

# Caracterización de la biomasa de piña (*Ananas comosus*) y su valoración en la propagación micelial del hongo shiitake (*Lentinula edodes*)

## Physicochemical characterization of the biomass of the pineapple stubble (*Ananas comosus*) and its assessment as a substrate for the mycelial propagation of shiitake (*Lentinula edodes*) mushroom

Maynor Alberto Vargas-Vargas\*, Rodolfo Antonio Hernández-Chaverri\*\*, Arlette Jiménez-Silva\*\*\*

\* Laboratorio de Investigación en Química y Biociencias Aplicadas, Vicerrectoría de Investigación y Transferencia, Universidad Técnica Nacional, UTN, Costa Rica, mvargas@utn.ac.cr

\*\* Cátedra de Ciencias Químicas para Ingenierías, Unidad de Investigaciones Bioenergéticas y Ambientales, Universidad Estatal a Distancia, UNED, Costa Rica, rohernandez@uned.ac.cr

\*\*\* Programa Laboratorista Químico para el Aseguramiento de la Calidad, Centro de Calidad y Productividad, Vicerrectoría de Extensión y Acción Social, Universidad Técnica Nacional, UTN, Costa Rica, ajimenez@utn.ac.cr

### Cómo citar / How to cite

Vargas, M., Hernández, R. y Jiménez, A. (2019). Caracterización fisicoquímica de la biomasa del rastrojo de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) y su valoración preliminar como sustrato en la propagación micelial del hongo shiitake (*Lentinula edodes* (Berk) Pegler)". *Yulök Revista de Innovación Académica*. 3(1), 13-27.

### Resumen

Se caracterizaron fisicoquímicamente los residuos de biomasa lignocelulósica de la producción piñera de la Región Huetar Norte y se evaluó su potencial como medio de cultivo para la etapa de crecimiento micelial del hongo shiitake (*Lentinula edodes*). La materia seca, según parte de la planta, varió entre 11,4 y 28,2 % y la ceniza, en base seca, entre 2,96 y 6,44%. La proporción hidrosoluble fue de 53,7%; los extractos mostraron un pH de  $4,05 \pm 0,42$  y una acidez de 3,48%, expresada como ácido láctico. El contenido de azúcares reductores fue de  $6,6 \pm 1,3$  % en la biomasa foliar, aunque menor en el sistema radical. Asimismo, se determinó cobalto, cobre, níquel, zinc, magnesio, potasio, fósforo y calcio, nutrientes esenciales para el desarrollo fúngico y se aislaron nueve pigmentos vegetales por extracción con acetona, los cuales fueron caracterizados por espectrofotometría visible. La hidrólisis ácida condujo a una producción máxima de aminoácidos libres a pH 3 y 20° C, mientras que la generación de aldehídos fue poco significativa según estas condiciones, por lo que no se esperan efectos antagonistas al crecimiento micelial. Ensayos microbiológicos preliminares demostraron una notable capacidad de los extractos para soportar el crecimiento micelial *in vitro* del hongo shiitake.

**Palabras clave:** biomasa lignocelulósica, rastrojo de piña, hidrólisis química, hongo shiitake, crecimiento micelial

### Abstract

The lignocellulosic biomass residues generated in the pineapple cultivation of the Northern Huetar Region were physico-chemically characterized in order to evaluate its potential as a culture medium for the mycelial growth of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*). Dry matter contents varied between 11.4 and 28.2% and ash content between 2.96 and 6.44%, on a dry basis. The proportion of water-soluble material was 53.7% and extracts showed a pH of  $4.05 \pm 0.42$ , for an acidity of 3.48% expressed as lactic acid. The content of reducing sugars was  $6.6 \pm 1.3$ % for the leaf biomass, although much lower in the root system. Cobalt, copper, nickel, zinc, magnesium, potassium, phosphorus and calcium were also determined. In total, nine plant pigments were isolated by extraction with acetone and characterized by visible spectrophotometry. Acid hydrolysis led to a maximum production of free amino acids at pH 3 and 20°C, while the generation of aldehydes under those conditions was little significant; hence, no antagonistic effects are expected for the mycelial growth under the extraction conditions. Preliminary microbiological assays showed a remarkable ability of the extracts to support the mycelial growth *in vitro* of shiitake mushroom.

**Keywords:** lignocellulosic biomass, pineapple stubble, chemical hydrolysis, shiitake mushroom, mycelial growth

## Introducción

La Cámara Nacional de Productores y Exportadores de Piña (CANAPEP, 2019) estima que hay alrededor de 45.000 ha de cultivo de piña en Costa Rica y que por cada hectárea de piña sembrada se recogen unas 300 toneladas de rastrojo húmedo (García, 2013). Hernández-Chaverri y Prado-Barragán (2018) indican que la tasa de recambio es del 40% del área cultivada anualmente, por lo que se calcula su disponibilidad en cinco millones de toneladas métricas de rastrojo al año, aproximadamente. En muchas ocasiones, el principal manejo que se da a los desechos consiste en rociarlos con herbicida, principalmente, paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo), para luego proceder a quemarlos, acción que provoca la liberación de sustancias volátiles y tóxicas que, eventualmente, acaban contaminando el aire, el agua y los suelos de la zona (Solórzano *et al.*, 2013). En algunos casos, se aplica el manejo en verde que consiste en la molienda del rastrojo con tractor y su incorporación al suelo sin el uso de herbicidas; sin embargo, esto aumenta, significativamente, los costos de operación en campo (Hernández-Chaverri y Prado-Barragán, 2018). González (2012) señala que al dejar descomponer el rastrojo de piña al aire libre se tiene como consecuencia la proliferación de moscas de la especie *Stomoxys calcitrans*, lo cual incide en la sanidad de los hatos bovinos vecinos y, por ende, de la salud pública de las zonas productoras.

A pesar de que Costa Rica se perfila como el primer exportador a nivel mundial de piña (Garita, 2014 y De Pablo, Tassile y Giacinti, 2017) se requiere más investigación relacionada con el aprovechamiento de las biomoléculas presentes o derivables a partir de sus desechos. Algunas iniciativas como la obtención de la nanocelulosa (Corrales *et al.*, 2018) y la extracción y purificación de la bromelina (Alpizar, Villegas, Madrigal y Sibaja, 2013) han sido reportados por parte del Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC) y del Centro de Innovaciones Biotecnológicas (CeniBiot) del Centro Nacional de Alta Tecnología (CENAT), pero se requiere profundizar en aspectos financieros y económicos tales como el cálculo de la rentabilidad del escalamiento e industrialización y el acceso a los mercados potenciales.

La extracción directa, la hidrólisis química o enzimática y la pirólisis controlada del rastrojo de piña podrían conducir al aislamiento y producción de nuevas sustancias químicas con aplicaciones importantes aún no contempladas (Clark y Deswarte, 2015). Para tal efecto es indispensable la caracterización fisicoquímica de los desechos obtenidos en cada una de las etapas de su cultivo y de su transformación agroindustrial.

Aunque la tendencia mundial se ha centrado en el uso de las biomasas como combustibles primarios, lo cual pasa a la elaboración de biocombustibles de segunda generación. En la actualidad, se empieza a abordar el tema de las biorrefinerías como un concepto en que se logra convertir las biomasas residuales en una amplia variedad de productos químicos derivados, biomateriales y energía, para maximizar su valor y minimizar el residuo. Para el año 2030, se espera que del 30% al 50% de la producción de sustancias químicas en Europa esté basada en el aprovechamiento de biomasas y que el 25% de las necesidades de energía para el transporte y el 30% del calor y la generación de potencia sean provistas por biocombustibles (Star-Colibri Project, 2011).

Por otra parte, la demanda de hongos comestibles ha ido en aumento en el país en términos cuantitativos, aunque se continúa asociando, exclusivamente, con el consumo del champiñón común (*Agaricus campestris*). En los últimos años se han desarrollado en algunas localidades del país emprendimientos relacionados con el cultivo del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*), del cual el Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica (CIA-UCR) y la Universidad Técnica Nacional (UTN) en la Sede de San Carlos han sido destacados promotores de su cultivo a través de la realización de talleres y capacitaciones (Coto, 2016). Sin embargo, existe en Oriente una mayor variedad de especies de alto consumo que son, en la mayoría de los casos, desconocidas en el país. Un ejemplo de ello es el hongo shiitake (*Lentinula edodes*) que se destaca como el segundo hongo comestible en términos de producción mundial, con 180.000 toneladas por año, siendo superado solamente por el champiñón común (*Agaricus* sp.) con una producción anual de 750.000 toneladas (Guzmán, Mata y Salmones, 2010). A pesar de ello, el hongo shiitake sigue siendo prácticamente desconocido en la dieta de los costarricenses.

Con este estudio se pretende caracterizar fisicoquímicamente la biomasa del rastrojo de piña y valorar, de manera preliminar, el potencial de su extracto hidrosoluble como sustrato para la propagación micelial del hongo comestible shiitake (*Lentinula edodes*).

## Referencial teórico

El cultivo del hongo shiitake se inicia en China alrededor del año 1000 d. C. y, probablemente, se introdujo en Japón a principios del siglo XVIII, aunque se sabe que se consumen variedades silvestres en este país desde el año 199. Actualmente, Japón produce más del 50% del hongo shiitake a nivel mundial y poco a poco esta producción se ha ido extendiendo a los Estados Unidos y otros países (Guzmán, Mata y Salmones, 2010).

Entre los principales beneficios nutricionales del hongo, Bisen (2010) reporta un contenido en base seca de minerales cercano al 6,0%, 2,1% de grasa total y 22,8% de proteína buta, además de un elevado contenido de fibra dietética. Longvah y Dosthale (1998, citado por Rivera, Albarracín y Lares, 2017) encontraron que la proteína del hongo shiitake contiene cantidades significativas de 18 aminoácidos. En relación con el contenido de minerales, dichos autores reportan altas concentraciones de sodio, hierro, manganeso, fósforo, calcio y magnesio.

Desde hace más de 50 años, existen numerosos y extensos estudios sobre las ventajas de los principios activos contenidos en el hongo shiitake, que comenzaron con el hallazgo de propiedades inhibitorias de la producción de sarcomas en ratones por parte de los polisacáridos presentes en esta especie (Chihara, Maeda, Hamuro, Sasaki y Fukuoka, 1969). En 1994, Suzuki, Takatsuki, Maeda, Hamuro y Chihara encontraron que uno de ellos, el lentinan, mostraba una marcada actividad antitumoral y antimetastática en numerosos sistemas tumor/hospedero y que era capaz de prevenir carcinogénesis química y viral. Roncero (2015) destaca este polisacárido como uno de los dos  $\beta$ -glucanos más empleados en la actualidad en la industria farmacéutica por sus propiedades antitumorales y actividad inmunomoduladora (HIV virus).

Otros estudios corroboran los efectos positivos del hongo shiitake en el tratamiento y prevención de diversos tipos de cáncer, entre ellos, el cáncer gástrico (Nimura, Mitsumori y Takahashi, 2006), cáncer de colon (Ng y Yap, 2002), cáncer de páncreas (Shimizu, Watanabe y Watanabe, 2009) y cáncer de hígado (Isoda, Eguchi y Nukaya, 2009). Finimundy, Dillon, Henriques y Ely (2014) presentan una amplia revisión de las propiedades farmacológicas aportadas por el consumo de este hongo.

En relación con la producción del hongo shiitake, muchas investigaciones se han centrado en fomentar su cultivo a nivel de bloques sintéticos (Villegas, Pérez y Arredondo, 2009). Salmones, Mata, Ramos y Waliszewski (1999) reportan un estudio, donde utilizan diversos sustratos sólidos elaborados a partir de paja de cebada, mazorca de maíz, brácteas de piña, salvado de arroz, bagazo de caña y cascarilla de café. Con este tipo de medios artificiales sólidos la producción de cuerpos fructíferos se demora, usualmente, varios meses en comenzar y relativamente pocos investigadores a nivel mundial se han dedicado a estudiar las etapas anteriores al proceso de desarrollo y fructificación en medios de cultivo líquidos sumergidos (Aminuddin, Khan y Madzlan, 2013).

De acuerdo con Guzmán *et al.* (2010), el hongo requiere una fuente abundante de nitrógeno para la elaboración de

sus proteínas. La suplementación con peptona, caseína, urea y sales de amonio favorece esta producción, pero Chang y Miles (2004) señalan las ventajas de la presencia de aminoácidos libres en los medios de cultivo, especialmente la asparagina. De igual forma, Queiroz, Cardoso, Regina y Eira (2004) demostraron en Brasil que la suplementación mineral con nitrógeno, fósforo y azufre en el agua de inmersión de los troncos en el momento de cada inducción de la fructificación del hongo shiitake, muestra un efecto significativo en el crecimiento de las variedades ensayadas, aun con dosis del orden del 0,05%.

De acuerdo con Nunes *et al.* (2012), entre los minerales más importantes para el crecimiento de los hongos están el hierro, el cobre, el magnesio, el sodio, el potasio, el calcio y el fósforo. Asimismo, la presencia de factores de desarrollo, tales como vitaminas y fitohormonas, induce positivamente el crecimiento micelial. En general, una de las vitaminas más importantes en el cultivo de los hongos es la tiamina y entre las hormonas que favorecen su desarrollo se menciona el ácido giberélico. Además, ha sido demostrado que el hongo shiitake tiene un gran potencial para la bioacumulación del elemento selenio, el cual es requerido en el aminoácido selenocisteína, necesario para la síntesis de, al menos, 12 selenoenzimas por el organismo (Nunes *et al.*, 2012).

## Metodología

### Muestreo

Las muestras de rastrojo de piña de segunda cosecha de la variedad Gold E.S. MD2 fueron recolectadas en los cantones de San Carlos y Los Chiles de la provincia de Alajuela, de las fincas Monte de la Providencia y Agrovicces de la Multinacional The Fruit Farm Group Costa Rica. Se seleccionó un lote de cada finca de donde se extrajeron por muestreo aleatorio simple en combinación con la técnica de cuadrante entre 15-18 plantas, para un total de 32 plantas. Se verificó que las plantas recolectadas no hubieran sido rociadas con ningún tipo de herbicida. Las muestras se lavaron con abundante agua y se secaron al ambiente por cuatro horas antes de registrar su peso. Posteriormente, 20 unidades de ellas se cortaron en piezas de, aproximadamente, 5 cm en una máquina picadora de doble cuchilla y luego se molieron dos veces en una máquina de astillado (Chipeadora Trituradora Bear Cat SC-3306), hasta alcanzar un tamaño de partícula menor a 0,8 cm en el 80% de la muestra total. Las 12 plantas restantes se diseccionaron manualmente, separándolas directamente en “hojas”, “tallos”, “raíz primaria”, “raíces secundarias” y “corona”. En la preparación de estas últimas muestras se siguieron las instrucciones de Sadzawka (2007) para

los procesos de descontaminación, secado, molienda y almacenamiento. Se tomó la hoja D, definida como la hoja más grande, la más gruesa y en la que los nutrientes tienden a estar más concentrados (Garita, 2014), de cada una de las plantas y se almacenaron en refrigeración a 5°C. Para las pruebas de crecimiento micelial se desecharon las hojas secas y se utilizaron solo las hojas verdes.

### **Materia seca, cenizas y materia orgánica**

La materia seca se determinó por calentamiento a  $105 \pm 3^\circ \text{C}$  durante cuatro horas y las cenizas por calcinación a  $575 \pm 25^\circ \text{C}$  durante cuatro horas. La materia orgánica se reportó como la diferencia entre el contenido de materia seca y su contenido de cenizas (Sluiter *et al.*, 2005a).

### **Contenido de nutrientes**

Se determinó C y N con un autoanalizador por combustión seca y el P, B y S por espectrometría de emisión atómica con plasma (ICP). Por otra parte, los elementos Co, Cu, Fe, K, Mg, Ni y Zn se determinaron en las diferentes secciones de la planta (hojas, tallos, raíz primaria, raíces secundarias y corona) por espectroscopía de absorción atómica (EAA).

### **Material hidrosoluble**

Para determinar la cantidad porcentual de sólidos solubles e insolubles en agua se tomaron muestras compuestas de alrededor de 25 g. Estas fueron procesadas con 500 ml de agua desionizada y luego filtradas al vacío. La masa insoluble se recolectó y se sometió a desecación a  $105 \pm 3^\circ \text{C}$  durante cuatro horas. La porción soluble se calculó por diferencia entre la masa seca de la muestra y la masa insoluble.

### **PH y acidez**

Los extractos se prepararon al 5% (m/v) y se midió el pH con un electrodo marca Ohaus, modelo Starter 5000 selectivo para iones hidronio. La acidez de los extractos se determinó por titulación potenciométrica hasta pH 8,0 y fue expresada como porcentaje de ácido láctico ( $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ ).

### **Conductividad eléctrica**

La conductividad eléctrica (CE) fue determinada en una pasta saturada de agua con una proporción de 50 ml de agua por 10 g de material.

### **Fósforo, calcio y cloruros solubles en el extracto acuoso**

El fósforo soluble se determinó por el método del ácido vanadomolibdofosfórico descrito en la Norma Mexicana NMX-AA-029-SCFI-2001. Para la determinación del calcio se empleó el método complexométrico con EDTA disódico a pH 10 y para los cloruros la determinación argentométrica por el Método de Mohr (Skoog, West, Holler y Crouch, 2016).

### **Extracción con etanol**

Se extrajo la biomasa durante 24 h empleando mezclas de etanol-agua con un rango de concentración del 0% al 100% de etanol.

### **Hidrólisis química**

Para determinar el efecto de la temperatura sobre el porcentaje de residuos no solubles, el rastrojo de piña se trató con disolución de ácido sulfúrico 1,0 M a diferentes temperaturas ( $25^\circ \text{C}$ ,  $50^\circ \text{C}$ ,  $75^\circ \text{C}$  y  $100^\circ \text{C}$ ) por dos horas. Para el estudio de la formación de azúcares reductores, aminoácidos y aldehídos a partir del rastrojo de piña se emplearon disoluciones buffer ajustados a pH 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13, con una concentración de fosfatos de 0,50 mol/l.

### **Determinación de azúcares reductores**

Se usó el método de Miller (1969) con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y medición de la densidad óptica a 540 nm, empleando una disolución de glucosa como sustancia patrón.

### **Determinación de aminoácidos libres**

Se llevaron a ebullición por 10 minutos alícuotas del extracto con disolución amortiguada (pH 7,0) de ninhidrina al 0,40% y se midió la densidad óptica a 570 nm.

### **Determinación de aldehídos**

Los extractos se clarificaron con hexacianoferrato (II) de zinc y los blancos se obtuvieron por adición de bisulfito de sodio ( $\text{NaHSO}_3$ ). Se compararon las absorbancias a 284 nm y 336 nm con muestras clarificadas no tratadas con bisulfito de sodio. Los resultados se expresaron como 5-(hidroximetil)furfural (HMF) calculados a partir de las absorbancias registradas a 284 nm y a 336 nm (AOAC, 2000c).

## Extracto acetónico

La extracción de pigmentos vegetales se realizó a temperatura ambiente ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) por maceración de la biomasa con acetona (5g/100 ml) en presencia de carbonato de magnesio ( $\text{MgCO}_3$ ) como agente neutralizante (UNESCO, 1966).

## Separación de pigmentos vegetales

La biomasa extraída con acetona se concentró a un décimo de su volumen. Se aplicó el concentrado sobre una placa de sílica gel 60 F<sub>254</sub> de la marca Merck. Los pigmentos separados por cromatografía de capa fina (TLC) se redisolvió en acetona y sus espectros visibles fueron registrados de 380 nm a 750 nm (AOAC, 2000a y AOAC, 2000b).

## Determinación del crecimiento micelial de *Lentinula edodes*

Se formuló en tubos de ensayo un medio de agar papa dextrosa (PDA), el cual se esterilizó a  $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  y a  $1,5 \text{ kg/cm}^2$  de presión. Los medios esterilizados se colocaron en posición inclinada hasta su solidificación (*slant*). Para obtener un cultivo puro se recogió una pequeña porción de tejido del cuerpo de fructificación del hongo shiitake y se colocó en el medio de PDA esterilizado en condiciones asépticas. Se incubó a  $25^\circ\text{C}$  durante 7 a 10 días hasta la obtención de un abundante crecimiento micelial (Ashrafuzzaman, Kamruzzaman, Razi-Ismail y Fakir, 2009). Posteriormente, se formularon medios de cultivo empleando 0%, 25%, 50%, 75% y 100% de extracto de biomasa foliar (hojas D) del rastrojo de piña al 10%, todos contenían un total de 1,5% de agar y 2,0 % de glucosa. Los medios se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a  $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  (presión  $1,5 \text{ kg/cm}^2$ ). El pH se ajustó a 4,0 con ácido tartárico al 10% previo a la inoculación con micelio del hongo shiitake. El crecimiento micelial se registró después de 72 horas a  $27^\circ\text{C}$ .

Para determinar su crecimiento se promediaron los diámetros horizontales (DH) y vertical (DV) de cada una de las colonias de las dos placas con la misma cantidad de extracto suplementado. Posteriormente, se calculó el radio medio ( $r$ ) y las áreas se obtuvieron usando la ecuación  $A = \pi r^2$ .

## Manejo de datos y análisis estadístico

Para el análisis de datos se utilizó Excel en la determinación de las medias, desviaciones estándar, varianzas e incertidumbres. Se hizo al menos tres repeticiones para

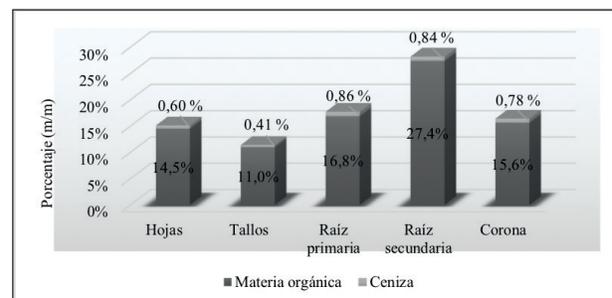
cada ensayo. Los límites de confianza se calcularon con un 5% de significancia.

## Resultados y análisis

### Secciones de la planta de piña

Se encontró que la masa promedio de una planta fue de  $3,53 \pm 1,34 \text{ kg}$ , de la cual, la porción de biomasa correspondiente a las láminas (hojas) fue de  $2,46 \pm 1,00$ . Estos resultados fueron similares a los reportados por Hernández-Chaverri y Prado-Barragán (2018) de  $3,59 \pm 0,17 \text{ kg}$ , para más de 105 plantas muestreadas. La parte foliar (aérea) de las plantas representó cerca del 84% de la masa de toda la planta, un valor similar al reportado por Garita (2014) del 85%, las cuales se recolectaron con menor cantidad de suciedad y fueron más fáciles de limpiar.

El contenido de materia seca, ceniza y materia orgánica según la parte de la planta se muestra en la figura 1. Sobresalen las diferencias de los contenidos de ceniza entre las raíces y las demás secciones de la planta, lo que indica una posible contaminación con suelo difícil de eliminar. Por su parte, los tallos contienen el menor porcentaje de materia seca y tomando en cuenta que el fruto se comercializa adherido a la corona, la mayor disponibilidad práctica de biomasa estaría dada, presumiblemente, por las hojas.



**Figura 1.** Porcentajes de materia seca y cenizas según sección de la planta. **Fuente:** elaboración propia.

### Macro y micronutrientes en el rastrojo y sus partes

En la tabla 1 se muestran los resultados de la determinación del porcentaje de carbono (% C) que corresponde a un valor medio de 41,20% en base seca. La relación de C/N se encuentra entre los valores óptimos que indica Román, Martínez y Pantoja (2013) de (15:1-35:1) para su uso como sustrato para abonos orgánicos. El NPK medio para la composición del rastrojo fue de 1,36-0,10-1,81. Chang y Miles (2004) señalan que la proporción C/N se usa a menudo como referencia relativa para caracterizar

**Tabla 1.** Contenido medio de nutrientes mayores en muestras de rastrojo según origen.

Origen de la submuestra	C (%)	C/N	N (%)	P (%)	K (%)	S (%)	B (mg%)
Submuestra 1 Los Chiles	38,27	33,2	1,15	0,08	1,64	0,14	27
Submuestra 2 Los Chiles	40,16	23,2	1,73	0,15	2,99	0,25	28
Submuestra 1 San Carlos	40,50	27,6	1,47	0,10	1,78	0,16	34
Submuestra 2 San Carlos	43,65	40,7	1,07	0,08	0,82	0,16	22
	40,6	31,2	1,36	0,10	1,81	0,18	28

**Fuente.** elaboración propia.

medios orgánicos como la madera para la producción de hongos. De acuerdo con Chen (2005), para el crecimiento micelial del hongo shiitake, la relación óptima de C/N es 25:1, y aumenta a 40:1 para la fase productiva. Por su parte, Aminuddin, Khan y Madzlan (2013) advierten que un exceso de carbono puede producir deficiencias en la elaboración de aminoácidos y proteínas, mientras que un exceso de nitrógeno puede generar amoníaco que al elevar el pH de los medios podría reducir significativamente la velocidad de crecimiento de los hongos. Chen (2005) reporta el rango óptimo de pH para el crecimiento micelial del hongo shiitake entre 4,5 y 5,5 y entre 3,5 y 4,5 para la formación de los cuerpos fructíferos. La tabla 1 incluye también los contenidos de azufre y boro, elementos sumamente importantes en la producción de este hongo (Chang y Miles, 2004). (Ver tabla 1).

En la tabla 2 se muestra el contenido de nutrientes catiónicos de relevancia en el crecimiento del hongo shiitake y que están presentes en las diferentes secciones de la planta de piña (hojas, tallo, raíz primaria, raíces secundarias y corona). El potasio fue el elemento más abundante, y su contenido fue hasta 10 veces mayor en tallos y hojas, comparado con el obtenido para magnesio. Por otra parte, los contenidos relativos de Cu, Ni y Co fueron de 0,74; 0,81 y 0,15 mg% de materia seca, res-

pectivamente. El contenido de Zn se mantuvo constante, cercano a los 5 mg% en las diferentes partes de la planta, y junto con el Fe, representaron dos de los elementos más importantes para el crecimiento y desarrollo de los hongos (Turlo, Gutkowska, Kalucka y Bujak, 2007). Basado en esta información, se podrán definir en el futuro las cantidades suplementarias de nutrientes requeridas en la elaboración de los medios de cultivo. (Ver Cuadro 2).

#### Extracción acuosa

Por medio de la extracción con agua desionizada, se encontró que un  $53,7 \pm 0,8$  % de la biomasa seca del rastrojo correspondía a material hidrosoluble, mientras que un  $46,3 \pm 0,8$  % a material insoluble en agua, información importante para efectos de comparación con porcentajes de extracción empleando otros tratamientos físicos, químicos o biológicos (Constable y Jiménez-González, 2011).

#### Azúcares reductores

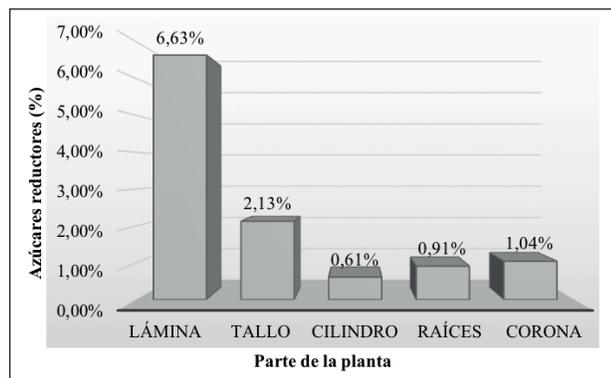
En la figura 2 se muestran los contenidos de azúcares reductores según las diferentes secciones de la planta de piña. Se observa que el extracto acuoso de la biomasa foliar (láminas) es la que mayor cantidad de azúcares re-

**Tabla 2.** Contenido de minerales presentes según parte de la planta (mg/100 g de materia seca)

Elemento	Hojas	Tallos	Raíz primaria	Raíces secundarias	Corona
Co	0,06 ± 0,03	0,06 ± 0,03	0,19 ± 0,06	0,20 ± 0,07	0,25 ± 0,13
Cu	0,81 ± 0,21	0,65 ± 0,21	0,60 ± 0,12	0,79 ± 0,31	0,87 ± 0,22
Fe	7,5 ± 3,0	1,4 ± 0,7	0,41 ± 0,57	68,4 ± 13,5	31,2 ± 2,5
K	207,8 ± 21,2	289,3 ± 17,0	130,7 ± 11,9	102,9 ± 15,0	197,4 ± 22,5
Mg	18,8 ± 1,6	24,2 ± 1,4	15,3 ± 0,9	8,5 ± 0,7	16,5 ± 1,5
Ni	0,60 ± 0,25	1,19 ± 0,12	0,81 ± 0,08	0,53 ± 0,09	0,92 ± 0,08
Zn	6,0 ± 1,5	4,8 ± 0,9	3,1 ± 0,4	8,2 ± 1,6	4,0 ± 0,3

**Fuente.** elaboración propia.

ductores exhibe, hecho que reafirma la idea de usar esta parte de la planta en el cultivo del shiitake, la cual es a la vez la más fácil de extraer, limpiar e higienizar.



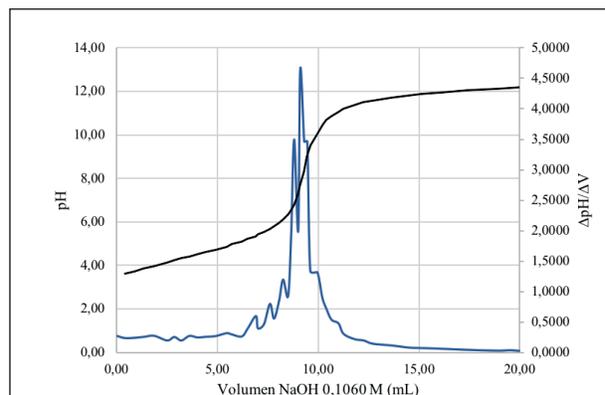
**Figura 2.** Contenido de azúcares reductores presentes en diferentes secciones de la planta de piña y en la muestra de rastrojo compuesto. **Fuente:** elaboración propia.

### PH, acidez y conductividad eléctrica del rastrojo

El valor de pH de 20 muestras de rastrojo de piña varió entre 3,63 y 4,47, con una media de  $4,05 \pm 0,42$ . La variabilidad de estos valores está asociada a las condiciones de extracción y solubilización del material. De acuerdo con Jay, Loessner y Golden (2009), este valor medio de pH es suficientemente bajo para favorecer con ventaja el crecimiento de los hongos sobre el de las bacterias, lo cual abre buenas posibilidades para el cultivo del hongo shiitake sin necesidad de acidificar el medio como medida preventiva contra una eventual contaminación bacteriana. Asimismo, esta acidez permite que se dé cierto grado de hidrólisis natural de algunos de los polisacáridos presentes, sin el riesgo de que se genere furfural o 5-(hidroximetil) furfural (HMF) a partir de los monosacáridos presentes. De acuerdo con Basumalick y Rohrer (2016), existe una alta probabilidad de formación de aldehídos a partir de monosacáridos de cinco y seis carbonos durante una hidrólisis ácida. De igual manera, una fracción importante de la lignina podría disolverse en medio ácido y absorber en la región ultravioleta, cerca de 280 nm, por lo que podría presentar interferencia con la determinación precisa del contenido de aldehídos. De acuerdo con Chi, Zhang, Chang y Jameel (2009), se recomienda realizar mediciones adicionales de la absorbancia a 280 nm del extracto reducido con borohidruro de sodio, con el fin de conocer la concentración de lignina en el filtrado y aplicar las correcciones necesarias.

La presencia de sistemas amortiguados en los extractos y los diferentes grados de disociación que pueden presentar los ácidos orgánicos hace necesario determinar la acidez

equivalente en el extracto acuoso además del valor de pH (Skoog *et al.*, 2016). En la figura 3 se presenta la curva de titulación correspondiente; la gráfica de la primera



**Figura 3.** Primera derivada de la curva de titulación del extracto acuoso de rastrojo de piña con disolución estandarizada de hidróxido de sodio 0,1060 M. **Fuente:** elaboración propia.

derivada indica claramente el punto de equivalencia química. A partir de los datos obtenidos se puede demostrar que la acidez del rastrojo de piña expresada como ácido láctico ( $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ ) fue de 3,48% en base seca.

En el caso de que se deseara utilizar los azúcares reductores de los extractos de rastrojo de piña, para producir ácido acético o ácido láctico, es necesario disponer de un sistema amortiguador que mantenga el pH entre 5 y 6 con el fin de favorecer la producción de acetato o lactato por parte de las bacterias *Acetobacter* o *Lactobacillus*, respectivamente; esto por cuanto según Jay, Loessner y Golden (2009), un nivel de acidez elevado con un pH inferior a 3 sería inhibitorio para el crecimiento de estos dos géneros. En ambos casos se requiere un aislamiento y purificación posterior del producto generado.

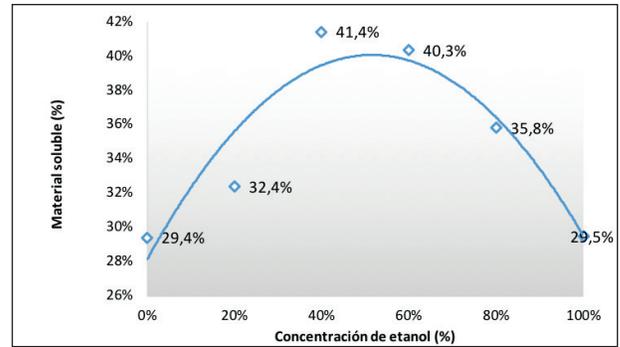
La conductividad eléctrica del extracto fue de 8,5 mS/cm, lo cual revela una elevada presencia de iones, entre los cuales se determinaron el calcio y los cloruros por titulación volumétrica y los fosfatos por espectroscopía visible. Los resultados obtenidos fueron de  $207 \pm 4$  mg% Ca ( $1047 \pm 18$  mg% Ca en base seca) y  $42,7 \pm 4,6$  mg% P ( $216,1$  mg% P en base seca), particularmente requeridos para promover un buen crecimiento micelial (Chang y Miles, 2004). Finalmente, el contenido de cloruros expresado como cloruro de sodio fue bajo y se ubicó en  $0,98 \pm 0,03$  mg% NaCl ( $4,96 \pm 0,15$  mg% NaCl en base seca), lo cual corresponde a una salinidad reducida que no debería afectar el desarrollo micelial del hongo shiitake.

### Extracción hidroalcohólica

Los resultados de las pruebas de extracción con mezclas de agua-etanol se muestran en la figura 4. Los valores máximos de solubilización se observaron al usar entre un 40 a 60 % de etanol en la mezcla. El aumento en la cantidad de material extraíble al aumentar la concentración del etanol de 0% a 40% se debe probablemente a que una disminución en la polaridad del medio disolvente favorece la remoción de sustancias poco polares como algunos fosfolípidos, alcoholes grasos, ceras y resinas (Badui, 2013), las cuales podrían estar impidiendo, incluso, la penetración del agua en espacios con presencia de compuestos hidrosolubles. Por otro lado, cuando el porcentaje de etanol aumenta de 60% a 100 %, la cantidad de materia extraída disminuye debido a la menor solubilidad de sustancias orgánicas polares, tales como carbohidratos y ciertas proteínas globulares que se desnaturalizan por el cambio en la constante dieléctrica del medio (Badui, 2013). Esta desnaturalización generaría a su vez barreras físicas que reducirían la capacidad de penetración del disolvente dentro de las células vegetales, pero aumentarían la capacidad de extracción de otras moléculas de interés como pigmentos, ciertas vitaminas y algunos compuestos funcionales. Esta información es relevante para el fraccionamiento de componentes al aplicar procesos de biorrefinería, para la búsqueda, aislamiento y purificación de moléculas biofuncionales que permitan obtener un mayor valor agregado a partir de los desechos de la biomasa lignocelulósica de la piña (Clark y Deswarte, 2014). (Ver figura 4).

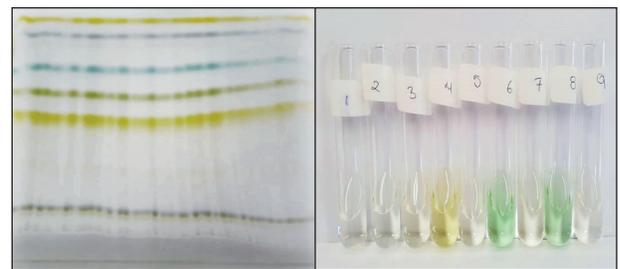
### Extractos acetónicos

Los resultados de la separación de los pigmentos del extracto por medio de cromatografía de capa fina (TLC) se

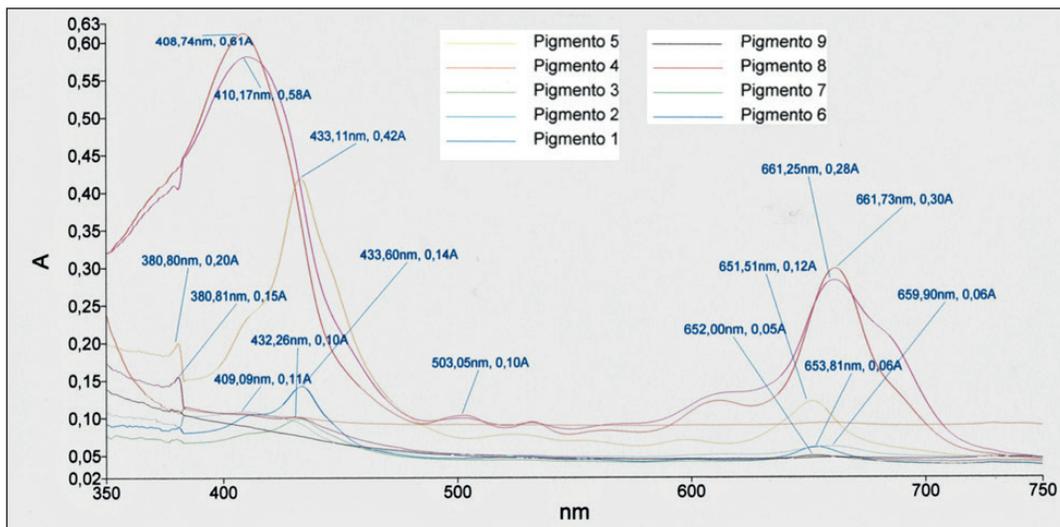


**Figura 4.** Efecto de la concentración del etanol sobre el porcentaje de material extraíble. **Fuente:** elaboración propia.

muestra en las figuras 5A y 5B, mientras que la figura 6 presenta los espectros de absorción de los nueve pigmentos aislados por raspado de placa y redisolución de la banda coloreada en acetona.



**Figura 5. A.** Separación cromatográfica de nueve pigmentos en el extracto de rastrojo de piña (cromatoplaqa de sílica de 25 cm x 25 cm). **B.** Redisolución en acetona de los pigmentos del rastrojo de piña aislados. **Fuente:** elaboración propia.



**Figura 6.** Espectros de absorción de los nueve pigmentos aislados. **Fuente:** elaboración propia.

Las clorofilas se identifican porque exhiben dos bandas principales de absorción de la luz principales: una en el extremo azul del espectro electromagnético (menor a 460 nm) y otra en la región roja del espectro (entre 630 y 670 nm) (UNESCO, 1966). Las mediciones se realizaron en esta última región, en vista de que los carotenoides se absorben en la región azul y causan fuerte interferencia (AOAC 942.04 y AOAC 955.10, 2000).

Entre los pigmentos separados destacan el pigmento número 4 que corresponde a un compuesto carotenoide con máximos de absorción de 433,11 nm y que presenta una absorbancia de 0,42, relativamente alta en comparación con la obtenida para otros 8 pigmentos. En relación con las clorofilas, los más notables fueron los pigmentos 6 y 8, con máximos de absorción en 410,17 nm ( $A = 0,58$ ) y 408,74 nm ( $A = 0,61$ ) en la región del azul, y máximos de absorción en 661,25 ( $A = 0,28$ ) y 661,73 nm ( $A = 0,30$ ), en la región del rojo, respectivamente. Basándose en lo discutido por Reol (2003) se deduce por los máximos de absorción del espectro de la figura 6, que el pigmento número 6 corresponde a la clorofila b y que el pigmento número 8 corresponde a la clorofila a.

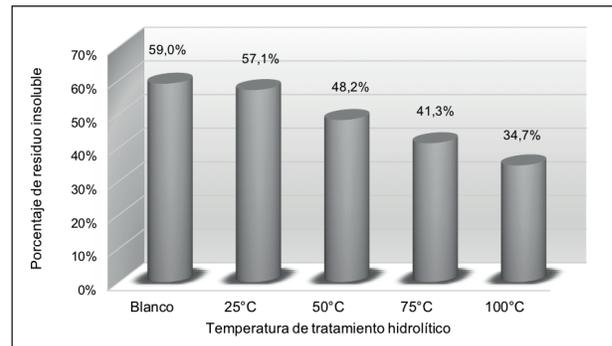
A medida de que las plantas de rastrojo van perdiendo su frescura, los colores verdes van cediendo y cambiando a colores pardos, principalmente por la acidificación del medio y la pérdida de un átomo de magnesio de la molécula, dando lugar a la formación de feofitinas pardas (Badii, 2013). Se sugiere a partir de este punto el desarrollo de un método colorimétrico rápido que permita evaluar la frescura del rastrojo y a la vez ser correlacionado con la presencia de biomoléculas funcionales que contribuyan al crecimiento y desarrollo del micelio de shiitake.

Asimismo, las clorofilas tienen diversas aplicaciones, como pigmento verde natural en los alimentos y en la industria médica y farmacéutica, por lo que su extracción y concentración para dichos usos como parte de un proceso integral de biorrefinería podría aportar beneficios en relación con el aprovechamiento del rastrojo de la piña.

#### Efecto de la hidrólisis química en el material soluble

La figura 7 permite visualizar el efecto que tiene la temperatura en el tratamiento ácido realizado sobre la biomasa foliar del rastrojo de piña. No se observaron diferencias significativas a temperatura ambiente en presencia o ausencia de ácido sulfúrico 1,0 M durante dos horas. Sin embargo, al aumentarse la temperatura de 25°C a 100°C, se observaron efectos importantes en la solubilización del residuo insoluble, lo cual sugiere un aumento de la cantidad de azúcares reductores y aminoácidos libres disponibles, que podrían ser aprovechables para el creci-

miento micelial del hongo shiitake. La hidrólisis química del rastrojo de piña genera carbohidratos simples a partir de carbohidratos complejos presentes en la muestra, especialmente, aquellos que forman parte de las estructuras fibrosas de carácter lignocelulósico de la biomasa (Clark y Deswarte, 2014). Los almidones y proteínas son, también, susceptibles a romperse en unidades de glucosa y aminoácidos, respectivamente (Yurkanis, 2008).



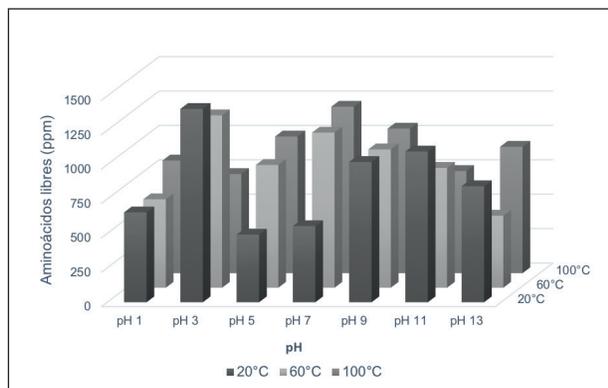
**Figura 7.** Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de residuos insolubles del rastrojo de piña tratado con disolución de ácido sulfúrico 1,0 M. **Fuente:** elaboración propia.

#### Efecto del pH y temperatura en la hidrólisis de las proteínas

Como se observa en la figura 8, en el rango de pH entre 5 y 7, el aumento de temperatura permite una mayor liberación de aminoácidos en el medio. Sin embargo, cuando el pH es de 3 hay un efecto inverso, debido a que la acidez es suficiente para romper los enlaces peptídicos a temperatura ambiente sin destrucción de los aminoácidos formados. Este mismo efecto puede observarse a un pH de 11. En valores de pH 1, pH 9 y pH 13 sí se da un aumento en la concentración al incrementar la temperatura. En la producción de otros hongos en medios líquidos o semisólidos, Chang y Miles (2004) reportan que la presencia de aminoácidos libres en los medios de cultivo favorecían el crecimiento en mayor grado que una eventual suplementación con sales de amonio como fuente de nitrógeno, y la asparagina es el mejor aminoácido como fuente de este elemento.

Es importante considerar que el pH natural del extracto de rastrojo de piña medido en esta investigación fue de  $4,05 \pm 0,42$ , bastante cercano al pH en el cual se da la mayor producción de aminoácidos libres a temperatura ambiente, lo cual sugiere que se podrían formular medios de cultivo ricos en estos nutrientes directamente con el extracto no hidrolizado. Por otra parte, a pH 7 se da la segunda mayor producción de aminoácidos libres bajo la condiciones del experimento; sin embargo, para un uso

práctico se requeriría, en una primera etapa, neutralizar el pH del rastrojo, aplicar calor y, posteriormente, reacidificar el medio hasta pH 3 o 4, lo cual sería energéticamente desfavorable. Aminuddin, Khan y Madzlan (2013) recomiendan el rango de pH entre 4 y 7 para el crecimiento micelial óptimo del hongo shiitake y Chen (2005) recomienda el uso de sistemas amortiguados debido al rápido cambio en los valores del pH de los medios en el tiempo debido, precisamente, a la absorción de sustancias por parte del hongo en crecimiento y la liberación de nuevos metabolitos en el medio.

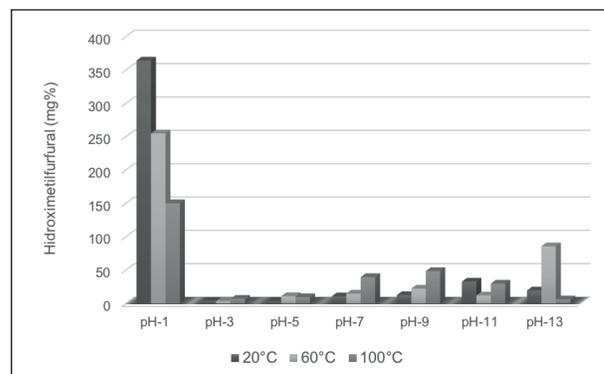


**Figura 8.** Efecto del pH y la temperatura sobre la producción de aminoácidos libres a partir de la biomasa foliar de la piña. **Fuente:** elaboración propia.

#### Efecto del pH y la temperatura en la producción de aldehídos

Como puede apreciarse en la figura 9, la formación de aldehídos expresados como 5-(hidroximetil) furfural ocurre, principalmente, a valores de pH muy bajos y es favorecida más a temperatura ambiente que en caliente, lo que podría indicar que el HMF experimenta transformaciones adicionales a mayor temperatura, tal como podría ser el caso de su oxidación a ácidos carboxílicos u otras reacciones de descomposición. De acuerdo con Chi, Zhang, Chang y Jameel (2009), en condiciones ácidas y especialmente a altas temperaturas, el 2-furfuraldehído (furfural) se produce rápidamente a partir de las pentosas y el 5-(hidroximetil)-2-furfural (HMF) se forma fácilmente a partir de las hexosas e interfiere con la exactitud de los análisis de carbohidratos y afecta negativamente la fermentación alcohólica si las concentraciones de estos aldehídos superan cierto nivel de concentración.

La producción de aldehídos expresados como 5-(hidroximetil) furfural (HMF), producidos a partir de la deshidratación y ciclación de los carbohidratos presentes en los residuos de biomasa puede representar un problema o un beneficio, de acuerdo con el uso previsto que se tenga para el rastrojo de piña. Como indican Taherzadeh,



**Figura 9.** Aldehídos generados a diferentes condiciones de pH y temperatura expresados como 5-(hidroximetil) furfural (mg%). **Fuente:** elaboración propia.

Kiklasson y Lidén (2000), en el caso de que los azúcares reductores sean destinados, posteriormente, a una fermentación controlada por medio de *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención de bioetanol, la presencia de aldehídos puede provocar la inhibición del crecimiento, reproducción y comportamiento biológico de esta levadura. Estos autores encontraron similares efectos en los casos del furfural y el 5-hidroximetilfurfural, los cuales son convertidos por la levadura en alcohol 5-(hidroximetil) furfurílico formado a partir de piruvato y HMF en una reacción posiblemente catalizada por la enzima piruvato descarboxilasa. Taherzadeh *et al.* (2000) determinaron que la presencia de ambos compuestos en concentraciones de 2 g/l o más, puede llegar a inhibir completamente el crecimiento de algunos hongos tales como el *Saccharomyces cerevisiae*. Se prevé que esto podría también suceder en el caso de la propagación micelial del hongo shiitake.

Por otra parte, Clark y Deswarte (2014) apuntan la existencia de toda una industria centrada en la producción y transformación del 5-(hidroximetil) furfural en muchos otros compuestos de alto valor agregado, en virtud de que sus grupos funcionales son fácilmente modificables mediante procesos bioquímicos sencillos.

#### Propagación micelial del hongo shiitake

En la tabla 3 se tabulan los resultados del crecimiento micelial del hongo shiitake. Conforme se incrementa la cantidad de extracto agregado en el medio elaborado, la velocidad con que aumenta el área de micelio también aumenta, lo cual es un indicativo de que el sustrato sí cumple con las características nutricionales requeridas para el desarrollo y crecimiento micelial. De acuerdo con Chang y Miles (2004), una vez que los compuestos orgánicos apropiados han ingresado a la célula fúngica, estos pueden ser convertidos en azúcares, polisacáridos, proteínas,

lípidos, purinas, pirimidinas y vitaminas, entre otros, requeridos para las actividades vitales y las necesidades estructurales del hongo. En la figura 10 se aproxima la tendencia observada en el cambio de área colonizada por el hongo con una curva polinomial de segundo orden.

En vista de que las condiciones empleadas para la obtención de los extractos son las del pH natural del rastrojo ( $4,05 \pm 0,42$ ) y la temperatura ambiente ( $23 \pm 2$ ), sin necesidad de agregar otras sustancias o incorporar procesos que requieran un consumo energético de costo elevado, se establece un antecedente de uso para el rastrojo de piña, que podría impactar de manera positiva la generación de emprendimientos en áreas socioeconómicas vulnerables, tales como lo son las regiones de mayor cultivo de la piña en Costa Rica.

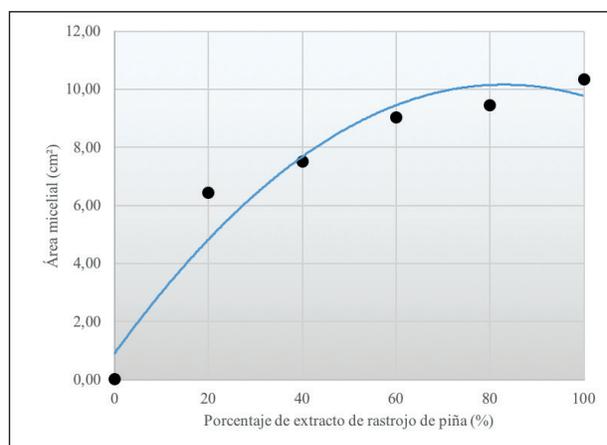
Asimismo, Chen (2005) encontró que la temperatura óptima para el crecimiento micelial del hongo shiitake se encuentra entre 24 y 27°C, rangos de temperatura fácilmente alcanzables cerca de las plantaciones de piña, aunque en la etapa productiva se debe tomar precauciones especiales en la construcción de instalaciones con este propósito puesto que el crecimiento micelial se detiene arriba de 34°C y muere a los 40°C. Esto es especialmente importante para la definición de la ubicación geográfica de los centros productivos, debido a los altos costos involucrados en el escalamiento de procesos que requieren la aplicación o sustracción de energía y el uso intensivo de productos químicos adicionales para alcanzar rendimientos económicamente viables.

La optimización de las curvas de producción micelial deberá tomar en cuenta factores como la temperatura, el tiempo y adición de algunos nutrientes que muestran

**Tabla 3.** Crecimiento micelial del hongo shiitake en medios de cultivo preparados con extracto de biomasa foliar del rastrojo de piña e incubados a 27°C durante 72 h.

Extracto empleado en el medio de cultivo (%)	Placa	D <sub>H</sub> (cm)	D <sub>V</sub> (cm)	Área media (cm <sup>2</sup> )
0%	A	0,20	0,32	0,03 ± 0,01
	B	0,11	0,10	
20%	A	3,81	2,80	6,44 ± 0,62
	B	2,28	2,56	
40%	A	3,18	2,84	7,50 ± 0,05
	B	3,26	3,08	
60%	A	3,57	3,33	9,02 ± 0,11
	B	3,64	3,02	
80%	A	3,59	4,00	9,44 ± 0,24
	B	3,14	3,13	
100%	A	3,28	3,68	10,34 ± 0,09
	B	3,90	3,66	

Fuente: elaboración propia.



**Figura 10.** Área de crecimiento micelial del hongo shiitake en medios de cultivo suplementados con extracto de biomasa foliar de rastrojo de piña (27°C, 72 h). La relación está dada por la ecuación. Área micelial (cm<sup>2</sup>) =  $-0,0013x^2 + 0,2231x + 0,9008$  (coeficiente de determinación,  $R^2=0,937$ ). Fuente: elaboración propia.

carencia en los extractos de la biomasa foliar de la piña. Resulta especialmente importante la evaluación de la calidad del micelio y de los futuros cuerpos fructíferos producidos a partir de este sustrato en términos de su composición nutricional (proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales), de la concentración de moléculas biofuncionales (antioxidantes, eritadenina, lentinan, y otros polisacáridos) y de su calidad sensorial (umami, lentionina, fibra y pigmentos).

## Conclusiones y recomendaciones

1. La biomasa foliar de la planta de piña representa alrededor del 85% de su masa total y posee la ventaja de una menor susceptibilidad a la contaminación con partículas de suelo. La forma lanceolada de la hoja permite también una limpieza y desinfección sencilla. Además, contiene una alta proporción de azúcares reductores, por lo que para efectos del cultivo del hongo shiitake representa la mejor opción en comparación con otras partes ensayadas de la planta. Se recomienda por tanto recolectar la biomasa residual sin trituración ni tratamiento con herbicidas quemantes para su aprovechamiento en las técnicas de fungicultura propuestas.
2. Los extractos acuosos de rastrojo de piña son adecuados para la elaboración de medios de cultivo compuestos empleados en la producción de hongos shiitake. Debe corroborarse qué sustancias se hallan en cantidades insuficientes con el fin de enriquecer estos medios y mejorar la producción. Se recomienda emplear técnicas cromatográficas (HPLC, CG-MS) que

permitan la identificación y cuantificación de cada uno de los glúcidos simples presentes en el rastrojo, específicamente glucosa, fructosa y xilosa.

3. Bajo las condiciones experimentales empleadas para la obtención de extractos a partir del rastrojo de piña, no se evidenció la presencia de sustancias inhibitorias para el crecimiento micelial del hongo, tales como residuos de fungicidas o aldehídos en concentraciones nocivas. Se recomienda verificarlo por medio de cromatografía de gases o utilizar solamente los residuos de explotaciones orgánicas.

4. La hidrólisis de los polisacáridos y proteínas presentes en el rastrojo de piña a moléculas más pequeñas como azúcares reductores y aminoácidos libres mejora la biodisponibilidad de nutrientes para el crecimiento micelial del hongo shiitake. Se deben determinar las condiciones experimentales de hidrólisis química o enzimática en que estos componentes se podrían desdoblar sin destruir moléculas esenciales que favorecen su desarrollo normal ni liberar compuestos como los aldehídos que podrían inhibir el crecimiento de este hongo.

5. Una mayor velocidad de crecimiento no implica necesariamente una mejora en la calidad nutricional y organoléptica de los hongos producidos por lo que se recomienda continuar el estudio en las etapas subsiguientes determinar la composición química y el perfil sensorial de los hongos cosechados.

Quedan aún muchos aspectos por evaluar e identificar con el fin de generar un paquete tecnológico para la producción de hongos shiitake, que pueda ser aprovechado y reproducido por pobladores locales de las regiones del país donde se cultiva la piña. Se recomienda continuar con un enfoque integral en donde se revisen aspectos económicos y administrativos para la promoción de los resultados de este ensayo en la creación de emprendimientos y a la vez se vayan definiendo estrategias de promoción que aumenten la demanda del hongo en el mercado nacional sustentadas en sus beneficios medicinales, nutricionales y organolépticos. Por el momento, se logra con esta investigación establecer que los extractos obtenidos del rastrojo de piña de la Región Huasteca Norte son aprovechables en la etapa de propagación micelial *in vitro* del hongo shiitake.

## Agradecimientos

Al Dr. Francisco Romero Royo, Vicerrector de Investigación y Transferencia de la Universidad Técnica Nacional, por el apoyo dado en el uso de las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Química y Biociencias Aplicadas (LQBA-UTN) y al Proyecto de Acuerdo de

Mejoramiento Institucional de la Universidad Estatal a Distancia (AMI-UNED) por el financiamiento en los estudios de doctorado.

## Referencias bibliográficas

- Alpizar, J., Villegas, L., Madrigal, S. y Sibaja, M. (2013). *Utilización de la biomasa residual de la piña (Ananas comosus) para la desproteinización enzimática de desechos de la actividad camaronera*. UNICIENCIA 27(1):156-170.
- Aminuddin, H., Khan, A.M. y Madzlan, K. (2013). *Effects of pH on mycelial growth and amino acid composition of Lentinula edodes in submerged cultures*. J. Trop. Agric. and Food. Sc. 41(1) (2013):63-70. Recuperado de <http://ejtjafs.mardi.gov.my/jtjafs/41-1/Mycelial%20growth.pdf>
- AOAC (2000a). *Carotenes in plants*. AOAC Official Method 955.10. Official methods of Analysis of the Association of Official's Analytical Chemists, Arlington, Virginia
- AOAC (2000b). *Chlorophyll in plants: Spectrophotometric method for total chlorophyll and the A and B components*. AOAC Official Method 942.04. Official methods of Analysis of the Association of Official's Analytical Chemists, Arlington, Virginia
- AOAC (2000c). *Hydroxymethylfurfural in honey*. AOAC Official Method 980.23. Official methods of Analysis of the Association of Official's Analytical Chemists, 17th ed., Arlington, Virginia.
- Ashrafuzzaman, M., Kamruzzaman, A.K.M, Razi-Ismael, M. y Fakir, S.A. (2009). *Substrate affects growth and yield of shiitake mushroom*. African Journal of Biotechnology, 8 (13):2999-3006. Recuperado de <https://www.academicjournals.org/journal/AJB/article-full-text-pdf/E1080D37913>
- Badui, S. (2013). *Química de los alimentos*, Editorial Pearson, México.
- Basumalick, L. y Rohrer, J. (2016). *Determination of hydroxymethylfurfural in honey and biomass*. Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA.
- Bisen, P.S., Baghel, R.K., Sanodiya, B.S., Thakur, G.S. y Prasad, G.B.K.S. (2010). *Lentinus edodes: A macrofungus with pharmacological activities*. Current Medicinal Chemistry, 2010(17): 2419-2430. Recuperado de [https://www.researchgate.net/profile/Prakash\\_Bisen/publication/44619902\\_](https://www.researchgate.net/profile/Prakash_Bisen/publication/44619902_)

Lentinus\_edodes\_A\_Macrofungus\_with\_Pharmacological\_Activities/links/09e414ff4f0ceb5e9d000000/Lentinus-edodes-A-Macrofungus-with-Pharmacological-Activities.pdf

- CANAPEP (2019). *Historia. Cámara Nacional de Importadores y Exportadores de Piña*. Recuperado de <https://canapep.com/historia/>
- Chang y Miles (2004). *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact*. New York, CRC.
- Chen, A. (2005). *What is shiitake?. Chapter 1. In Shiitake Cultivation, Mushroom Growers' Handbook 2*. Recuperado de <http://www.hongoscomestiblesymedicinales.com/P/P/shiitake/capitulo%201%20pag.1-15.pdf>
- Chi, C., Zhang, Z., Chang, H. y Jammel, H. (2009). *Determination of furfural and hydroxymethylfurfural formed from Biomass under acidic conditions. Journal of Wood Chemistry and Technology, 29, 265–276*. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/249077834\\_Determination\\_of\\_Furfural\\_and\\_Hydroxymethylfurfural\\_Formed\\_From\\_Biomass\\_Under\\_Acidic\\_Conditions](https://www.researchgate.net/publication/249077834_Determination_of_Furfural_and_Hydroxymethylfurfural_Formed_From_Biomass_Under_Acidic_Conditions)
- Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T. y Fukuoka, F. (1969). *Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from Lentinus edodes (Berk.) sing. Nature. 222(5194):687-8*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5768289>
- Clark, J. y Deswarte, F. (2105). *Introduction to chemicals from biomass*. John Wiley & Sons, Ltd, Singapore: Wiley Series.
- Constable, D.J. y Jiménez-González, C. (2011). *Green Chemistry and Engineering a practical design approach*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Corrales, Y., Villalobos, C., Pereira, R., Camacho, M., Estrada, E., Argüello, O. y Vega, J.R. (2018). *Microparticles obtained as a sub-product of the nanocellulose extraction process from pineapple peels. Scientific Reports | (2018) 8:10417 | DOI:10.1038/s41598-018-28444-4*
- Coto, K.O. (2016, 30 de junio). *CIA promueve producción de hongos comestibles*. Universidad de Costa Rica. Recuperado de: <https://www.ucr.ac.cr/noticias/2016/06/30/cia-promueve-produccion-de-hongos-comestibles.html>
- De Pablo, J., Tassile, V. y Giacinti, M.A. (2017). *Cambios en el modelo de comercio internacional de piña en Costa Rica*. Revista Agroalimentaria. 23(44):45-60. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6108946>
- Finimundy, T.C., Dillon, A.J.P., Henriques, J.A.P. y Ely, M.R. (2014). *A review on general nutritional compounds and pharmacological properties of the Lentinula edodes mushroom*. Food and Nutrition Sciences, 5(2014):1095-1105. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2014.512119>
- García, D. (2013). *Más de 13 millones de toneladas de desechos de piña se podrían aprovechar en producción de energía (online)*. CRHoy. Recuperado de <http://www.crhoy.com/archivo/mas-de-13-millones-de-toneladas-de-desecho-de-pina-se-podrian-aprovechar-en-produccion-de-energia/ambiente/>
- Garita, R.A. (2014). *La Piña*. Editorial Tecnológica de Costa Rica. CR: Cartago
- González, L.A. (2012). *Costa Rica. Manual técnico para el manejo de rastrojos de piña*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Servicio Fitosanitario del Estado. San José, C.R. Recuperado de <https://canapep.com/download/manual-tecnico-para-manejo-rastrojos-en-el-cultivo-de-pin%CC%83a/>
- Guzmán, G., Mata, G. y Salmones, D. (2010). *El cultivo de los hongos comestibles: con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales*. México, D.F., MX: Instituto Politécnico Nacional, 2010. Recuperado de <http://site.ebrary.com/lib/biblioutnsp/reader.action?docID=10365713#>
- Hernández-Chaverri, R. y Prado-Barragán, A. (2018). *Impacto y oportunidades de biorrefinería de los desechos agrícolas del cultivo de piña (Ananas comosus) en Costa Rica*. Cuadernos de Investigación UNED (ISSN digital: 1659-441X) 10(2): 455-468.
- Isoda, N., Eguchi, Y. y Nukaya, H. (2009). *Clinical efficacy of superfine dispersed lentinan (beta-1,3-glucan) in patients with hepatocellular carcinoma*. Hepatogastroenterology 56(90):437-441. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19579616>

- Jay, J., Loessner, M. y Golden, D.A. (2009). *Microbiología moderna de los alimentos*, Zaragoza, ES: Editorial Acribia. <http://www.redalyc.org/pdf/559/55950806003.pdf>
- Longvah T. y Dosthale Y. (1998). *Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India*. Food Chemistry, 63:331-334
- Miller G, L. (1959). *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. Analytical Chemistry, 31(3):426-428.
- Ng, M.L. y Yap, A.T. (2002). *Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushrooms (Lentinus edodes)*. J Altern Complement Med. (National University of Singapore). 8 (5): 581-9. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12470439>
- Nimura, H., Mitsumori, N. y Takahashi, N. (2006). *S-I combined with lentinan in patients with unresectable or recurrent gastric cancer*. Gan to Kagaku Ryoho. 33(1):106-109. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16897983>
- NMX-AA-029-SCFI (2001). *Determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba*. Recuperado de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166773/NMX-AA-029-SCFI-2001.pdf>
- Nunes, R.G., Da Luz, J.M., Freitas, R., Higuchi, A., Kasuya, M.C. y Vanetti, M.C.J. (2012). *Selenium bioaccumulation in shiitake mushrooms: A Nutritional Alternative Source of this Element*. J Food Sci.,77(9):C983-6. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22900710>
- Queiroz, E., Cardoso, M., Regina H., y Eira, A.F. (2004). *Mineral supplementation and productivity of the shiitake mushroom on eucalyptus logs*. Scientia Agricola, 61(3):260-265. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162004000300003>
- Reol, E.M. (2003). *Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis*. Ecosistemas. Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente. 12(1):1-11. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/540/54012108.pdf>
- Rivera, O.A., Albarraçin, W. y Lares, M. (2017). *Componentes bioactivos del shiitake (Lentinula edodes (Berk.) Pegler) y su impacto en la salud*. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica, 36(3): 67-71 Recuperado de
- Román, P., Martínez, M.M., y Pantoja, A. (2013). *Manual de compostaje del agricultor: Experiencias de América Latina. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Santiago de Chile.
- Roncero, I. (2015). *Health and nutritional properties of mushrooms*. Groupement Européen des Producteurs de Champignons (European Mushroom Growers Group). Paris, Francia.
- Sadzawka, A. (2007). *Métodos de análisis de tejidos vegetales*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional de Investigación La Platina. Santiago de Chile.
- Salmones, D., Mata, G., Ramos, L.M., Waliszewski, K.N. (1999). *Cultivation of shiitake mushroom, Lentinula edodes, in several lignocellulosic materials originating from the subtropics*. Agronomie 19(1999):13-19.
- Shimizu, K., Watanabe, S. y Watanabe, S. (2009). *Efficacy of oral administered superfine dispersed lentinan for advanced pancreatic cancer*. Hepatogastroenterology 56(89):240-244. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19453066>
- Skoog, D., West, D., Holler, J. y Crouch, S. (2016). *Fundamentos de química Analítica*. México: Ediciones Paraninfo, S.A.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C. Sluiter, J. y Templeton, T. (2005a). *Determination of ash in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. Technical Report NREL/TP-510-42622.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. y Templeton, T. (2005b). *Determination of extractives in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. Technical Report NREL/TP-510-42619
- Solórzano, J.A., Treviño, J., Hidalgo, E., Gómez, Y., Blanco, H., Apuy, M., González, L. y Meneses, D. (2013). *Manual de recomendaciones para el manejo de la mosca del establo Stomoxys calcitrans en el cultivo de piña. Programa PITTA-PIÑA*. San Carlos, Costa Rica. Recuperado de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/H10-10547.pdf>

- Star-Colibri Project (2011). Joint European Refinery Vision for 2030. Recuperado de [http://gnip.ist.utl.pt/~gnip.daemon/images/docs/geral/Joint\\_vision\\_Biorefinery\\_2030.pdf](http://gnip.ist.utl.pt/~gnip.daemon/images/docs/geral/Joint_vision_Biorefinery_2030.pdf).
- Suzuki, M., Takatsuki, F., Maeda, Y.Y., Hamuro, J. y Chihara, G. (1994). *Antitumor and immunological activity of lentinan in comparison with LPS*. Int J Immunopharmacol. 16(5-6):463-468. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7927994>
- Taherzadeh, M.J., Kiklasson, C., Lidén, G., (2000), *Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on Saccharomyces cerevisiae*, Appl Microbiol Biotechnol 53:701-708.
- Turlo, J., Gutkowska, B., Kalucka, M. y Bujak, M. (2007). *Accumulation of zinc by the Lentinus edodes (Berk.) mycelium cultivated in submerged culture*. Acta Pol Pharm. 64(1):45-51. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17665850>
- UNESCO (1966). *Determination of photosynthetic pigments in sea-water*. París: UNESCO. Recuperado de <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000071612>
- Villegas, E.V., Pérez, A.M. y Arredondo, C. (2009). *Evaluación del crecimiento de Lentinula edodes en medios de cultivo sólidos para la producción de micelio como inóculo*. Revista Colombiana de Biotecnología. 9(2), 56-63.
- Yurkanis, P. (2008). *Química Orgánica*. Pearson Educación. México D.F.