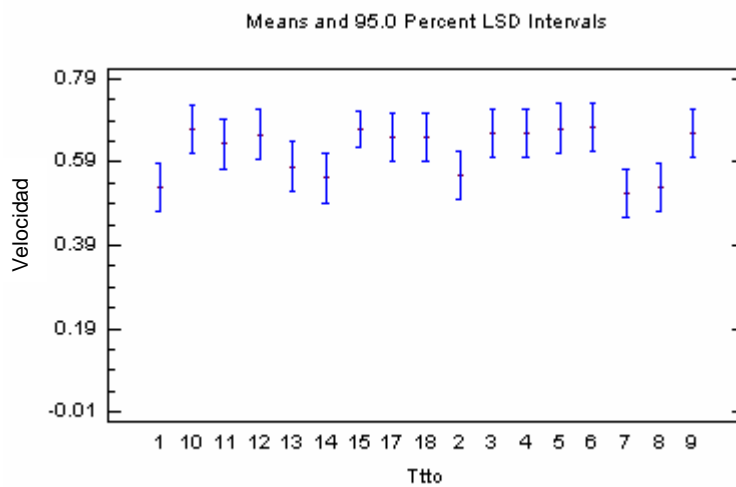
**Error estandar para el diametro promedio del tratamiento OMYA, pH 5, 0% aserrín**



**Anexo 6. Tabla ANOVA para Velocidad de crecimiento por Tratamiento**

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>
Entre grupos	0.362954	16	0.0226846	533.01	0.0336
Dentro de grupos	0.0000425595	1	0.0000425595		
Total (Corr.)	0.362996	17			

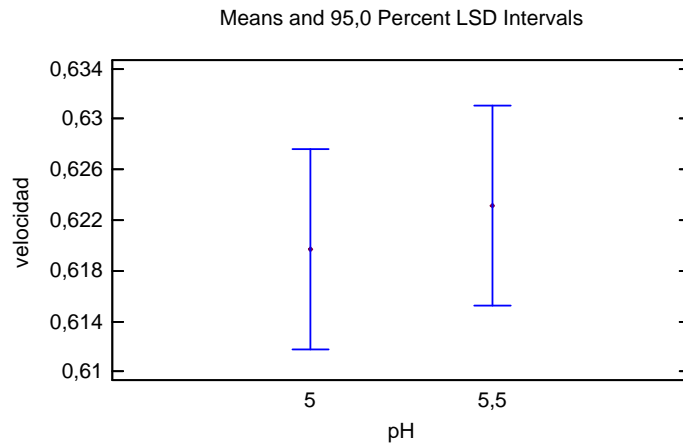
**Anexo 7. Intervalos LSD para el factor tratamiento**



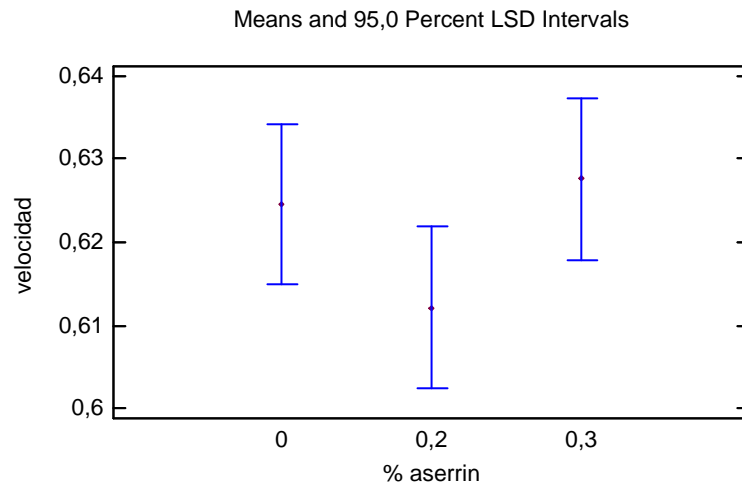
**Anexo 8. Análisis de varianza multifactorial para la velocidad de crecimiento por variaciones en el medio agarizado.**

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>
% aserrín	0,000808431	2	0,000404215	1,71	0,2229
Medio	0,0545442	2	0,0272721	115,07	0,0000
pH	5,10016E-05	1	5,10016E-05	0,22	0,651
RESIDUOS	0,0028441	12	0,000237008		
TOTAL	0,0582477	17			

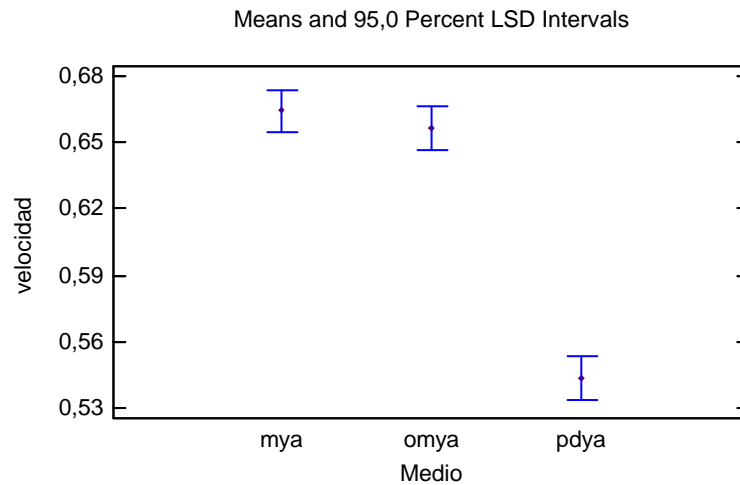
### Anexo 9. Intervalos LSD para el factor valores de pH



### Anexo 10. Intervalos LSD para el factor % de aserrín



**Anexo 11. Intervalos LSD para el factor tipo de medio**



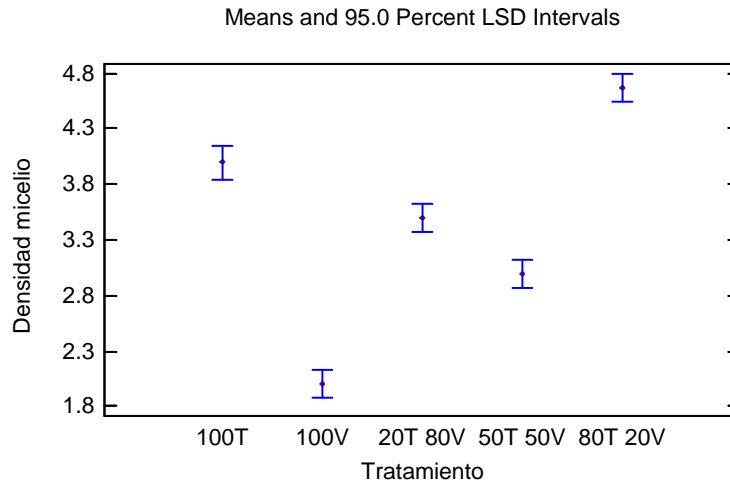
**Anexo 12. Tabla de análisis de varianza para la velocidad de crecimiento por % de aserrín y tipo de medio.**

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>
% aserrín	0,00146946	1	0,00146946	2,07	0,3869
Medio	0,000711102	1	0,000711102	1	0,5
RESIDUOS	0,000711102	1	0,000711102		
TOTAL	0,00289166	3			

**Anexo 13. Tabla ANOVA para la densidad de micelio por Tratamiento.**

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>
Entre grupos	119.226	4	298.065	160.96	0.0000
Dentro de grupos	0.166667	9	0.0185185		
Total (Corr.)	120.893	13			

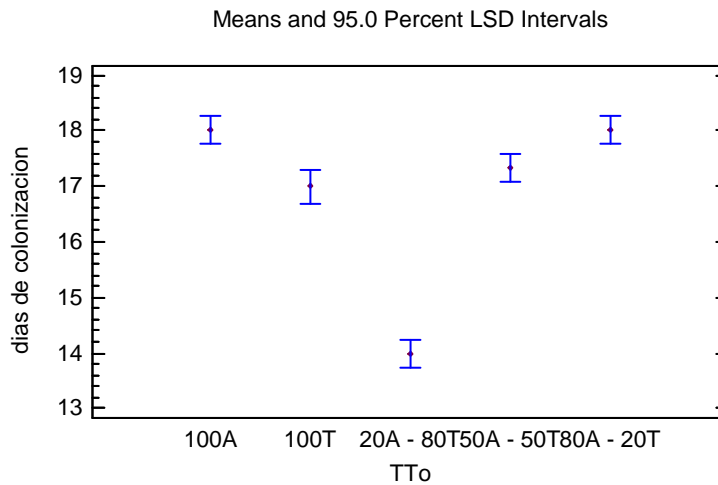
**Anexo 14. Intervalos LSD para densidad de micelio por tratamiento**



**Anexo 15. Tabla ANOVA para días de colonización por Tratamiento**

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>
Entre grupos	129.6	4	32.4	27.00	0.0000
Dentro de grupos	12.0	10	1.2		
Total (Corr.)	141.6	14			

## Anexo 16. Intervalos LSD para días de colonización por tratamiento



## Anexo 17. Tabla ANOVA para días de colonización del bloque por Tipo de formulación

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Valor P
Entre grupos	51535,4	54	954,359	10,61	0
Dentro de grupos	19796,4	220	89,9836		
Total (Corr.)	71331,8	274			

## Anexo 18. Comparación entre modelos de regresión para el residuo del cacao, el residuo del algodón, la viruta y el cacao con respecto a los días de colonización del bloque.

MODELO	CACAO		ALGODÓN		VIRUTA		TRIGO	
	Correlación	R-cuadrado	Correlat	R-Squared	Correlat	R-Squared	Correlat	R-Squared
Cuadrado-Y								
Raíz cuadrada-X	0,4931	24,31%	0,0706	0,50%	-0,4654	21,66%	0,2373	5,63%
Raíz cuadrada-X	0,4884	23,86%	0,0927	0,86%	-0,4708	22,17%	0,2208	4,88%
Raíz cuadrada doble	0,4825	23,28%	0,1074	1,15%	-0,4716	22,24%	0,2074	4,30%
Logaritmica-Y								
Raíz cuadrada-X	0,4724	22,32%	0,1244	1,55%	-0,4693	22,03%	0,1896	3,59%

Cuadrado-Y	0,4475	20,03%	0,0257	0,07%	-0,5712	32,63%	0,2342	5,48%
Lineal	0,4402	19,38%	0,0495	0,24%	-0,5814	33,81%	0,2163	4,68%
Raíz cuadrada-Y	0,433	18,75%	0,0651	0,42%	-0,5848	34,20%	0,202	4,08%
Exponencial	0,422	17,81%	0,0831	0,69%	-0,5848	34,20%	0,1833	3,36%
Reciproca-Y	-0,3842	14,76%	-0,1217	1,48%	0,5663	32,07%	-0,132	1,74%
Doble cuadrado	0,3474	12,07%	-0,0327	0,11%	-0,6347	40,28%	0,2211	4,89%
cuadrado-X	0,3382	11,44%	-0,0089	0,01%	-0,6512	42,41%	0,2011	4,04%
Raíz cuadrada-Y cuadrada-X	0,3305	10,92%	0,0067	0,00%	-0,6583	43,34%	0,1856	3,45%
Logarítmica-Y cuadrada-X	0,3196	10,21%	0,0245	0,06%	-0,6622	43,86%	0,1655	2,74%
Reciproca-Y cuadrada-X	-0,286	8,18%	-0,0631	0,40%	0,65	42,25%	-0,1117	1,25%
Reciproca-Y raíz cuadrada-X	<no fit>		-0,1603	2,57%	0,4493	20,19%	-0,1403	1,97%

#### Anexo 19. Coeficientes para la regresión de días colonización bloque vs la cascarilla de cacao

<i>Parámetro</i>	<i>Estimado por mínimos cuadrados</i>	<i>Error estándar</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Valor p</i>
Intercepto	3347,71	136,887	24,456	0
Pendiente	1157,15	123,564	9,36477	0

#### Anexo 20. Análisis de varianza para la cascarilla de cacao

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>
Modelo	1,87E+08	1	1,87E+08	87,7	0.0000
Residuo	5,83E+08	273	2,14E+06		
Total (Corr.)	7,71E+08	274			

#### Anexo 21. Coeficientes para la regresión de días colonización bloque vs la motosa de algodón

<i>Parámetro</i>	<i>Estimado por mínimos cuadrados</i>	<i>Error estándar</i>	<i>estadístico</i>	<i>Valor p</i>
Intercepto	0,0194177	0,0008167	23,777	0
Pendiente	-0,00197768	0,0007372	-2,68279	0,0077



**Anexo 22. Análisis de varianza para la motosa de algodón.**

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>
Modelo	0,000547423	1	0,000547423	7,2	0,0077
Residuo	0,0207641	273	7,60589E-05		
Total (Corr.)	0,0213115	274			

**Anexo 23. Coeficientes para la regresión de días colonización bloque vs viruta de roble**

<i>Parámetro</i>	<i>Estimado por mínimos cuadrados</i>	<i>Error estándar</i>	<i>estadístico</i>	<i>Valor p</i>
Intercepto	4,30062	0,028765	149,509	0
Pendiente	-0,228015	0,0259653	-8,7815	0

**Anexo 24. Análisis de varianza para la viruta de roble.**

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>
Modelo	7,27671	1	7,27671	77,11	0
Residuo	25,7608	273	0,0943621		
Total (Corr.)	33,0376	274			

**Anexo 25. Coeficientes para la regresión de los días colonización bloque vs trigo.**

<i>Parámetro</i>	<i>Estimado por mínimos cuadrados</i>	<i>Error estándar</i>	<i>estadístico</i>	<i>Valor p</i>
Intercepto	3682,46	187,866	19,6016	0
Pendiente	909,422	225,275	4,03694	0,0001

**Anexo 26. Análisis de varianza para el trigo.**

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>
Modelo	4,34E+07	1	4,34E+07	16,3	0,0001
Residuo	7,27E+08	273	2,66E+06		
Total (Corr.)	7,71E+08	274			

**Anexo 27. Análisis de regresión múltiple para los días de colonización del bloque por Viruta de roble, motosa de algodón, cascarilla de cacao y salvado de trigo**

<i>Parámetro</i>	<i>Estimado por mínimos cuadrados</i>	<i>Error estándar</i>	<i>estadístico</i>	<i>Valor p</i>
Constante	100,853	35,0723	2,87558	0,0044
Viruta de roble	-14,4867	7,85071	-1,84527	0,0661
Motosa de algodón	-8,82214	7,85071	-1,12374	0,2621
Cascarilla de cação	-5,31337	7,85071	-0,67682	0,4991
Salvado de trigo	-2,78519	9,05252	-0,30767	0,7586

**Anexo 28. Matriz de correlación para la viruta de roble, motosa de algodón, cascarilla de cacao y salvado de trigo**

-----

	CONSTANT	Viruta	Algodón	Cação	Trigo
CONSTANT	1,0000	-0,9978	-0,9978	-0,9978	-0,9873
Viruta	-0,9978	1,0000	0,9958	0,9958	0,9801
Algodón	-0,9978	0,9958	1,0000	0,9958	0,9801
Cacao	-0,9978	0,9958	0,9958	1,0000	0,9801
Trigo	-0,9873	0,9801	0,9801	0,9801	1,0000

-----

**Anexo 29. Tabla de análisis de regresión múltiple para los días de colonización del bloque, Viruta de roble, motosa de algodón y cascarilla cacao**

<i>Parámetro</i>	<i>Estimado por mínimos cuadrados</i>	<i>Error estándar</i>	<i>estadístico</i>	<i>Valor p</i>
Constante	90,2	5,56873	16,1976	0
Viruta de roble	-12,1193	1,55499	-7,79382	0
Motosa de algodón	-6,45474	1,55499	-4,1509	0
Cascarilla de cacao	-2,94596	1,55499	-1,89452	0,0592

**Anexo 30. Matriz de correlación viruta de roble, motosa de algodón y cascarilla cacao**

---

	CONSTANT	Viruta	Algodón	Cacao
CONSTANT	1,0000	-0,9550	-0,9550	-0,9550
Viruta	-0,9550	1,0000	0,8933	0,8933
Algodón	-0,9550	0,8933	1,0000	0,8933
Cacao	-0,9550	0,8933	0,8933	1,0000

---

**Anexo 31. Análisis de regresión múltiple para los días de colonización del bloque, Viruta y motosa de algodón.**

<i>Parámetro</i>	<i>Estimado por mínimos cuadrados</i>	<i>Error estándar</i>	<i>estadístico</i>	<i>Valor p</i>
Constante	80,1248	1,6598	48,2739	0
Viruta de roble	-9,48757	0,702122	-13,5127	0
Motosa de algodón	-3,82301	0,702122	-5,44494	0

**Anexo 32. Matriz de correlación viruta y motosa de algodón.**

---

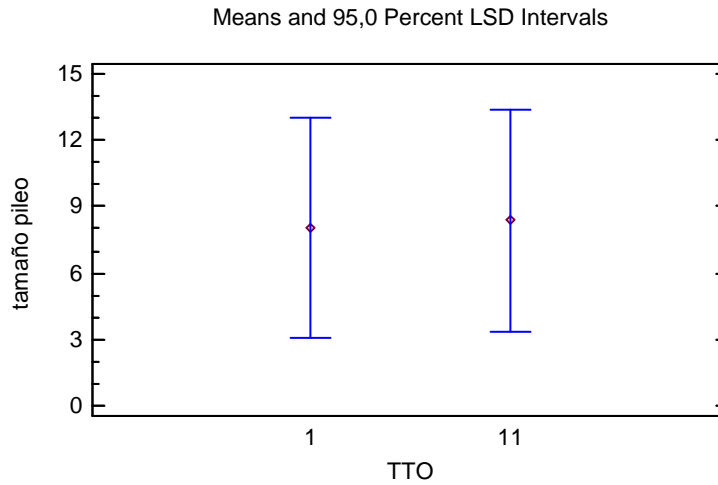
	CONSTANT	Viruta	Algodón
CONSTANT	1,0000	-0,7641	-0,7641
Viruta	-0,7641	1,0000	0,4718
Algodón	-0,7641	0,4718	1,0000

---

**Anexo 33. Tabla ANOVA para el tamaño del píleo por tratamiento aplicado.**

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>
Entre grupos	0,109727	1	0,109727	0,02	0,899
Dentro de grupos	10,6488	2	5,32441		
Total (Corr.)	10,7586	3			

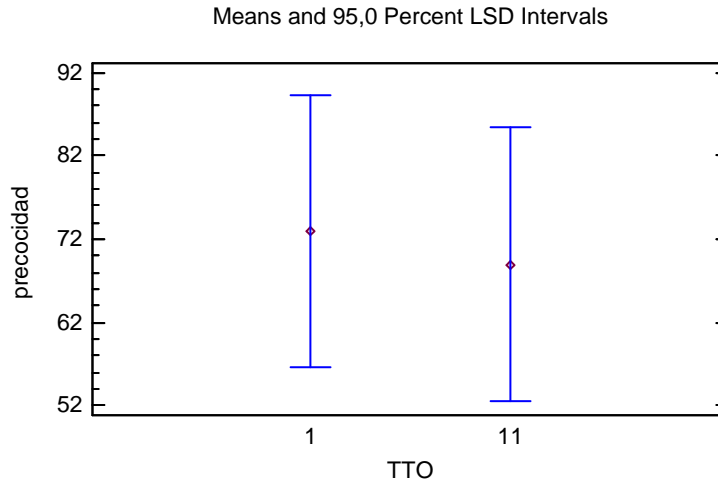
**Anexo 34. Intervalos LSD para el tamaño del pileo por tratamiento.**



**Anexo 35. Tabla ANOVA para precocidad de colonización por Tratamiento aplicado**

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>
Entre grupos	16	1	16	0,28	0,6518
Dentro de grupos	116	2	58		
Total (Corr.)	132	3			

**Anexo 36. Intervalos LSD para precocidad de colonización por Tratamiento aplicado**

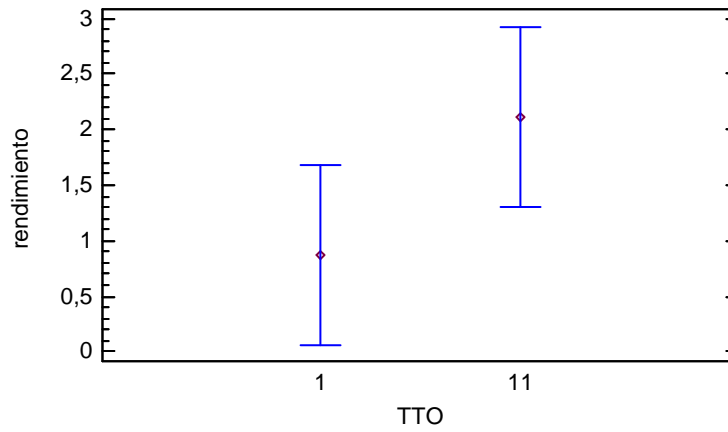


**Anexo 37. Tabla ANOVA para rendimiento y tratamiento aplicado**

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>
Entre grupos	1,53723	1	1,53723	10,9	0,0808
Dentro de grupos	0,282097	2	0,141049		
Total (Corr.)	1,81932	3			

**Anexo 38. Intervalos LSD para rendimiento por tratamiento aplicado**

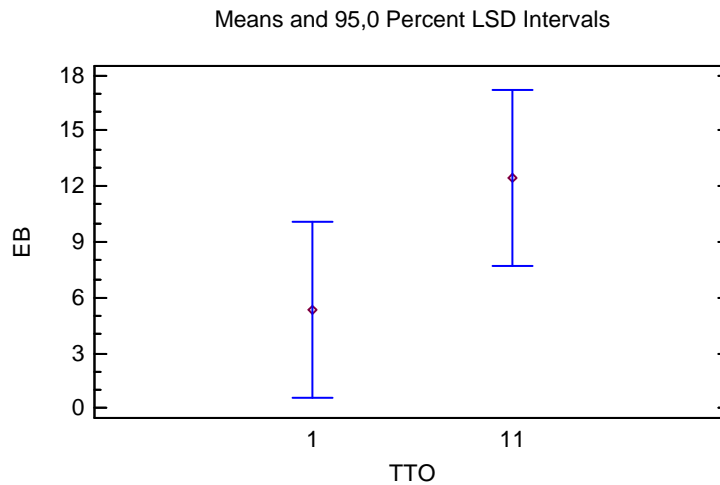
Means and 95,0 Percent LSD Intervals



**Anexo 39. Tabla ANOVA para Eficiencia biológica y Tratamiento aplicado**

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media de cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>
Entre grupos	51,0911	1	51,0911	10,33	0,0847
Dentro de grupos	9,88967	2	4,94484		
Total (Corr.)	60,9808	3			

#### Anexo 40. Intervalos LSD para Eficiencia biológica y Tratamiento aplicado



#### Anexo 41. Diseño de un cuarto de fructificación.

Para garantizar las condiciones adecuadas del crecimiento del hongo *Lentinula edodes* se propone un diseño de un cuarto de cultivo con las siguientes consideraciones:

**Forma:** La forma general de un cuarto de cultivo debe ser rectangular y por los menos dos veces tan largo como su ancho, esto con el fin de permitir que el aire se distribuya por todo el cuarto y fluya a través de los sustratos y de los hongos frescos. (Stamets, 2000)

**Paredes interiores:** El interior del cuarto debe construirse con materiales como fibra de vidrio, policarbonato, acrílico, vidrio y metales galvanizados, que son resistentes al agua y al hongo. El material utilizado por muchos cultivadores es una mezcla de fibra de vidrio reforzada con plástico (FRP). Las ventajas de utilizar el FRP es que es de fácil instalación, no se degrada con el hongo, no genera gases tóxicos y es tolerante a la mayoría de agentes desinfectantes.

Si se quiere usar madera ó superficies metálicas se debe usar una pintura resistente al hongo y al óxido. (Stamets, 2000)

Para aquellos cultivadores que tengan un presupuesto limitado se recomienda usar plásticos de polietileno, que es un material económico. La vida útil de este material, bajo condiciones de cultivo de hongos, es usualmente de 2 a 3 años. (Stamets, 2000)

**Puertas:** Para proteger al cuarto de cultivo del exterior se debería tener por lo menos dos puertas. La primera puerta de afuera que conduzca a un corredor, al final de este la segunda puerta, conducirá el cuarto de cultivo. Las dimensiones de las puertas deberían ser por lo menos de 1.22 x 2.44 m, aunque algunos cultivadores utilizan puertas un poco más grandes, la cuales permiten ocupar ó desocupar el cuarto fácilmente. Algunas veces los cultivadores utilizan una puerta pequeña interna entre las dos puertas para que el ambiente del cuarto de cultivo no se exponga a contaminaciones cuando una persona entra. La puerta debe estar hecha de un material que no soporte el crecimiento de hongos. La parte inferior de la puerta debería tener una malla que no permita la entrada de insectos.

Al final del cuarto de cultivo debe ser instalada una puerta de salida, puede ser del mismo tamaño de las dos puertas anteriores. Esta puerta facilita el desalojo de los hongos del cuarto después de la cosecha. (Stamets, 2000)

**Techo interior:** El techo del interior del cuarto debería ser curvo ó en pico para la redistribución del calor. Además, la inclinación del techo podría ser angulosa de modo que la condensación se adhiera a la superficie inclinada del techo y sea llevada a las paredes, y finalmente caiga sobre el piso. Esto permite que la re-evaporación del piso retorne nuevamente al aire. La altura del cuarto debe ser por lo menos de 3.05 m, pero se prefiere que sea entre 3.66 m y 4.88 m. El espacio libre de aire debe ser de por lo menos de 1.22 a 1.83 m por encima del piso más alto de la estantería con sustratos.

Techos planos promueven la condensación, y un microclima para la contaminación. Si el cultivador cuenta con un techo de esta característica, se recomienda instalar debajo de la unión de la pared y el techo una tubería de desagüe con un diámetro entre 0.15 m y 0.3



m, perforada cada 0.6 m con agujeros de 0.025 m de diámetro. Instalando una “T” y localizando un ventilador en la base de esta, se puede sacar el aire por los agujeros. Este esquema eliminará las bolsas de aire que se forman a lo largo de la esquina de la pared y el techo. (Stamets, 2000)

**Pisos:** Los pisos pueden ser de cemento, pintados con productos aprobados por departamento de agricultura. Debe tener canales como drenajes pero no se necesita que sean más anchos de 1.83 m. Antes de la entrada al drenaje, una cesta protectora a manera de malla de metal previene la entrada de impurezas. Esta malla debe ser fácilmente removible para su limpieza diaria. Dos veces a la semana se debe hacer una limpieza profunda utilizando detergentes para limpiar los residuos que quedan en el drenaje.

Muchos cultivadores instalan un lava pies antes de entrar al cuarto de cultivo para desinfectar los zapatos; ya que estos son considerados un vector importante de contaminación. Estos lava pies son construidos dentro de la estructura de cemento antes de verterlo para poder instalar un drenaje. El tamaño ideal del lava pies es de 0.6 m x 0.9 m y 0.051m. El lava pies debe ser llenado con agua y se añade cloro para desinfectar. Un plástico, metal ó esponja ayuda a remover los residuos de los pies. (Stamets, 2000)

**Tasa de intercambio de aire:** los intercambios de aire controlan la disponibilidad de oxígeno fresco y la pureza del dióxido de carbono que respira el micelio del hongo. (Stamets, 2000) En el cuarto deben instalarse dos ventiladores para controlar la entrada y salida de aire fresco y evitar la contaminación con *Trichoderma*, pero hay que considerar que altas tasas de intercambio de aire pueden afectar adversamente la humedad, especialmente antes de la formación del primordio cuando abunda el micelio aéreo. Para prevenir la mal formación del cuerpo fructífero, la aparición de bacterias y la infección del hongo, el movimiento del aire es un factor substancial para evitar vectores de contaminación. (Stamets, 2000)

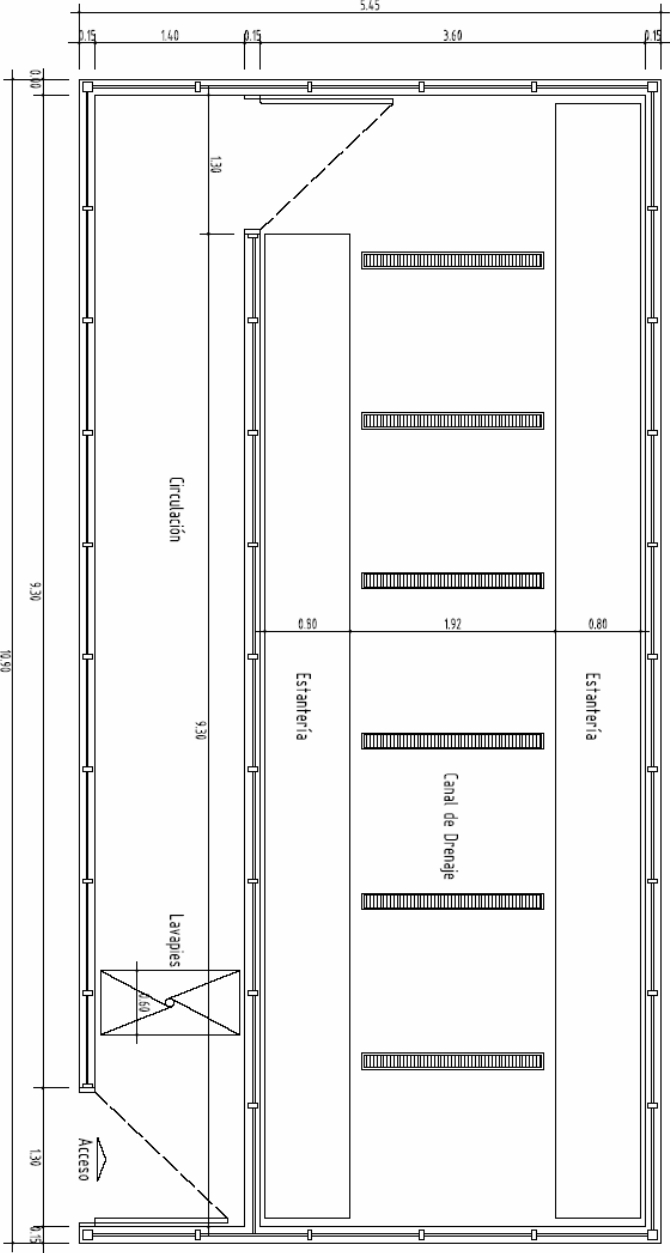
**Estanterías:** Las estanterías forman la plataforma sobre la cual se colocan los sustratos en los cuales se cultivó el hongo. La estructura de la estantería (marco) consiste en 4 postes verticales con bandejas horizontales que forman varios niveles. Este marco fijo se puede construir de madera tratada con preservativos ó de metal tubular anticorrosivo, siendo este último un material ampliamente utilizado por la facilidad de su manejo y limpieza.

Para una cantidad de 40 bloques de  $2 \pm 0.5$  Kg. por estantería, se recomienda una estantería de 4 niveles, donde las bandejas tengan perforaciones pequeñas de  $0.020 \pm 0.005$  m para evitar acumulación de agua y posible contaminación. Cada nivel de 1.90 m x 0.8 m, el espacio entre niveles debe ser amplio aproximadamente de 0.35 m para que no sólo sea fácil el acceso y el retiro de los sustratos sino también la limpieza.

**Control de la humedad:** Se debe instalar un hidrómetro que permita verificar que la humedad se encuentre entre 60 y 80 %, que es la adecuada para el desarrollo del cuerpo fructífero y la cosecha. Si el cultivo se realiza en un clima frío se podría disponer una ventana que este abierta una hora en la mañana y otra hora finalizando la tarde, aunque es recomendable que la ventana este cubierta por una malla que no permita la entrada de insectos. La aspersion de agua es conveniente para aumentar la humedad relativa del cuarto de fructificación. Se recomienda dos veces al día por 30 minutos. Si las condiciones climáticas no favorecen las condiciones de humedad se debe instalar un humidificador.

# PLANO DE LA PLANTA GENERAL

Planta General



SECCION TRANSVERSAL DEL CUARTO DE FRUCTIFICACION.

Sección Transversal

