



Universitat de Lleida

## Caracterización de compuestos bioactivos y efecto de la aplicación de Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo en setas cultivadas en La Rioja

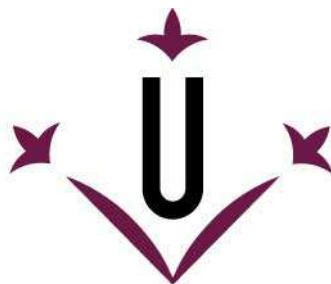
Mónica Mendiola Lanao

<http://hdl.handle.net/10803/456031>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat de Lleida**

**TESI DOCTORAL**

**CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS  
BIOACTIVOS Y EFECTO DE LA APLICACIÓN  
DE PULSOS ELÉCTRICOS DE MODERADA  
INTENSIDAD DE CAMPO EN SETAS  
CULTIVADAS EN LA RIOJA**

Mónica Mendiola Lanao

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de Lleida  
Programa de Doctorat en Ciència i Tecnologia Agrària i Alimentària

Directoras  
Olga Martín Belloso y Margarita Pérez Clavijo  
Tutora  
Olga Martín Belloso  
2017



## RESUMEN

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral fue la caracterización de setas cultivadas en La Rioja especialmente en lo relativo a su contenido de compuestos bioactivos y explorar el efecto que podría tener la aplicación de Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo (PEMIC) sobre dichos contenidos tanto aplicados en los sustratos de cultivo como en los cuerpos fructíferos. Para ello, se realizó una caracterización inicial de las setas cultivadas en las instalaciones del Centro Tecnológico del Champiñón en La Rioja (CTICH) mediante análisis de composición centesimal y energía, así como del contenido en fibra dietética,  $\beta$ -glucanos, quitosano y la actividad antioxidante de las setas seleccionadas.

Como los Pemic son una tecnología no térmica que permeabiliza la pared celular vegetal y fúngica, ello podría influir en la productividad y facilitar un aumento de concentración de compuestos bioactivos en las setas. Por ello, se aplicaron Pemic sobre el sustrato utilizado para el cultivo de setas comestibles y sobre los cuerpos fructíferos una vez recolectados, correspondientes a las setas más comercializadas y de mayor interés para el sector.

El estudio se realizó en 4 fases en las que se demostró la calidad nutricional de las setas, mostrando un alto valor en proteínas y bajo en grasas, y la potencialidad de los Pemic para aumentar la concentración de nutrientes, fibra dietética, y  $\beta$ -glucanos, así como su actividad antioxidante. Los valores obtenidos se compararon con sustratos o cuerpos fructíferos manejados convencionalmente sin ese tratamiento.

Los resultados obtenidos tras la aplicación de Pemic son muy prometedores ya que permitió un aumento de compuestos bioactivos, especialmente fibra dietética y actividad antioxidante, cuando se aplicó sobre los cuerpos fructíferos de *Agaricus bisporus*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii* y *Pleurotus ostreatus*.

Al aplicar los Pemic sobre el sustrato de *Pleurotus eryngii* se obtuvo un mayor rendimiento (30%) del cultivo pero no se apreciaron mejoras en la composición centesimal ni en los compuestos bioactivos. Sin embargo, en los paquetes de *Lentinula edodes*, aunque los Pemic no produjeron un aumento en la producción, aportaron a las setas una mayor cantidad de proteínas, fibra y  $\beta$ -glucanos (15,7%), y se disminuyó el contenido en grasas (14,8%). Además la actividad antioxidante se vio favorecida mostrando una positiva y alta correlación afirmando que la presencia de Fenoles Totales influye en la actividad antioxidante que se demostró tanto en la captación de radicales libres como en la transferencia de electrones.

El tratamiento 2kV/cm y 30 pulsos resultó ser excesivo en todos los parámetros estudiados al producirse un estrés en la célula dañándola debido a una permeabilización irreversible por los Pemic y no se encontraron diferencias entre aplicar 2 o 5 pulsos.

Estos primeros estudios deben ser ampliados y los mecanismos implicados estudiados en profundidad de cara a poder implementar industrialmente esta tecnología en las setas de forma que pueda aumentarse tanto su potencial saludable como los rendimientos de su cultivo.



## RESUM

L'objectiu principal de la present tesi doctoral va ser la caracterització de bolets cultivats a la Rioja, especialment pel que fa al seu contingut de compostos bioactius, i explorar l'efecte que podria tenir l'aplicació de Polsos Elèctrics de Moderada Intensitat de Camp (PEMIC) sobre aquests continguts aplicats tant en els substrats de cultiu com en els cossos fructífers. Per això, es va realitzar una caracterització inicial dels bolets cultivats a les instal·lacions del Centro Tecnológico del Champiñón (CTICH) mitjançant anàlisi de composició centesimal i energia, així com del contingut en fibra dietètica,  $\beta$ -glucans, quitosan i l'activitat antioxidant dels bolets seleccionats.

Com que els PEMIC són una tecnologia no tèrmica que permeabilitza la paret cel·lular vegetal i fúngica, això podria influir en la productivitat i facilitar un augment de concentració de compostos bioactius en els bolets. Per això, es varen aplicar PEMIC sobre el substrat utilitzat per al cultiu de bolets comestibles i sobre els cossos fructífers un cop recol·lectats, corresponents als bolets més comercialitzats i de major interès per al sector.

L'estudi es va realitzar en quatre fases en què es va demostrar la qualitat nutricional dels bolets, mostrant un alt valor en proteïnes i baix en greixos, i la potencialitat dels PEMIC per augmentar la concentració de nutrients, fibra dietètica, i  $\beta$ -glucans, així com la seva activitat antioxidant. Els valors obtinguts es varen comparar amb substrats o cossos fructífers manejats convencionalment sense aquest tractament.

Els resultats obtinguts després de l'aplicació de PEMIC són molt prometedors ja que va permetre un augment de compostos bioactius, especialment fibra dietètica i activitat antioxidant, quan es va aplicar sobre els cossos fructífers de xampinyó, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii* i *Pleurotus ostreatus*.

En aplicar els PEMIC sobre el substrat de *Pleurotus eryngii* es va obtenir un major rendiment (30%) del cultiu però no es varen apreciar millores en la composició centesimal ni en els compostos bioactius. No obstant això, en els paquets de *Lentinula edodes*, encara que els PEMIC no varen produir un augment en la producció, varen aportar als bolets una major quantitat de proteïnes, fibra i  $\beta$ -glucans (15,7%), i es va disminuir el contingut en greixos (14,8%). A més, l'activitat antioxidant es va veure afavorida mostrant una positiva i alta correlació afirmant que la presència de Fenols Totals influeix en l'activitat antioxidant que es va demostrar tant en la captació de radicals lliures com en la transferència d'electrons.

El tractament de 2 kV/cm i 30 polsos va resultar ser excessiu en tots els paràmetres estudiats en produir un estrès a la cèl·lula danyant-la a causa d'una permeabilització irreversible pels PEMIC i no es varen trobar diferències entre aplicar 2 o 5 polsos.

Aquests primers estudis han de ser ampliat i els mecanismes implicats estudiats en profunditat de cara a poder implementar industrialment aquesta tecnologia en els bolets de manera que pugui augmentar tant el seu potencial saludable com els rendiments del seu cultiu.



## SUMMARY

The main objective of this Doctoral Thesis was the characterization of mushrooms cultivated in La Rioja, especially in relation to their bioactive compounds content, and the exploration of the effect that applying Moderate Intensity Pulse Electric Field (MIPEF) to these bioactive compounds might have, both applied to the growing substrates as well as to the fruiting bodies. For this purpose, an initial characterization of the cultivated mushrooms was made in the facilities of the Mushroom Technological Center in La Rioja (CTICH) by analysing centesimal composition and energy, as well as the dietary fiber,  $\beta$ -glucans and chitosan content, and also the antioxidant activity of the selected mushrooms.

As MIPEF is a non-thermal technology that permeabilizes the vegetal and fungal cell wall, it could have an impact on the productivity and facilitate an increase in the bioactive compounds concentration in mushrooms. Therefore, MIPEF treatment was applied on the substrate used for the cultivation of edible mushrooms and on the fruiting bodies once collected, being those fruiting bodies the most commercialized mushrooms and those the mushroom's sector has a major interest in.

The study was carried out in four phases, demonstrating the nutritional quality of the mushrooms, showing a high protein and low fat value, and the potential of MIPEF to increase the nutrients concentration, dietary fiber, and  $\beta$ -glucans, as well as its antioxidant activity. The values obtained were compared with conventionally handled substrates or fruiting bodies without any applied treatment.

The results obtained after application of MIPEF are very promising since it allowed an increase in bioactive compounds, especially dietary fiber and antioxidant activity, when applied on the fruiting bodies of *Agaricus bisporus*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus*.

When the MIPEF treatment was applied to the substrate of *Pleurotus eryngii*, an increase in crop yield (30 %) was obtained but no improvements were observed neither in the centesimal composition nor in the bioactive compounds. However, in the *Lentinula edodes* bags, although the MIPEF did not produce an increase in production, the treatment contributed to increasing the protein, fiber and  $\beta$ -glucans contents in the mushrooms (15,7%), and the fat content was reduced (14,8%). In addition, the antioxidant activity was favored by showing a positive and high correlation: the presence of Total Phenols has an impact on the antioxidant activity. This was demonstrated both in free radical uptake and in electron transfer.

The treatment 2kV/cm and 30 pulses proved to be excessive in all the parameters studied. Stress occurred in the cell and the cell was damaged due to an irreversible permeability by the PEMIC. No differences were found between applying 2 or 5 pulses.

These first studies should be expanded and the mechanisms involved studied in depth in order to be able to industrially implement this technology in the mushrooms in a way that can increase both their healthy potential and the yields of their cultivation.





## INDICE

1	INTRODUCCIÓN .....	9
1.1	Taxonomía de los hongos .....	9
1.2	Cultivo de setas.....	13
1.3	Pulsos eléctricos .....	30
2	OBJETIVOS .....	43
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
3.1	Cultivo de las setas .....	45
3.2	Obtención de la semilla .....	46
3.3	Desarrollo de sustratos.....	46
3.4	Condiciones de cultivo.....	50
3.5	Tratamiento con pulsos eléctricos de moderada intensidad de campo	61
3.6	Preparación y análisis de las setas liofilizadas.....	64
4	CAPÍTULO I: COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LAS SETAS CULTIVADAS EN LA RIOJA	75
4.1	Composición centesimal.....	75
4.2	Fibra dietética.....	78
4.3	$\beta$ -glucanos.....	79
4.4	Quitosano .....	81
4.5	Actividad antioxidante.....	83
5	CAPÍTULO II: EFECTO DE PULSOS ELÉCTRICOS DE MODERADA INTENSIDAD DE CAMPO (PEMIC) APLICADOS AL CUERPO FRUCTÍFERO DE LOS HONGOS <i>AGARICUS BISPORUS</i> , <i>GANODERMA LUCIDUM</i> , <i>LENTINULA EDODES</i> , <i>PLEUROTUS ERYNGII</i> Y <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> .....	87
5.1	Composición centesimal.....	87
6	CAPÍTULO III: EFECTO DE LA APLICACIÓN DE PULSOS ELÉCTRICOS DE INTENSIDAD DE CAMPO MODERADA EN PAQUETES DE <i>LENTINULA EDODES</i> (SHIITAKE) Y CARACTERIZACIÓN DE SUS COMPUESTOS BIOACTIVOS .....	109
6.1	Producción.....	109
6.2	Composición centesimal.....	112
6.3	Fibra dietética.....	114
6.4	Glucanos .....	116
6.5	Actividad antioxidante.....	119
7	CAPÍTULO IV: EFECTO DE LA APLICACIÓN DE PULSOS ELÉCTRICOS DE MODERADA INTENSIDAD DE CAMPO EN PAQUETES DE <i>PLEUROTUS ERYNGII</i> Y CARACTERIZACIÓN DE SUS COMPUESTOS BIOACTIVOS .....	125
7.1	Producción.....	125
7.2	Composición centesimal.....	126
7.3	Fibra dietética.....	130
7.4	Glucanos .....	132
7.5	Actividad antioxidante.....	134
8	CONCLUSIONES.....	137
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139
10	ANEXOS.....	157

## ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Partes de una seta. ....	11
Figura 2. Arquitectura molecular de la célula y la pared celular fúngica.....	12
Figura 3. Producción de champiñón en Europa en 2015 (Tm).....	14
Figura 4. Producción anual de champiñón y setas en La Rioja en el año 2015 (Tm). ....	15
Figura 5. Etapas de la producción de hongos comestibles .....	17
Figura 6. Contenido proteico (g/100g) de algunos hongos respecto a hortalizas de consumo habitual .....	20
Figura 7. Contenido en carbohidratos (g/100g) de algunos hongos respecto a hortalizas de consumo habitual .....	22
Figura 8. Aporte energético (kcal) de algunos hongos respecto a hortalizas de consumo habitual.....	23
Figura 9. Cantidad de fibra (g/100g) de algunos hongos respecto a hortalizas de consumo habitual .....	25
Figura 10. Estructuras de a) quitina y b) quitosano. ....	27
Figura 11. Contenido de fenoles totales en diferentes hongos cultivados en La Rioja. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las distintas setas ( $p < 0,05$ ).....	30
Figura 12. Electroporación de la membrana de una celular mostrando las zonas de hinchamiento, lisis e inactivación celular .....	31
Figura 13. Creación de un campo eléctrico en la cámara de tratamiento.....	32
Figura 14. Intensidades de campo eléctrico necesarias para diferentes aplicaciones de los pulsos eléctricos.....	33
Figura 15. Tipos de pulsos utilizados. (A) Pulso de onda cuadrada; (B) Pulso de caída exponencial.....	34
Figura 16. Porcentaje de sacarosa obtenida tras 4 horas de extracción a diferentes temperaturas, con la aplicación de PEMIC (20 pulsos de onda cuadrada, 2 $\mu$ s, 1 Hz).....	35
Figura 17. Célula en un campo eléctrico (E). El área afectada por la electroporación se presenta en línea discontinua. (Ec: Intensidad crítica del campo eléctrico).....	36
Figura 18. Tratamientos de PEMIC y presión en champiñón. ....	39
Figura 19. Efecto de la estimulación de PEMIC en el hongo <i>Sparassis crispa</i> en fresco (a) y en seco (b).....	40
Figura 20. Efecto de la estimulación de los pulsos eléctricos en la producción de micelio y setas. ....	41
Figura 21. Efecto de la estimulación de los pulsos eléctricos en la producción de <i>Hypsizygus marmoreus</i> y <i>Pleurotus eryngii</i> . ....	41
Figura 22. Esquema general del cultivo de setas. ....	46
Figura 23.- Equipamiento e instalaciones de la planta piloto para la realización de sustrato de setas.....	47

Figura 24. Bolsas para cultivo: a) Bolsa Unicorn parte delantera; b) Bolsa Unicorn parte trasera.....	49
Figura 25. Sala de incubación en las instalaciones del CTICH. ....	49
Figura 26. Imágenes del cultivo de <i>Agaricus bisporus</i> . ....	50
Figura 27.- Imagen del cultivo de <i>Agaricus brunnescens</i> . ....	51
Figura 28. Imágenes del cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	52
Figura 29. Primordios y carpóforos de <i>Pleurotus eryngii</i> . ....	53
Figura 30. Carpóforos de <i>Agrocybe aegerita</i> .....	54
Figura 31. Carpóforos de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	54
Figura 32. Carpóforos y cuerpos fructíferos de <i>Hericium erinaceus</i> . ....	56
Figura 33. Primordios y carpóforos de <i>Hypsizygus tessulatus</i> . ....	57
Figura 34. Carpóforos de <i>Hypsizygus ulmarius</i> . ....	58
Figura 35. Detalle del “pop-corn” o “blistering” en los sacos de <i>Lentinula edodes</i> . ....	59
Figura 36. Primordios y carpóforos de <i>Lentinula edodes</i> . ....	59
Figura 37. Primordios y carpóforos de <i>Pholiota nameko</i> . ....	60
Figura 38. Carpóforos de <i>Pleurotus citrinopileatus</i> . ....	61
Figura 39. Esquema de la aplicación de PEMIC a paquetes de sustrato. ....	62
Figura 40. Panel de control y cámara de tratamiento del equipo PEF de la Universidad de Lérica. ....	63
Figura 41. Preparación de las setas para su liofilización. ....	64
Figura 42. Esquema de la determinación de Fibra dietética soluble (FDS), insoluble (FDI) y total (FDT). ....	67
Figura 43. Esquema de la determinación de quitosano. ....	70
Figura 44. Contenido de Fibra Dietética Total (FDT), Soluble (FDS) e insoluble (FDI)....	79
Figura 45. Contenido de Glucanos Totales como sumatorio de $\alpha$ -glucanos y $\beta$ -glucanos. ....	81
Figura 46: Recta patrón quitosano comercial. ....	82
Figura 47. Contenido en cenizas de los hongos tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ....	88
Figura 48. Contenido en grasas (g/100g) de los hongos tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ....	90
Figura 49. Contenido en proteínas (g/100g) de los hongos tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ....	91
Figura 50. Contenido en carbohidratos de los hongos tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ....	93
Figura 51. Contenido de energía de los hongos tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ....	94
Figura 52. Contenido Fibra Dietética Insoluble de las setas tratadas con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ....	95
Figura 53. Contenido Fibra Dietética Soluble de los hongos tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ....	96

Figura 54. Contenido Fibra Dietética Total de los hongos tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.....	97
Figura 55. Contenido en $\beta$ -glucanos de las setas tratadas con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.....	99
Figura 56. Contenido de Glucanos Totales de las setas a las que se aplicaron Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ....	100
Figura 57. Fenoles Totales de las setas cultivadas en La Rioja tratadas con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ( $\mu\text{g}$ EQ gálico/100mg). ....	101
Figura 58. Actividad antioxidante determinada mediante el radical DPPH de las setas cultivadas en La Rioja tratadas con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ( $\mu\text{mol}$ EQ trolox/100mg) .....	103
Figura 59. Actividad antioxidante determinada mediante el radical ABTS de las setas cultivadas en La Rioja tratadas con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ( $\mu\text{mol}$ EQ trolox/100mg) .....	104
Figura 60. Actividad antioxidante determinada mediante el radical FRAP de las setas cultivadas en La Rioja tratadas con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ( $\mu\text{mol}$ EQ trolox/100mg) .....	106
Figura 61. Paquetes de <i>Lentinula edodes</i> cinco días después de aplicar los tratamientos 0,3 kV/cm, 0,7kV/cm y 1kV/cm con 10 segundos de aplicación de los PEMIC....	110
Figura 62. Producción de <i>Lentinula edodes</i> en la primera florada (kg).....	111
Figura 63: Producción <i>Lentinula edodes</i> de la segunda y tercera florada. ....	111
Figura 64. Contenido de Fibra Dietética Insoluble (FDI) (g/100g) de <i>Lentinula edodes</i> obtenidas en los paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.....	114
Figura 65. Contenido de Fibra Dietética Soluble (FDS) (g/100g) de <i>Lentinula edodes</i> obtenidas en los paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.....	115
Figura 66. Contenido de Fibra Dietética Total (g/100g) de <i>Lentinula edodes</i> obtenidas en los paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.....	116
Figura 67. Contenido en $\alpha$ -glucanos en las setas producidas a partir de paquetes de <i>Lentinula edodes</i> tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.....	117
Figura 68. Contenido en $\beta$ -glucanos en las setas producidas a partir de paquetes de <i>Lentinula edodes</i> tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.....	118
Figura 69. Contenido en Glucanos Totales en las setas producidas a partir de paquetes de <i>Lentinula edodes</i> tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.....	119
Figura 70. Fenoles Totales en las setas producidas a partir de paquetes de <i>Lentinula edodes</i> tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ....	120

Figura 71. DPPH en las setas producidas a partir de paquetes de <i>Lentinula edodes</i> tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.....	121
Figura 72. ABTS en las setas producidas a partir de paquetes de <i>Lentinula edodes</i> tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.....	122
Figura 73. FRAP en las setas producidas a partir de paquetes de <i>Lentinula edodes</i> tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.....	123
Figura 74. Contenido en humedad de <i>Pleurotus eryngii</i> producida en sacos tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad.....	126
Figura 75. Contenido en cenizas de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ....	127
Figura 76. Contenido en grasas de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ....	128
Figura 77. Contenido en proteínas de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ....	129
Figura 78. Contenido en carbohidratos de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ....	129
Figura 79. Contenido en energía de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ....	130
Figura 80. Contenido en Fibra Dietética Insoluble (FDI) de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.....	130
Figura 81. Contenido en Fibra Dietética Soluble (FDS) de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.....	131
Figura 82. Contenido en Fibra Dietética Total (FDT) de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.....	132
Figura 83. Contenido en $\alpha$ -glucanos de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ....	132
Figura 84. Contenido en $\beta$ -glucanos de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ....	133
Figura 85. Contenido en Glucanos Totales, como la suma de $\alpha$ -glucanos y $\beta$ -glucanos de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.....	133

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de champiñón, seta ostra y shiitake y las recomendaciones de ingesta diarias. ....	18
Tabla 2. Campos de aplicación y usos del quitosano. ....	27
Tabla 3.- Nombre común, científico y abreviatura de las setas cultivadas en La Rioja. ....	45
Tabla 4. Características de producción de <i>Agaricus bisporus</i> en sus fases de cultivo. ...	51
Tabla 5. Características de producción de <i>Pleurotus ostreatus</i> en sus fases de cultivo. ....	52
Tabla 6. Características de producción de <i>Pleurotus eryngii</i> en sus fases de cultivo. ...	53
Tabla 7. Características de producción de <i>Agrocybe aegerita</i> en sus fases de cultivo. ...	54
Tabla 8. Características de producción de <i>Ganoderma lucidum</i> en sus fases de cultivo. ....	55
Tabla 9. Características de producción de <i>Hericium erinaceus</i> en sus fases de cultivo. ....	56
Tabla 10. Características de producción de <i>Hypsizygus tessulatus</i> en sus fases de cultivo. ....	57
Tabla 11. Características de producción de <i>Hypsizygus ulmarius</i> en sus fases de cultivo. ....	58
Tabla 12. Características de producción de <i>Lentinula edodes</i> en sus fases de cultivo. ...	59
Tabla 13. Características de producción de <i>Pholiota nameko</i> en sus fases de cultivo. ...	60
Tabla 14. Características de producción de <i>Pleurotus citrinopileatus</i> en sus fases de cultivo. ....	61
Tabla 15. Tratamientos de pulsos eléctricos de intensidad de campo moderada aplicados a los paquetes de <i>Pleurotus eryngii</i> y <i>Lentinula edodes</i> . ....	62
Tabla 16. Tratamientos de pulsos eléctricos de intensidad de campo moderada aplicados a los cuerpos fructíferos de las setas <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Lentinula edodes</i> y <i>Ganoderma lucidum</i> . ....	64
Tabla 17. Nombre científico, común y abreviatura de las setas producidas en La Rioja y caracterizadas para la realización de la Tesis Doctoral. ....	75
Tabla 18. Composición nutricional de setas cultivadas en La Rioja. <sup>a)</sup> ....	76
Tabla 19. Fibra dietética en setas cultivadas en La Rioja (g/100g peso seco). <sup>a)</sup> ....	78
Tabla 20. Glucanos en setas cultivadas en La Rioja (g/100 g peso seco). <sup>a)</sup> ....	80
Tabla 21. Cantidad de quitosano en las setas cultivadas en La Rioja (mg quitosano/g seta liofilizada). ....	82
Tabla 22. Actividad antioxidante ( $\mu\text{mol TE}/100 \text{ mg peso seco}$ ) y fenoles totales ( $\mu\text{g GAE}/100 \text{ mg peso seco}$ ) en setas cultivadas en La Rioja <sup>a)</sup> ....	84
Tabla 23. Producción de <i>Lentinula edodes</i> (g/paquete) en los paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo y porcentaje respecto al control. <sup>a) b)</sup> ....	109
Tabla 24. Composición centesimal de <i>Lentinula edodes</i> (g/100g) obtenidas en los paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. <sup>a) b)</sup> ....	112

Tabla 25. Producción de <i>Pleurotus eryngii</i> en paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. <sup>a) b)</sup> .....	125
Tabla 26. Fenoles Totales y actividad antioxidante determinada por los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP de <i>Pleurotus eryngii</i> producida a partir de paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. <sup>a)</sup> .....	134





# 1 INTRODUCCIÓN

---

Desde la antigüedad los hongos comestibles han sido apreciados y consumidos por los seres humanos no sólo como parte de la dieta, sino también como un manjar, ya que su sabor, textura y aroma hacen de estos un alimento muy apetecible. Ciertos escritos antiguos han mencionado su importancia medicinal; en el antiguo Egipto los hongos eran reservados sólo a la realeza, en la cultura romana se consideraban alimento de los dioses y proporcionaban fuerza a los guerreros y en China es de sobra conocida la importancia de la cultura medicinal y nutricional que representan los hongos considerándolos el elixir de la vida. (Mattila 2000).

Además, se valoran sus propiedades químicas y nutricionales (Manzi 1999), e incluso terapéuticas, muy útiles en la prevención de enfermedades (Bobek y Galbavy, 1999). En lo que respecta al uso de estos hongos en medicina, se han aislado compuestos activos tales como: polisacáridos, terpenoides, complejos de péptido-polisacáridos y proteínas, los cuales son utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades (Sheu et al., 2004) como hipertensión, hipercolesterolemia y cáncer (Bobek y Galbavy, 1999 y Wasser 2002) demostrando actividad antitumoral, inmunomoduladora, hipoglucemiante, antimicrobiana y antioxidante, entre otras (Yeon et al., 2008; Jiménez et al., 2008; Tadaaky et al., 2008). Algunas de estas características funcionales se deben a la presencia de fibra dietética y, en particular, de quitina y  $\beta$ -glucanos, en la pared celular de los hongos (Manzi 1999 y 2000). Además, los hongos se pueden usar en una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas y ambientales, (Asatiani et al., 2008), por ejemplo para la producción de enzimas, como la enzima fitasa (Pandey et al., 2001 y 2003) o enzimas celulolíticas a partir de *Pleurotus florida*, (Goyal y Soni, 2011), suplementos dietéticos (Pelaes Vital et al., 2015 y Hozová et al., 2004, con *Pleurotus ostreatus* en yogur), compuestos fisiológicamente activos (Souilem et al., 2017) y biorremediación (Rani et al., 2014, Anastasi et al., 2010).

El reino de los hongos se caracteriza por una elevada biodiversidad aunque no se sabe con exactitud cuántas especies de hongos existen en la Tierra. De acuerdo con las estimaciones actuales, las setas silvestres tienen una distribución mundial, constituyendo al menos 12.000 especies, de las que 2.000 han sido catalogadas como comestibles y de entre ellas, cerca de 35 especies, debido a los avances en el desarrollo de técnicas de cultivo innovadoras, son producidas y comercializadas durante todo el año. (Beulah et al., 2013).

## 1.1 Taxonomía de los hongos

Los hongos son organismos unicelulares o pluricelulares que no realizan la fotosíntesis, son heterótrofos presentando una mezcla de características entre animales y vegetales. Al igual que ocurre en los animales, su reserva energética es el

glucógeno. Sus células están recubiertas por una membrana constituida por un polisacárido, la quitina (N-acetil-D-glucosamina).

La taxonomía del reino de los hongos ha generado debate durante muchos años y todavía hay diferentes interpretaciones siguiendo distintos criterios para su clasificación. Una de las clasificaciones los separa en Oomicetos, Quitridiomicetos, Zigomicetos, Ascomicetos y Basidiomicetos, siendo éstos últimos los hongos más evolucionados. (Ruthes et al., 2016).

a) Los ascomicetos o Ascomycota. Son hongos con micelio tabicado que producen ascosporas endógenas. Pueden ser parásitos de plantas, animales y humanos. Entre los más sencillos, destacan las levaduras responsables de la fermentación.

b) Los basidiomicetos, también llamados macromicetos, producen basidios con basidiosporas en el extremo de las hifas, donde se forman las esporas de origen sexual, siendo esta su forma usual de reproducción. La reproducción asexual se da en los basidiomicetos menos evolucionados (Strasburger 1986). Esta clase incluye a los hongos macroscópicos como las setas, hongos tóxicos, alucinógenos y fitopatógenos. Se estima que la diversidad de hongos supera a la de las plantas en un ratio de 10:1 (Blackwell, 2011).

Este tipo de hongos presentan gran variedad de formas, tamaños, colores y aromas (Statements, 1983). La mayoría de las especies forman una estructura macroscópica donde las células se agrupan en filamentos llamados hifas. Su conjunto constituye el micelio, el cual, representa la fase vegetativa de los hongos y asegura su nutrición absorbiendo las sustancias minerales del medio para el desarrollo de los órganos de reproducción. El objetivo es originar pseudo-tejidos denominados cuerpos fructíferos o setas, diferenciándose de otros hongos ya que producen esporas llamadas basidiosporas en una estructura microscópica llamada basidio. (Alexopoulos, 1962).

El cuerpo fructífero de los basidiomicetos tiene una forma muy característica y consta de sombrero y pie (figura 1). La parte exterior superior del sombrero está recubierta por una cutícula y la parte más interna abierta hacia abajo, el himenio, contiene laminillas formadas por millones de basidios microscópicos donde se producen las basidiosporas. En el pie del cuerpo fructífero se pueden distinguir el anillo o velo y que en realidad son los restos de la cutícula que mantenía el himenio cerrado y protegido durante su desarrollo y que se rompe cuando las esporas están maduras y listas para su dispersión. En la base del pie de algunas especies se puede distinguir la volva que en realidad es una estructura de protección temporal durante el desarrollo del cuerpo fructífero de donde surge éste y que comunica directamente con el micelio (Mendivil 1996).

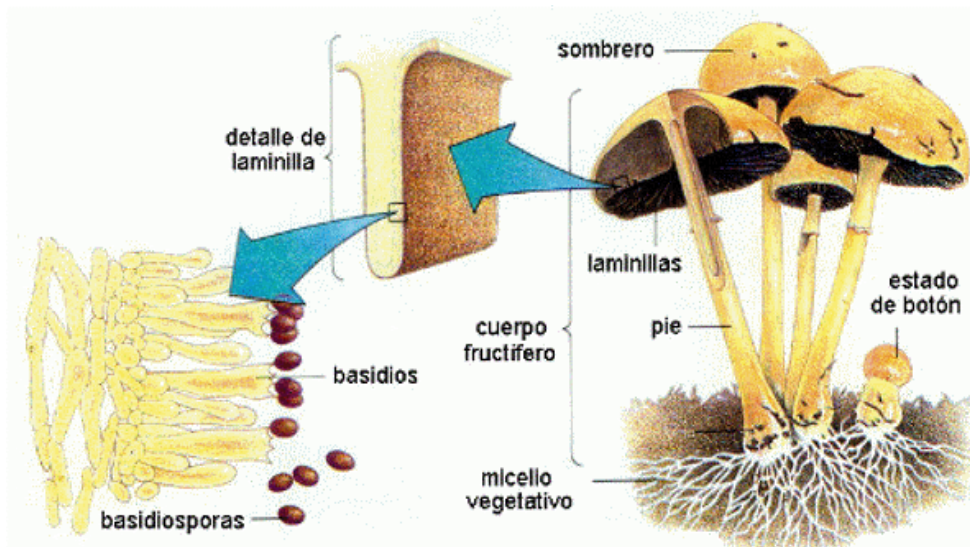


Figura 1. Partes de una seta.  
(Tesis Arango 2010)

La pared celular de las setas es una estructura relativamente rígida, pero dinámica, que participa en varios procesos biológicos esenciales para la célula (Duran y Nombela, 2004). La composición química de la pared celular es bastante compleja, está formada por carbohidratos, proteínas, polisacáridos, lípidos, pigmentos y sales minerales en orden decreciente. Las proteínas generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas. Entre los polisacáridos, (figura 2), destacan la quitina, el quitosano y los  $\beta$ -glucanos (Alquini et al., 2004).

El quitosano es producido por deacetilación de la quitina y muestra una actividad antimicrobiana excelente contra bacterias Gram positivas y negativas. (Chien et al., 2016). Además, la quitina y el quitosano son biodegradables, biocompatibles, analgésicos, y muestran actividad anticolesterolemica, anticancerígena y antioxidante. (Aranaz et al., 2009). Debido a la variedad de propiedades biológicas que poseen, son utilizados en una gran variedad de industrias; cosmética, tratamiento de aguas, textil, procesamiento de alimentos, alimentación saludable, agricultura... (Aranaz et al., 2009; Dutta et al., 2004).

Las setas son también una fuente interesante de compuestos funcionales de fibra dietética, los  $\beta$ -glucanos, grupos de polisacáridos compuestos por unidades de glucosa unida a enlaces glicosídicos. (Mongkontanawat y Wongekalak 2015). Los  $\beta$ -glucanos poseen propiedades medicinales como antitumoral, antimicrobiana y antioxidante (Manzi y Pizzoferrato, 2000; Chen y Seviour, 2007), estimulan la respuesta inmune en animales y reducen los niveles de colesterol y glucosa en sangre (Nicolosi et al., 1999).

Todos estos componentes están asociados entre sí dando lugar a una estructura rígida y su contenido puede variar según la fase morfológica de crecimiento y la especie del hongo.

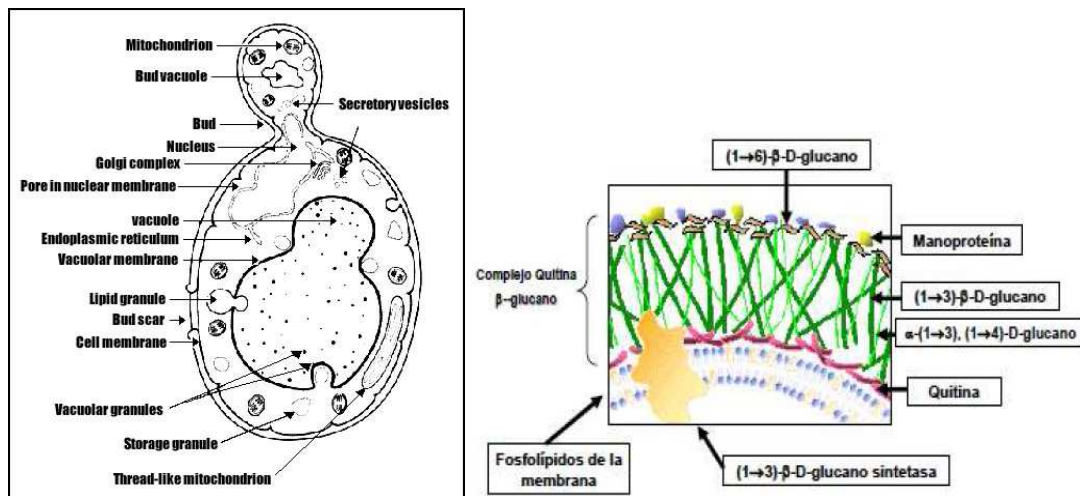


Figura 2. Arquitectura molecular de la célula y la pared celular fúngica.  
(Fuente: Diamond 1999)

La reproducción puede ser sexual (por unión de hifas de sexos opuestos) o asexual (por medio de esporas). También pueden multiplicarse por descomposición del micelio en células aisladas denominadas conidios.

La evaluación de la actividad biológica de los basidiomicetos puede realizarse utilizando su cuerpo fructífero recolectado en el campo, denominado comúnmente seta, o cultivando el basidiomiceto in vitro, y empleando ya sea el micelio o el cuerpo fructífero (Santos et al., 2008). Las condiciones ambientales son determinantes en la formación del cuerpo fructífero, éste es un proceso sensible, influenciado por muchos factores; como la luz, la temperatura, las concentraciones de dióxido de carbono en el ambiente, la humedad, la salinidad y el pH. La composición del medio de crecimiento también influye en la fructificación. Estos parámetros son altamente específicos para cada especie (Wessels, 1993; Kües y Liu, 2000).

## 1.2 Cultivo de setas

### 1.2.1 Situación del sector de las setas cultivadas 2015/16

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en el mundo se cultivan más de 60 especies diferentes de setas, 35 de ellas a escala comercial, de las cuales, el 70% corresponde a: champiñón (*Agaricus bisporus*), shiitake (*Lentinula edodes*) y seta de ostra (*Pleurotus ostreatus* pp.).

El champiñón es uno de los productos agrícolas más “globales” del planeta, ya que su cultivo se realiza en los cinco continentes. Con una producción mundial aproximada de 2.6 millones de Tm, de los que Europa produce 1.2 millones de Tm., África, América y Oceanía, dedican su producción fundamentalmente a consumo propio en formato de champiñón fresco, y son Asia, especialmente China, y Europa los que además de suministrar champiñón fresco, dedican una parte importante de su producción a la industria conservera, con la que abastecen el mercado propio y además se convierten en los dos mayores suministradores de champiñón en conserva al resto del mundo.

A fecha de hoy, la Unión Europea tiene una producción superior a su demanda, de la que la parte correspondiente a champiñón fresco (66%) es consumida casi en su totalidad dentro de sus fronteras y en Rusia. El resto (34%) es dedicado a la industria, fundamentalmente a conserva, destacando Holanda, Francia y España que tienen la estructura conservera más importante de Europa. (GEPC, 2016)

La demanda de hongos ha ido en aumento debido al reconocimiento de sus propiedades medicinales y nutricionales. Los hongos están ganando popularidad entre los consumidores, cada vez más demandantes de una alimentación saludable, ya que son una rica fuente de nutrientes con bajo contenido en grasa, sodio y colesterol.

En Europa, la producción de champiñón representa el 90% del total de setas con 1.110.500 toneladas producidas en 2015/2016. El volumen de negocios de esta especie es de 1.470 millones de euros, lo que supone unos 50.000 puestos de trabajo. Las regiones productoras principales de Europa son, por este orden, Hors (Países Bajos), Polman (Polonia) La Rioja y Castilla-La Mancha (España), Loira (Francia), Veneto (Italia) y Monagan (Irlanda), que representan el 78% de la producción europea total.

Hace 25 años, en España la única seta cultivada era el champiñón, pero poco a poco algunos cultivadores empezaron a desarrollar el cultivo de la especie *Pleurotus* con una excelente aceptación en el mercado.

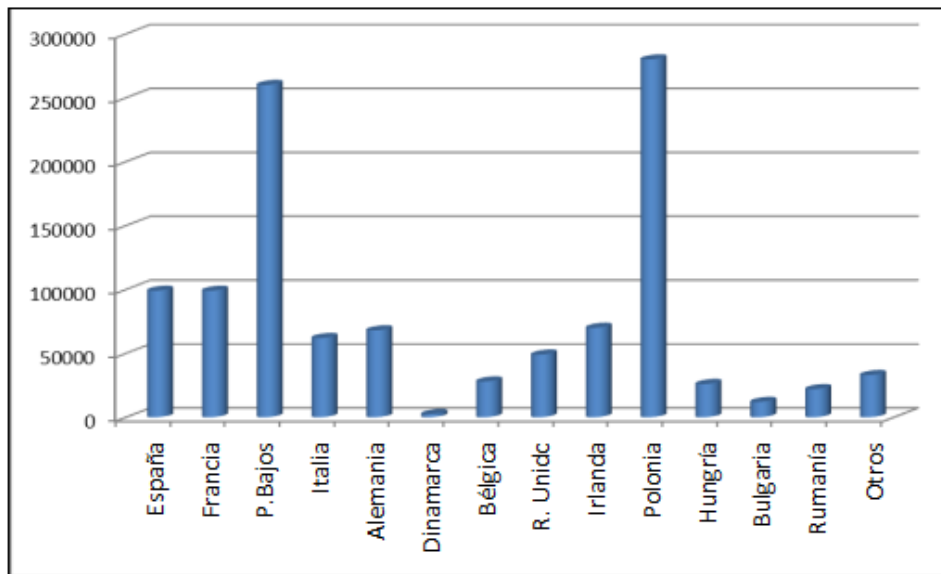


Figura 3. Producción de champiñón en Europa en 2015 (Tm).  
(Fuente: GEPC, 2016)

La producción de otro tipo de hongos exóticos (*Pholiota nameko*, *Pleurotus eryngii* o *Lepista nuda*) sigue siendo residual y poco significativa. La producción de setas (denominadas en general *Pleurotus* spp.) fue, en 2015, de 15.628 Tm a nivel nacional (el 26% son producidas en La Rioja), la producción de shiitake fue de unas 350 Tm (el 90% se produce en La Rioja) y se produjeron aproximadamente 10 toneladas de otros hongos exóticos. (Datos propios ASOCHAMP: Asociación de Productores de Sustratos y Hongos de La Rioja, Navarra y Aragón)

A nivel nacional, La Rioja es la primera comunidad productora de champiñón con el 60% de la producción, unas 72.000 Tm en la campaña 2015/2016, así como 7.000 Tm de setas, siendo el segundo producto agrario después del vino. Actualmente, en La Rioja se cultivan principalmente tres especies de hongos, champiñón con un 90 % de la producción, seta ostra con un 9,5 % y shiitake, con apenas un 0,5%. (Datos propios ASOCHAMP)

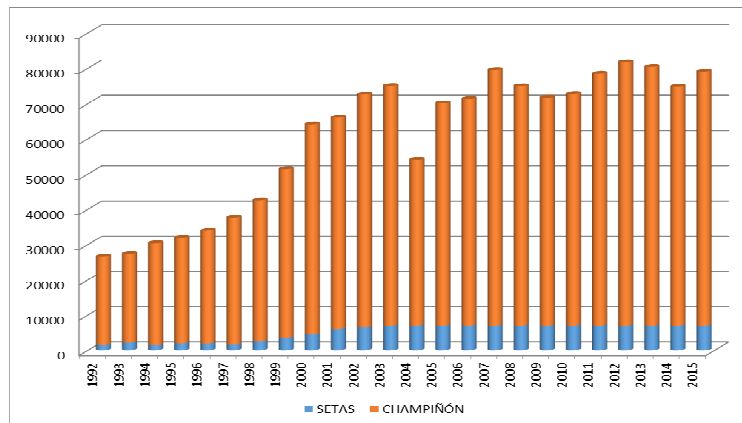


Figura 4. Producción anual de champiñón y setas en La Rioja en el año 2015 (Tm).  
(Fuente: Datos propios ASOCHAMP)

Aproximadamente el 75% del total de la producción de champiñón, se destina a la industria conservera y el 25% restante se dedica al mercado en fresco. En Castilla la Mancha, el segundo productor a nivel nacional, esta relación es justo a la inversa, destinando la mayor parte de su producto al fresco.

### 1.2.2 Etapas de producción de setas

La producción de setas es compleja ya que depende de cada especie y de sus requerimientos específicos, pero de manera general se pueden distinguir dos etapas principales, una de producción de tejidos, encaminada a la producción del inóculo, y otra que constituye la producción del producto final, los carpóforos (figura 4).

En primer lugar, se deposita un fragmento del carpóforo dentro de tubos de ensayo con un medio de cultivo apropiado, el más utilizado es PDA (Patata, dextrosa y agar). Esta etapa es la más delicada del proceso ya que se necesitan condiciones de asepsia (estériles), en ella se obtiene el micelio para que los hongos pueden multiplicarse de manera asexual a partir un trozo del carpóforo y con ello iniciar el ciclo completo del hongo. El cultivo puro de la cepa se obtendrá a partir de repetidas transferencias del micelio a placas Petri con medio de cultivo fresco.

Posteriormente se siembra en granos estériles, los más usados son de trigo o cebada (Kumar 1995), con características óptimas para su multiplicación y colonización del sustrato definitivo, actuando como material portador del micelio

Para que las setas puedan fructificar necesitan un sustrato con unas propiedades físico-químicas determinadas (nutrientes disponibles, acidez, actividad microbiana que soporta, capacidad de aeración, contenido de agua, etc) ya que algunos hongos pueden usar un amplio rango de sustratos y otros son muy selectivos. Si los nutrientes de un sustrato están fácilmente accesibles para el hongo, la producción será mayor, sin embargo, el riesgo de contaminación también. (Stamets, 1993). Se suelen utilizar



materiales lignocelulósicos dependiendo de su disponibilidad en las diferentes regiones: pajas de gramíneas, las más utilizadas en Europa son trigo, cebada, avena y maíz, y a nivel mundial también se utilizan pulpa de café, bagazo de caña, olotes de maíz, fibra de coco, etc.

Una vez preparado el sustrato, se procede a su inoculación o siembra, mezclándolo con el inóculo e introduciéndolo en bolsas, tocones de árboles o bandejas, donde crecerá el micelio y surgirán finalmente los carpóforos. La cantidad de inóculo a utilizar depende de la especie que se quiera producir, pero generalmente se calcula en base al peso húmedo del sustrato a utilizar, que suele oscilar entre 2 y 10 % de su peso húmedo. (Stamets y Chilton 1983). Para que el sustrato sea colonizado por el hongo se incuban con unas condiciones óptimas de temperatura, luminosidad, ventilación y humedad, dependiendo de la especie. (Rai 2003). El área de incubación debe ser un ambiente aséptico con estanterías para colocar los contenedores, y si alguno presenta coloraciones y olores extraños, deben sacarse inmediatamente de la sala de incubación para evitar contaminaciones.

Una vez el micelio ha colonizado completamente el sustrato, se cambian las condiciones ambientales de la fase de incubación para inducir el brote y crecimiento de los primordios, que inician la fase de fructificación. Durante esta etapa, la aplicación de riego es importante para mantener alto porcentaje de humedad en el ambiente (Upadhyay y Sing, 2010). Cuando los carpóforos han alcanzado un estado de madurez fisiológica se procede a la recolección eliminando los restos del sustrato y cortando parte de pie. Es importante establecer buenas prácticas de manipulación durante el proceso de producción y principalmente en la manipulación de los carpóforos. (Chang y Miles, 2004)

La comercialización e industrialización de hongos implica diversas alternativas de procesamiento: Frescos (enteros y laminados), deshidratados (enteros, laminados o transformados en polvo), en conserva, encurtidos (en sal, azúcar y vinagre), fermentados, en salmuera, en aceite (de oliva o vegetal), congelados, extractos y concentrados.

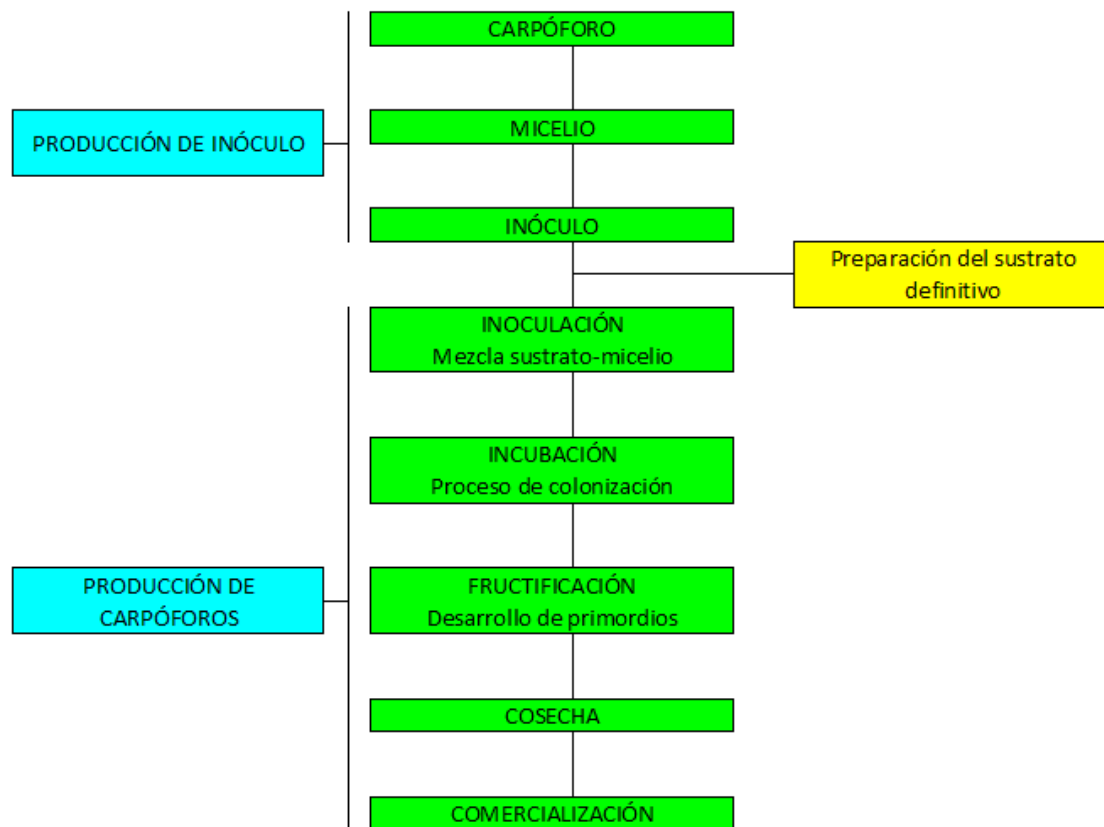


Figura 5. Etapas de la producción de hongos comestibles

### 1.2.3 Composición química de las setas

El conocimiento de la composición química de los hongos es importante para promover su aprovechamiento (Mohacek-Grosev et al., 2001). El champiñón y las setas son alimentos con unas propiedades nutricionales muy apreciadas. Destaca el bajo aporte calórico que tienen debido a su gran contenido en agua (80%-90%), entre 26-35 kcal por cada 100 gramos. Además son una buena fuente de proteínas con una composición en aminoácidos más parecida a la proteína animal que a la vegetal, siendo el complemento ideal para dietas vegetarianas. En general, la composición en peso seco está formada por carbohidratos, presentes en mayor concentración, (entre 51 y 88), seguidos de proteínas (25%) y lípidos (5%), siendo lo restante considerado como cenizas (10%), (Santos, 2000). A esto se le añade su alto contenido en fibra, que sumado a su bajo aporte graso, aportan las características deseables para una alimentación saludable.

En cuanto a los microelementos, los hongos son una fuente importante de vitaminas como tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, vitaminas del grupo B, sobre todo B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub>, y de precursores de vitamina D como el ergosterol que favorecen la absorción de calcio y de fósforo (Barros et al., 2007 y Mattila et al., 2000). Contienen también minerales esenciales para el correcto funcionamiento del organismo humano,

principalmente selenio, fósforo y potasio (Manzi et al., 2001). Su contenido en sodio es muy bajo lo que permite utilizar estos productos para dietas con menor contenido en sal. En la tabla 1 se muestra la composición nutricional de champiñón, seta ostra y shiitake según la USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2016).

Tabla 1. Composición nutricional de champiñón, seta ostra y shiitake y las recomendaciones de ingesta diarias.

	Champiñón*	Pleurotus*	Shiitake*	Ingesta Diaria Recomendada Hombres	Ingesta Diaria Recomendada a Mujeres
Energía (kcal)	22	33	34	3000	2300
Proteínas (g)	3,09	3,31	2,24	54	41
Lípidos totales	0,34	0,41	0,49	<100	<77
AG saturados	0,05	0,062	-	<23	<18
AG monoinsat.	0	0,031	-	>57	>43
AG poliinsat. (g)	0,16	0,123	-	10-20	8-15
Colesterol (mg)	0	0	0	<300	<230
Hidratos de C	3,26	6,09	6,79	375-450	288-345
Fibra (g)	1,0	2,3	2,5	38	29
Agua (g)	92,45	89,18	89,74	1000-2000	1000-2000
Calcio (mg)	3	3	2	800	800
Hierro (mg)	0,50	1,33	0,41	10	18
Magnesio (mg)	9	18	20	350	330
Zinc (mg)	0,52	0,77	1,03	15	15
Sodio (mg)	5	18	9	<2400	<2400
Potasio (mg)	318	420	304	3500	3500
Fósforo (mg)	86	120	112	700	700
Selenio (µg)	9,3	2,6	5,7	70	55
Tiamina (mg)	0,081	0,125	0,015	1,2	0,9
Riboflavina	0,402	0,349	0,217	1,8	1,4
Niacina (mg)	3,607	4,956	3,877	20	15
Vitamina B6	0,104	0,11	0,293	1,8	1,6
Ácido fólico (µg)	0	0	0	400	400
Vitamina B12	0,04	0	0	2	2
Vitamina C (mg)	2,1	0	0	60	60
Vitamina A (µg)	0	2	0	1000	800
Vitamina D (µg)	0,2	0,7	0,4	5	5
Vitamina E (mg)	0,12	0	0	12	12

\* (Por 100g de porción comestible). Ingesta Diaria Recomendada. (Moreiras et al., 2004).

Como se observa en la Tabla 1, la información nutricional de las tres setas muestra que pueden considerarse alimentos saludables gracias a su alto contenido en agua, fibra y proteínas y bajo aporte calórico, contenido en lípidos y sin presencia de colesterol. La seta ostra y shiitake aportan mayor cantidad de nutrientes que el champiñón, en especial, en contenido en hierro, fósforo y potasio y en las vitaminas riboflavina, niacina y vit B6. Sin embargo, el champiñón aporta cantidades menores pero destaca selenio y en vitaminas B12 y C y E, elementos que las otras dos no presentan en su composición. La Ingesta Diaria Recomendada mantiene unos márgenes que permiten su consumo como buenos complementos para la dieta.

A continuación se exponen con más detalle los componentes principales de las setas:

#### **1.2.3.1 Humedad**

Los hongos comestibles tienen un porcentaje muy alto de humedad (81,8-94,8%). La variabilidad depende de la especie del cultivo, condiciones de crecimiento y de almacenamiento, etc. (Manzi et al., 1999).

Los hongos son alimentos con alto poder saciante y con baja densidad energética, que es la relación entre las calorías y el volumen de un alimento. El alto contenido de humedad que tienen, junto con las proteínas y la fibra, está con relacionado con la sensación de saciedad que confieren y como además aportan muy pocas calorías, son un producto muy útil para dietas hipocalóricas.

#### **1.2.3.2 Lípidos**

Los hongos son, en general, bajos en grasa (menos del 5% en peso seco). Los factores ambientales que influyen en el contenido de lípidos en las setas pueden ser las condiciones de crecimiento, concentración de oxígeno, temperatura y la naturaleza del sustrato (Pedneault et al., 2007). El contenido en ácidos grasos insaturados es predominante en los hongos siendo el ácido linoleico el presente en mayor proporción (Diez y Álvarez, 2001). Éste, junto al ácido linoleico, son ácidos grasos esenciales para el ser humano y, ya que nuestro organismo no los sintetiza, debemos ingerirlos con los alimentos.

Según el trabajo de Reis et al., (2012a), en el que realizó un estudio comparativo de diferentes setas cultivadas, se concluyó que el shiitake es la que tiene los mayores niveles de poliinsaturados y menor cantidad de saturados que el resto de los hongos estudiados. Las especies del género *Pleurotus* tienen un perfil de ácidos grasos muy similar y destacan por ser las que más ácidos grasos monoinsaturados presentan.

#### **1.2.3.3 Proteínas**

El contenido proteico de los hongos oscila entre 15 y 35% de peso seco, dependiendo de las especies, de las variedades y de la etapa de desarrollo del cuerpo fructífero (Manzi et al., 2004; Diez y Álvarez, 2001). La digestibilidad proteica de los

champiñones y setas en general es bastante buena, para *P. ostreatus* y *L. edodes* es 73,4% y 76,3%, respectivamente (Adewusi et al., 1993; Dabbour y Takturi, 2002).

El champiñón, a diferencia de las hortalizas, contiene todos los aminoácidos esenciales (Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val), que son aquellos que el cuerpo humano no puede generar por si solo y tiene que ingerirlos con la dieta. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los champiñones son especialmente ricos en ácido glutámico, ácido aspártico y arginina; los aminoácidos que presentan menor cantidad en el champiñón son metionina y cisteína (Manzi et al., 1999). El género *Pleurotus* parece ser el que mayor calidad proteica presenta, algunas de las variedades de este género tiene una buena distribución tanto de aminoácidos esenciales como de no esenciales (Dundar et al., 2008; Patil et al., 2010).

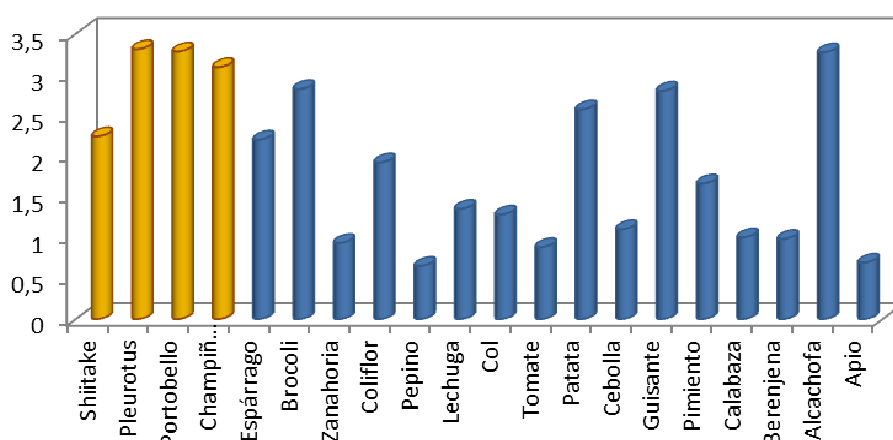


Figura 6. Contenido proteico (g/100g) de algunos hongos respecto a hortalizas de consumo habitual (Fuente: U.S.D.A, 2016).

Según la Organización de Agricultura y Alimentación (FAO), la calidad proteica de los hongos es mejor que la de la mayoría de los vegetales (FAO, 1981). La composición en aminoácidos de las proteínas de los hongos es similar a la de la proteína animal, lo cual es importante hoy en día para contrarrestar un alto consumo de alimentos proteicos de origen animal, sobre todo en los países desarrollados (Guillamon et al., 2010).

#### 1.2.3.4 Minerales

Los minerales son elementos químicos imprescindibles para el normal funcionamiento metabólico de nuestro organismo. Los nutrientes minerales desempeñan funciones estructurales y/o metabólicas esenciales. La dieta debe aportarlos en cantidades suficientes, pero no excesivas, para cubrir sus requerimientos y en forma disponible para que las necesidades puedan ser satisfechas.

Algunos se requieren en cantidades superiores a 100 miligramos por día (calcio, fósforo, sodio y potasio) y otros se necesitan en cantidades menores que son los llamados oligoelementos (hierro, flúor, yodo, cobre, cinc, selenio, etc.).

El contenido de minerales en los hongos varía entre 6 y 11% sobre materia seca según la especie, por ejemplo, *Pleurotus ostreatus* tiene 6,90%, *Pleurotus eryngii* 8,60%, *Lentinula edodes* 5,85% y *Hericiium erinaceus* 9,35%.

Comparado con los vegetales, los hongos contienen una cantidad razonable de minerales (Manzi et al., 1999). Los macroelementos que más abundan en los hongos cultivados son calcio, fósforo, potasio y magnesio y de los microelementos destacan cobre, selenio, hierro y cinc. (Cheung, 2008).

Algunos de los hongos cultivados más comunes, *A. bisporus*, *P. ostreatus* y *L. edodes*, entre otros, son ricos en potasio (2670-4730 mg/100g s.m.s.) y se consideran una buena fuente de fósforo (493-1390 mg/100g s.m.s.), magnesio (20-200 mg/100g s.m.s.), cinc (4,70-9,20 mg/100g s.m.s.) y cobre (0,52-3,50 mg/100g s.m.s.) (Cheung, 2008).

#### **1.2.3.5 Vitaminas**

Las vitaminas son compuestos orgánicos que al ingerirlos de forma equilibrada y en dosis esenciales promueven el correcto funcionamiento fisiológico. La mayoría de las vitaminas esenciales no pueden ser sintetizadas por el organismo, por lo que éste solo puede obtenerlas a través de la ingesta de alimentos. Los hongos se consideran una buena fuente de vitaminas, sobre todo de riboflavina (B<sub>2</sub>), niacina (B<sub>3</sub>) y folatos (B<sub>9</sub>) que son aquellas que contienen en mayor cantidad.

Mattila et al., (2001) ha publicado algunos datos sobre el contenido de varias vitaminas en hongos cultivados, la concentración oscila entre 1,8 a 5,1 mg/100 g s.m.s para riboflavina, de 31 a 65 mg/100 g s.m.s para niacina y 0,30 a 0,64 mg/100 g s.m.s para folatos.

Las vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>12</sub> y C también están presentes en los hongos aunque en menor cantidad (Mattila et al., 2002). El contenido de vitamina B<sub>1</sub> o tiamina en hongos oscila aproximadamente entre 0,60 y 0,90 mg/100 g s.m.s. En el caso de la vitamina B<sub>12</sub> la cantidad presente es mucho menor, entre 0,60 y 0,80 µg/100 g s.m.s, aun así los hongos contienen más B<sub>12</sub> que los vegetales ya que éstos apenas contienen esta vitamina.

#### **1.2.3.6 Hidratos de carbono**

El contenido total de carbohidratos de las setas, incluyendo hidratos de carbono digeribles y no digeribles, varía con la especie desde 35% a 70% del peso seco (Díez y Alvarez, 2001; Mau et al., 2001). Los tipos de carbohidratos digeribles que están presentes en los hongos son: manitol (0,3-5,5% en materia seca (s.m.s.) (Vaz et al., 2011), glucosa (0,5-3,6% s.m.s.) (Kim et al., 2009) y glucógeno (1-1,6% s.m.s.) (Díez y Alvarez, 2001). Los carbohidratos no digeribles incluyen oligosacáridos y polisacáridos no amiláceos tales como quitina, β-glucanos y mananos, que representan la mayor porción de carbohidratos de los hongos.

Según la bibliografía, el nivel de carbohidratos varía entre las diferentes especies de setas. Reis et al (2012a) realizaron un estudio de la composición nutricional de los hongos cultivados más consumidos a nivel mundial. Los resultados mostraron que la seta shiitake (17,62 g/100g) es la que presenta mayor cantidad de carbohidratos totales comparada con el champiñón (5,98 g/100g), con la seta de ostra (9,30 g/100g) y con la seta de cardo (8,95 g/100g).

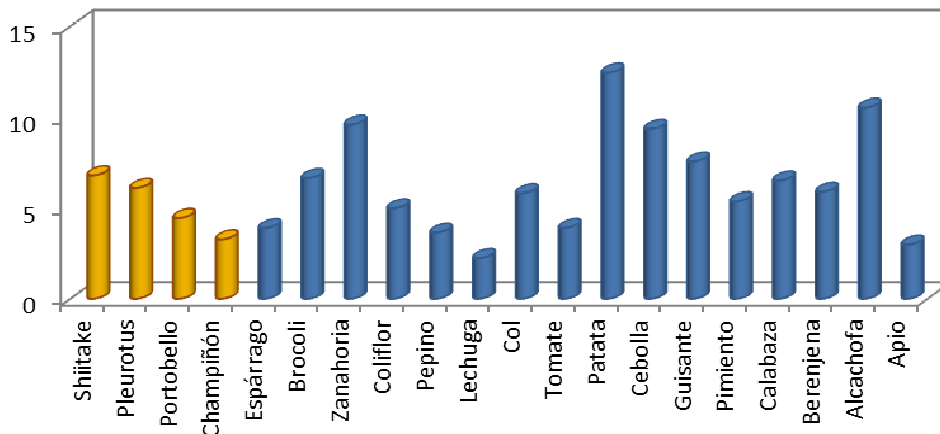


Figura 7. Contenido en carbohidratos (g/100g) de algunos hongos respecto a hortalizas de consumo habitual (Fuente: U.S.D.A., 2016).

### 1.2.3.7 Aporte energético

El aporte calórico es la energía suministrada al cuerpo por los alimentos y se obtiene de la oxidación de hidratos de carbono, grasas y proteínas. La cantidad de calorías de cada macronutriente es:

1 gramo de grasa = 9 kcal

1 gramo de proteína = 4 kcal

1 gramo de hidratos de carbono = 4 kcal

Los hongos proporcionan aproximadamente entre 26-35 kcal en función de la especie. En concreto, el champiñón es uno de los que menos calorías aportan (26 kcal) y el shiitake, aun siendo el hongo que mayor contenido energético presenta, sólo aporta 35 kcal. (Rai, 2003)

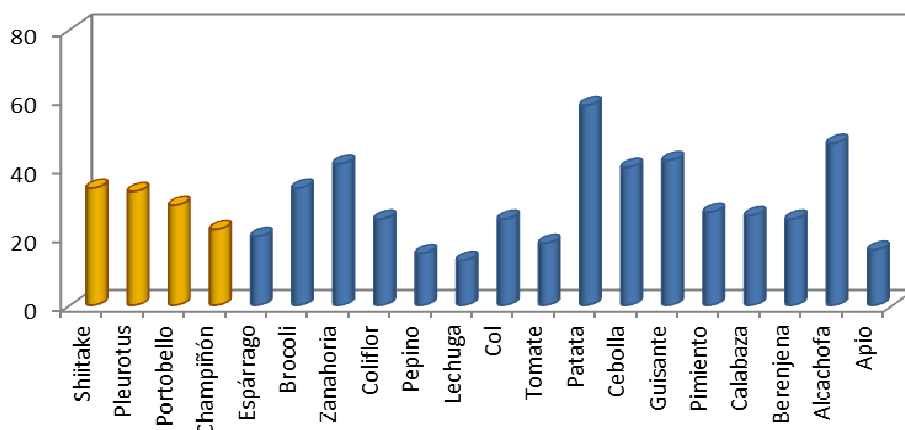


Figura 8. Aporte energético (kcal) de algunos hongos respecto a hortalizas de consumo habitual  
(Fuente: U.S.D.A., 2016)

#### 1.2.4 Compuestos bioactivos de los hongos

En la última década, el estudio de los compuestos biológicamente activos que poseen y de los que se ha comprobado que tienen importantes propiedades beneficiosas para la salud está cobrando más importancia. La concentración de éstos dependerá de la variedad, el sustrato, el cultivo, condiciones de almacenamiento y procesamiento, etc. (Barros et al., 2008).

Entre los compuestos bioactivos se encuentran polisacáridos, proteínas, compuestos fenólicos, ligninas, triterpenos, etc. Estos compuestos son los responsables de la capacidad antioxidante, propiedad inmunomoduladora, anticancerígena, antiglicémica y hepatoprotectora, entre otras. (Arango y Nieto, 2013, Mizuno y Nishitani, 2013).

Sobre todo los polisacáridos que se encuentran en la pared celular son los que presentan mayor bioactividad. Los polisacáridos son polímeros de hidratos de carbono que se encuentran abundantemente en lo más externo de la pared celular de hongos, son: quitina, celulosa,  $\beta$ -glucanos y complejos polisacáridos-proteína (Zhang et al., 2007). Existen numerosos estudios, tanto in vivo como in vitro, en los que se han aislado  $\beta$ -glucanos y complejos polisacáridos-proteína de diferentes hongos y se ha demostrado que éstos tienen importantes propiedades biológicas como agentes inmunomoduladores, antitumorales, hipoglicémicos y antioxidantes (Cheung, 2008). Investigaciones recientes han observado que los polisacáridos del champiñón y de las setas pueden evitar la oncogénesis, por su actividad antitumoral directa contra varios tumores y además previenen la metástasis del tumor. Los efectos son mejores cuando se utiliza junto con la quimioterapia (Wasser, 2002).



#### 1.2.4.1 Fibra

Se considera fibra dietética a los polímeros procedentes de plantas que están formados por 10 o más monosacáridos que no pueden ser hidrolizados endógenamente por las enzimas digestivas y que ejercen un efecto fisiológico potencialmente beneficioso para la salud. Las fibras dietéticas son clasificadas como solubles o insolubles, las fibras dietéticas solubles incluyen pectinas, gomas, mucílagos y algunas hemicelulosas, mientras que la celulosa, otros tipos de hemicelulosa y lignina se incluyen en la fracción insoluble. La fibra dietética no sólo ayuda a evadir la hidrólisis, la digestión y absorción en el intestino delgado del ser humano, sino que aumenta el volumen fecal, estimula la fermentación en el colon, reduce la glucosa en sangre y los niveles de colesterol.

El consumo de fibra dietética y sus componentes promueve el mantenimiento de la salud y la prevención de ciertas enfermedades como diabetes, cáncer, enfermedad cardiovascular, hipercolesterolemia y obesidad (Theuwissen y Mensink, 2008 y Charles, 2005;). La fibra regula la absorción de azúcar, absorbe ciertos compuestos orgánicos como los ácidos biliares y es capaz de retrasar la absorción intestinal de azúcar lo que es muy beneficioso para el tratamiento de la diabetes.

Los hongos son una buena fuente de fibra dietética. Según los datos bibliográficos los hongos contienen más cantidad de fibra insoluble (2,28–8,99 g/100 g porción comestible) que de soluble (0,32–2,20 g/100 g porción comestible) (Manzi et al., 2004). Los polisacáridos que se encuentran en mayor proporción en la fibra del champiñón son los  $\beta$ -glucanos (4-13% de la fibra dietética total) seguidos de la quitina (Guillamon et al., 2010). Al igual que ocurre con otros nutrientes, el contenido de fibra variará dependiendo de la especie de seta, la morfología y las condiciones de cultivo, así como de la conservación y de los tratamientos culinarios a los que se vean sometidos estos productos. Según Manzi et al., (2001 y 2004) los hongos que mayor porcentaje de fibra total presentan son *Agrocybe aegerita*, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus seryngii* y *Pleurotus ostreatus*.

Un estudio realizado en Reino Unido muestra que 100 g de champiñones o setas frescos aportarían entre 5% y 25% de las ingesta recomendada diaria de fibra (18 g fibra/día en Reino Unido) (Manzi et al., 2001).

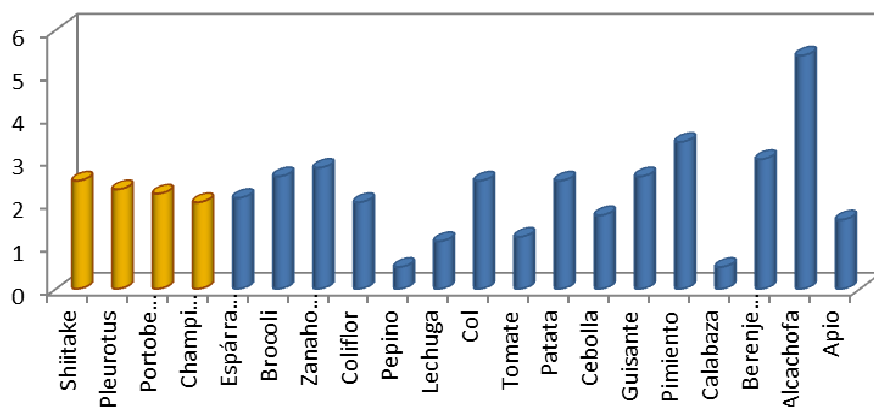


Figura 9. Cantidad de fibra (g/100g) de algunos hongos respecto a hortalizas de consumo habitual

(Fuente: U.S.D.A., 2016)

Como ya se ha descrito anteriormente, la fibra tiene muchos efectos beneficiosos para la salud. En los últimos años se están realizando numerosos estudios sobre los efectos saludables que tiene la fibra de los hongos. La fibra está constituida principalmente por una parte insoluble, llamada fibra dietética insoluble, que aumenta la masa fecal y regula el tránsito intestinal (Howarth et al., 2001). La parte de fibra dietética soluble, presente en menos de un 10% en peso seco (Cheung, 2013), proporciona una mejor capacidad de retención y de fermentación (Xie and Li 2006), aportando además funciones fisiológicas como disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, reducir el colesterol en sangre y promover la microflora intestinal (Ferguson et al., 1995; Bourquin et al., 1996; Nawirska y Kwasniewska 2005).

Por otro lado, los componentes bioactivos de la fibra, tipo  $\beta$ -glucanos, se consideran compuestos bioactivos que, entre otros efectos, estimulan la respuesta inmune, son anticancerígenos, hipoglucémicos y antioxidantes.

Se ha observado que el Lentinan, un  $\beta$ -glucano aislado del cuerpo fructífero de *Lentinula edodes*, estimula el sistema inmune en animales inhibiendo la proliferación de células cancerígenas. Los  $\beta$ -glucanos están siendo utilizados como inmunomoduladores en terapias contra el cáncer con cierto éxito (Reshetnikov et al., 2001), así como con el género *Pleurotus*, llamado Pleuran, que tiene un efecto supresor de tumores (Karácsonyi & Kuniak, 1994).

#### 1.2.4.2 $\beta$ -glucanos

Los betaglucanos son una forma natural de fibra dietética soluble presente en algunos alimentos, como cereales (p.ej.: cebada, avena y salvado de maíz) y hongos (p.ej.: maitake, reishi y shiitake). (Rop et al., 2009) Los  $\beta$ -glucanos, pueden participar en los procesos fisiológicos relacionados con el metabolismo de las grasas en el cuerpo humano, aportando como resultado una disminución del contenido total de colesterol en la sangre y también reducciones en el peso corporal. Además, por ejemplo de la

seta ostra (*Pleurotus ostreatus*) o Shiitake (*Lentinula edodes*), han demostrado actividad anticancerígena.

Este compuesto posee importantes propiedades medicinales, entre ellas que es capaz de incrementar la producción de insulina por lo que podría ser utilizado para el tratamiento de la diabetes (Manohar et al., 2002). También se le han asociado efectos positivos en la disminución de los niveles de colesterol en sangre en ratas (Bobek et al., 2001). En humanos los  $\beta$ -glucanos procedentes de los hongos también parecen reducir el nivel de colesterol y LDL en sangre (low density lipoprotein, lipoproteína de baja densidad, colesterol malo) (Behall et al., 1997).

Se ha observado que la administración de este polisacárido junto con el tratamiento del cáncer (quimioterapia) prolonga el tiempo de supervivencia de los pacientes, mejora los parámetros inmunológicos y se incrementa la calidad de vida en pacientes con cáncer de estómago, colon y otros carcinomas en comparación con pacientes que sólo se les trataba con quimioterapia (Hazama et al., 1995).

#### **1.2.4.3 Quitina y Quitosano**

Los hongos son una fuente potencial de fibra, debido a la presencia de polisacáridos no asimilables o no digeribles, principalmente quitina (Vetter, 2007). Fue aislada por primera vez por Braconnot en 1811, a partir de hongos superiores, y por su origen la denominó "fungina". La quitina es uno de los biopolímeros más abundantes y se encuentra mayoritariamente como polisacárido estructural en conchas de crustáceos y muchos hongos (Heux *et al.*, 2000). En los hongos, la quitina es el componente estructural más importante de la pared celular, ya que es responsable de mantener la forma, resistencia e integridad celular (Martínez & Gozalbo, 2001). En la actualidad, la quitina y sus derivados han pasado a ser polímeros de gran aplicabilidad en los más diversos campos de la actividad humana (Tabla 2)

El quitosano es un biopolímero no tóxico derivado de la quitina, producido por desacetilación alcalina o enzimática, que está constituido por  $\beta$ -(1,4)-2-acetoamido-D-glucosa y  $\beta$ -(1,4)-2-amino-Dglucosa (Je & Kim, 2006a o Je & Kim, 2006b). La diferencia estructural entre la quitina y el quitosano radica en el carbono -2- donde el grupo acetilo de la quitina se encuentra remplazado por un grupo amino, dando lugar al quitosano, el cual es biodegradable, de alto peso molecular y no es alergénico (ver Figura 10) (Bautista *et al.*, 2006; Kim & Rajapakse, 2005; Rabea *et al.*, 2003).

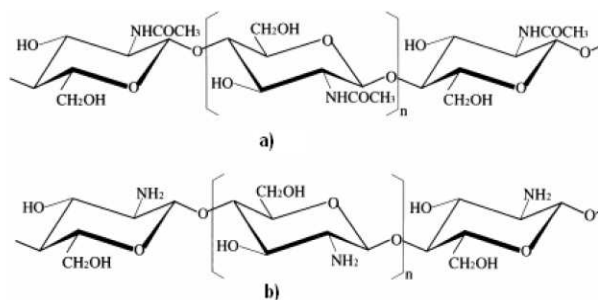


Figura 10. Estructuras de a) quitina y b) quitosano.  
(Fuente: Mantovani et al., 2008)

El quitosano es un compuesto muy valorado debido a su contenido de nitrógeno, cuyas características pueden variar según el grado de desacetilación, peso molecular y de polimerización (Helander *et al.*, 2001; Rabea *et al.*, 2003). Esta molécula presenta propiedades distintas a la quitina que la hacen funcionalmente importante para un gran número de aplicaciones en diversas áreas biotecnológicas, además de que presenta diferentes actividades biológicas (Bautista *et al.*, 2006; Hirano, 1999). Se le han asociado diversas propiedades terapéuticas, fundamentalmente como hipoglicemiante (Reis *et al.*, 2008), para reducir sobrepeso y obesidad (Jull *et al.*, 2008) o como biopiel en pacientes con quemaduras (Cárdenas *et al.*, 2008). Al ser un compuesto seguro, biocompatible y biodegradable (Dhanikula y Panchagnula, 2004; Baek *et al.*, 2007), se han formulado formas farmacéuticas en que se utiliza tanto por vía oral como por vía tópica.

Algunas de las múltiples aplicaciones del quitosano se reflejan en la tabla 2:

Tabla 2. Campos de aplicación y usos del quitosano.  
(Fuente: Caprile 2005)

CAMPOS DE APLICACIÓN	USOS
Tratamiento de aguas y efluentes industriales	Remoción de iones metálicos y pesticidas: remoción de fenoles, radioisótopos, PCB's y colorantes, recuperación de materiales sólidos de la industria alimenticia (proteínas, polisacáridos, etc.).
Fabricación de papel	Tratamiento de superficies, papel fotográfico.

Medicina	Gasas, algodón, contenedor artificial de sangre, control de colesterol, inhibidor tumoral, membranas, inhibición de placas dentarias, cicatrización de heridas, piel artificial, tratamientos de enfermedades óseas, lentes de contacto, membranas de diálisis, bolsas de sangre, anticoagulante.
Cosmética	Maquillaje, esmalte de uñas, loción de baño, cremas, dentífrico.
Bioteología	Inmovilización de enzimas y células, separación de proteínas, cromatografía, recuperación celular.
Agricultura	Recubrimientos de semillas y frutas (film), fertilizante, fungicida, antivirósico.
Alimentaria	Remoción de colorantes, conservantes, estabilizantes de color, exaltador del sabor natural, preservante, antioxidante, emulsionante, aditivo de alimentos para animales.

#### 1.2.4.4 Actividad Antioxidante

Actualmente, la capacidad antioxidante de los alimentos está cobrando cada vez mayor importancia como medio para combatir el estrés oxidativo. El metabolismo celular produce de manera natural especies reactivas del oxígeno, los conocidos “radicales libres”. Cuando el mecanismo antioxidante no es capaz de detoxificar un exceso de estas especies, da como resultado estrés oxidativo.

Los antioxidantes pueden ser endógenos, generados por el propio organismo, o exógenos, que son los que provienen de la dieta. Incrementar la ingesta de antioxidantes ayuda a proteger al organismo de los radicales libres y retrasa el progreso de muchas enfermedades crónicas (Liu et al., 2013). Hay varios tipos de antioxidantes según su mecanismo de acción: preventivos, los que inhiben la formación de radicales libres; secuestrantes de radicales libres y las enzimas reparadoras que se encargan de reparar el daño una vez que se ha producido.

Existen una gran variedad de alimentos ricos en compuestos con reconocida actividad antioxidante, entre ellos, los hongos. El potencial antioxidante de los hongos, tanto cultivados como silvestres, es hoy en día motivo de numerosos estudios y

publicaciones científicas. El valor antioxidante de los hongos es comparable con el de los alimentos de origen vegetal, los compuestos responsables del poder antioxidante en los hongos son varios: selenio, compuestos fenólicos, ergotioneína, tocoferoles, carotenoides, etc. Se ha demostrado que un buen número de hongos comestibles podrían ser utilizados como antioxidantes naturales por su alto potencial frente al estrés oxidativo (Kim et al., 2008; Liu et al., 2012; Palacios et al., 2011; Reis et al., 2012b).

En animales se ha demostrado que el extracto de *Pleurotus* protege los órganos de ratas de más edad frente al estrés oxidativo y se han sentado las bases para poder probar la actividad de dichos extractos en humanos (Jayakumar et al., 2007; Jayakumar et al., 2006). Además, este autor sugirió incorporar a la dieta el extracto como suplemento nutricional para incrementar las defensas del cuerpo contra el estrés oxidativo (Jayakumar et al., 2007).

Respecto a los polifenoles, los champiñones son los hongos que contienen mayor nivel de estos antioxidantes. Una ración de champiñón (85 g) contiene entre 43 y 75mg de fenoles totales. Se ha encontrado una relación positiva entre ese mayor contenido en fenoles y la capacidad de secuestrar radicales libres, siendo estos fenoles los compuestos que más contribuyen a la capacidad antioxidante (Dubost, 2007).

Además, los polisacáridos de los hongos pueden potenciar los sistemas de defensa *in vivo* contra el daño oxidativo. El Pleuran, un  $\beta$ -1,3-D-glucano que se extrae de *Pleurotus ostreatus* mejora el estatus antioxidante de las ratas, aumenta la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-PX) y glutatión reductasa (GRD) (Bobek y Galbavy, 2001).

En el CTICH se han realizado estudios sobre la capacidad antioxidante de diferentes variedades de setas, (figura 11). En concreto, se determinó la actividad antioxidante de 10 especies de hongos cuyo cultivo se había hecho con sustratos propios de La Rioja. Los resultados obtenidos sugirieron que hongos como AB, HU, AA y PO poseen elevada capacidad antioxidante y alta concentración de fenoles (Grifoll et al., 2014).

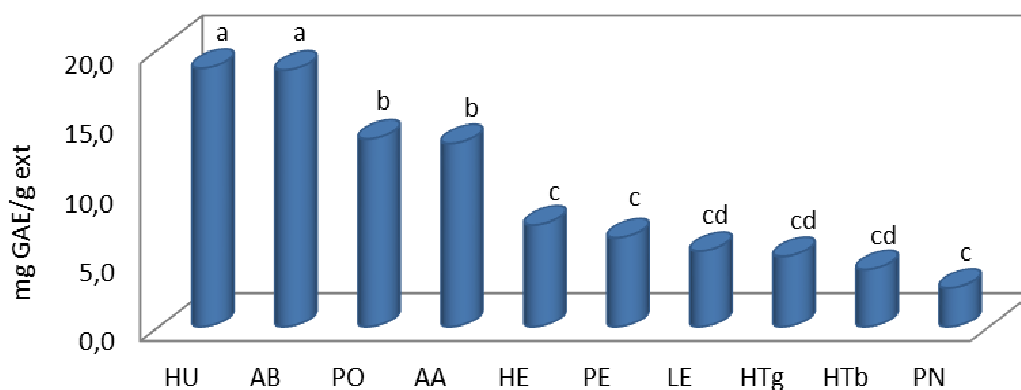


Figura 11. Contenido de fenoles totales en diferentes hongos cultivados en La Rioja. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las distintas setas ( $p < 0,05$ ) (Fuente: Grifoll et al., 2014).

### 1.3 Pulsos eléctricos

Una de las estrategias esenciales para mejorar la competitividad de la industria alimentaria es la introducción de nuevas tecnologías de procesado que permitan la mejora de la calidad de los productos, el desarrollo de otros nuevos o la optimización de los procesos reduciendo sus costes energéticos. La tecnología de Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo (PEMIC o PEF siglas en inglés) consiste en la aplicación, de forma intermitente, de campos eléctricos durante periodos de tiempo del orden de microsegundos a un material colocado entre dos electrodos sin apenas incrementar la temperatura del producto tratado, y por lo tanto, sin alterar sustancialmente sus propiedades sensoriales y nutricionales (Raso y Heinz, 2006). Los campos eléctricos utilizados pueden ir en el rango de 0,1-1kV/cm produciendo la permeabilización reversible para la inducción de estrés en células vegetales, de 0,5 a 3kV/cm con una permeabilización irreversible de tejido vegetal y animal y entre 10 y 40kV/cm para la permeabilización irreversible de las células microbianas (Tsong, 1996).

La teoría más aceptada para explicar este fenómeno es la de la ruptura dieléctrica de la membrana celular (Zimmerman 1974), por la que se provocan la formación de poros en las membranas celulares. Cuando las células se someten a la acción de campos eléctricos externos, se produce un cúmulo de cargas eléctricas de distinto signo a ambos lados de la membrana, y por encima de un campo eléctrico crítico la atracción entre estas cargas provoca la formación de los poros en las envolturas celulares (Álvarez, 2003). La acción del campo eléctrico hace que las cargas de los iones se orienten, comprimiendo y descomprimiendo la membrana celular y finalmente se rompa la célula. A este fenómeno se le denomina electroporación (figura 12), y causa la permeabilización de las células, tanto eucariotas como procariotas, sin apenas incrementar la temperatura del medio. Así mismo, los tratamientos de pulsos eléctricos producen una serie de degradaciones en las células de algas, bacterias y levaduras. (Castro et al., 1993). El tratamiento con POMIC ofrece un amplio rango de

aplicaciones en las que se requiere la permeabilización de la membrana celular, incluyendo presencia, extracción o difusión de metabolitos de plantas así como afectando a la transferencia de masa y de calor en alimentos. (Knorr y Angersbach, 1998). Respecto a la inactivación de los microorganismos, es causada principalmente por un incremento en la permeabilidad de la membrana debido a la compresión y descompresión. (Vega-Mercado et al 1996). Los mecanismos para su inactivación incluyen ruptura eléctrica, perforación iónica y electroporación de la membrana celular (Qin et al., 1994).

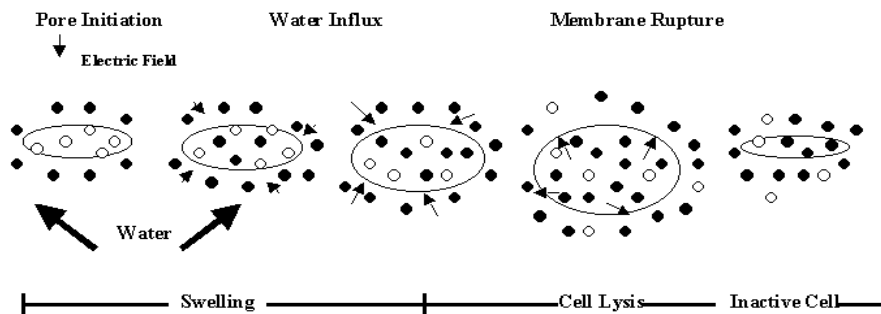


Figura 12. Electroporación de la membrana de una celular mostrando las zonas de hinchamiento, lisis e inactivación celular (Fuente: Vega-Mercado, 1997).

### 1.3.1 Equipo

Un sistema para procesamiento de alimentos por PEMIC consta de diversos equipos siendo los principales la fuente de alto voltaje, un condensador para almacenamiento de energía, la cámara de tratamiento y controlador e interruptor de alto voltaje. La energía eléctrica es almacenada en el condensador el cual la descarga en forma de pulso eléctrico a la cámara de tratamiento. De esta manera el alimento en la cámara de tratamiento recibe en forma instantánea un pulso eléctrico con duración de  $\mu\text{s}$ . La intensidad del campo eléctrico aplicado al alimento depende de las propiedades dieléctricas del alimento, de la energía aportada por la fuente de alto voltaje o por la distancia entre electrodos, entre otros.

El generador de corriente eléctrica continua transforma la corriente alterna de la red eléctrica en corriente continua con la que se carga el condensador. El condensador, o condensadores, son el almacén de energía eléctrica que se descargará en la cámara de tratamiento a través del interruptor. El interruptor controla el paso de la corriente eléctrica desde el condensador a la cámara de tratamiento. La cámara de tratamiento es el lugar donde se localiza el producto para su tratamiento. Básicamente, consta de dos electrodos, uno de ellos conectado al condensador a través del interruptor y el otro, a tierra. Los materiales con los que se fabrican tanto los electrodos como el aislante no deben interactuar con el producto, y deben poderse limpiar con facilidad e incluso esterilizar (Zhang et al., 1995). Algunos de los materiales



recomendados para la fabricación de los electrodos son el acero inoxidable o el grafito, mientras que para el aislante, cerámicas o polímeros plásticos.

A continuación se detallan los factores que afectan al proceso:

a) Intensidad del campo eléctrico

El principal parámetro que determina la eficacia de estos tratamientos, es el campo eléctrico, más comúnmente llamado intensidad del campo eléctrico (E) que generalmente se expresa en kilovoltios por centímetro (figura 15), y que se define como el cociente entre la diferencia de potencial aplicada entre los electrodos (V), expresada en kilovoltios, donde se coloca el alimento y la distancia existente entre ellos (d) expresada en centímetros.  $E \text{ (kV/cm)} = V/d$ . (Raso y Heinz, 2006). En la Figura 15 se muestra un esquema de una aplicación de un campo eléctrico a un alimento.

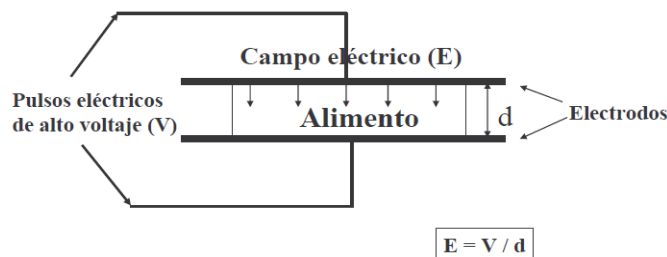


Figura 13. Creación de un campo eléctrico en la cámara de tratamiento.

(Fuente: Martín Belloso et al., 1997)

Al aplicarse pulsos eléctricos y aumentar su intensidad se puede llegar a exceder un valor crítico llamado intensidad de campo crítica, momento necesario para la permeabilización de la célula, reversible o irreversible, o inactivación microorganismos, según el objetivo buscado. Incluso se ha indicado que la intensidad de campo crítica es mayor en células más grandes. (Jeyamkondan et al., 1999). Además, Schoenbach et al., en 1997, observaron que cuando un pulso era mayor de  $50\mu\text{s}$ , la intensidad de campo crítica era de  $4,9\text{kV/cm}$ .; y con un pulso de menos de  $2\mu\text{s}$ , el valor aumentaba hasta  $40\text{kV/cm}$ . Si la intensidad del campo eléctrico fuera superior a  $10\text{ kV/cm}$ , durante pulsos de 2 a  $20\mu\text{s}$ , se produciría una electroporación irreversible y por tanto, una inactivación de microorganismos. (Qin et al., 1996)

De igual forma, Bouzrara y Vorobiev, en 2000, observaron que en un tratamiento a  $0,04\text{ kV/cm}$  se necesitaban 200 segundos para permeabilizar las membranas, mientras que a  $10\text{ kV/cm}$ , únicamente se necesitaron  $5\mu\text{s}$ . En general, se observa que tratamientos de alta intensidad y cortos tiempos de tratamiento son más efectivos que los de baja intensidad y larga duración.

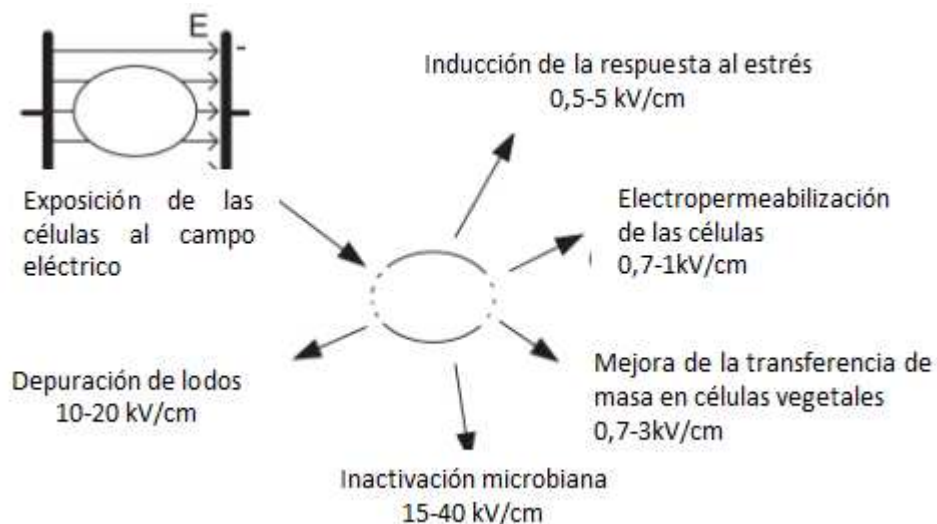


Figura 14. Intensidades de campo eléctrico necesarias para diferentes aplicaciones de los pulsos eléctricos.  
(Fuente: Toepfl et al., 2005)

La aplicación de PEMIC a uvas destinadas a la elaboración de vino provocó que con un campo eléctrico de 0.7 kV/cm se modificara la estructura en la piel de la uva mejorando la extracción de los taninos y con 4 kV/cm se aumentó un 19% la concentración de antocianinas mejorando la cantidad de compuestos fenólicos presentes sin que se modificaran el contenido alcohólico, acidez total, ácidos volátiles respecto al control. (Delsart et al., 2014)

#### b) Forma y polaridad del pulso

Los PEMIC pueden aplicarse en forma de cargas decrecientes exponenciales, cuadradas, oscilatorias, bipolares o instantáneas. La anchura del pulso está condicionada por la forma del mismo. Los dos tipos de pulsos más comúnmente usados en los tratamientos son pulsos de onda cuadrada y pulsos de caída exponencial monopolares (Jeyamkondan et al., 1999) (figura 15). Existe un tercer tipo, los pulsos bipolares, pero son necesarios equipos mucho más complejos y su utilización es menor. Desde un punto de vista práctico, los pulsos de onda cuadrada son más adecuados que los de caída exponencial. En los pulsos de onda cuadrada, prácticamente toda la energía eléctrica utilizada se aplica al máximo voltaje seleccionado (Góngora-Nieto et al., 2002). En pulsos de caída exponencial, una vez alcanzado el máximo voltaje, éste va disminuyendo exponencialmente a lo largo del tiempo, por lo que parte de la energía utilizada se aplica a un voltaje que no tiene ningún efecto aparente. En los pulsos de onda cuadrada toda la energía eléctrica se aplica al máximo campo eléctrico alcanzado durante toda la duración del pulso. Por lo tanto, en los pulsos de onda cuadrada la anchura de pulso es el tiempo durante el que se aplica el campo eléctrico máximo, mientras que en los de caída exponencial, la anchura de pulso se define como el tiempo en el que el campo eléctrico disminuye hasta el 37% de su valor máximo (Zhang et al., 1995).

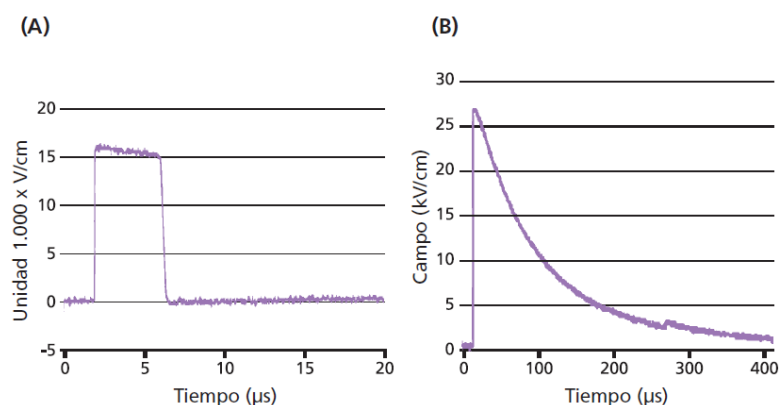


Figura 15. Tipos de pulsos utilizados. (A) Pulso de onda cuadrada; (B) Pulso de caída exponencial.  
(Fuente: Jeyamkondan et al., 1999).

Algunas investigaciones han demostrado que los pulsos de onda cuadrada eran más energéticos y letalmente eficientes para la inactivación celular que los pulsos oscilatorios y los pulsos de caída exponencial (Qin et al., 1994). Además, los PEMIC bipolares eran más eficientes que los monopolares, incluso llegando a ser letales para microorganismos como *Bacillus* spp. y *E.coli*, ya que provocaban un estrés en la membrana celular mejorando su descomposición eléctrica (Qin et al., 1994, Ho et al., 1995, Barbosa-Cánovas et al., 1999).

Brito et al., (2012), investigaron la aplicación de PEMIC, de forma monopolar y bipolar, en cubos pre-cortados de manzana variando el ancho de pulso, el número de pulsos y el campo eléctrico. Al aumentarlos, se produjeron mayores rendimientos en la extracción de zumo, aunque los resultados sugirieron que existe una tendencia a alcanzar un punto de saturación independientemente de la forma del pulso aplicada. Los pulsos bipolares, al igual que en los estudios citados anteriormente, revelaron mayores rendimientos que los monopolares.

### c) Tiempo del tratamiento

El tiempo de tratamiento se define como el producto del número de pulsos ( $n$ ) y la duración del pulso ( $\zeta$ ). Un aumento, de uno u otro, mejorará la permeabilización de la célula y su inactivación. (Sale et al., 1967).

Vallverdú-Queralt et al., (2013) encontraron diferentes metabolitos secundarios en tomates, aumentándose el contenido en polifenoles y carotenoides según el número de pulsos aplicados con una intensidad de campo fija, 1,2kV/cm. Una vez aplicados los PEMIC, los tomates tratados se dejaron 24 horas a 4°C de modo que se mejoró la actividad metabólica con mayor cantidad de polifenoles con 30 pulsos, y carotenoides con 5 pulsos.

d) Temperatura del tratamiento

En general, los experimentos se realizan a temperatura ambiente, aunque un uso prolongado puede aumentar a temperatura del producto, por lo que disminuirá la viscosidad del solvente para mejorar la extracción, pero podrá dañar las sustancias de interés.

En la figura 16, se muestra la influencia de la intensidad del campo eléctrico, a 1, 3, 5 y 7 kV/cm, en la extracción de sacarosa tras 4 horas, a 20, 40 y 70 °C. (López y col., 2009). En este estudio realizado en la Universidad de Zaragoza, a 70°C no se observó un efecto adicional debido al tratamiento de pulsos, probablemente, debido a la intensa desnaturalización térmica de las membranas celulares. Sin embargo, a 20 y 40°C el efecto incrementó a medida que aumentó la intensidad del campo eléctrico aplicada. Además la mejora respecto a la muestra control fue mayor a menor temperatura, de 40 y 72% a 40°C y 20°C, respectivamente. Por tanto, la aplicación de pulsos eléctricos, permite reducir la temperatura y el tiempo de extracción de sacarosa a partir de remolacha azucarera a temperaturas inferiores a 70°C, o aumentar la concentración de azúcar extraído.

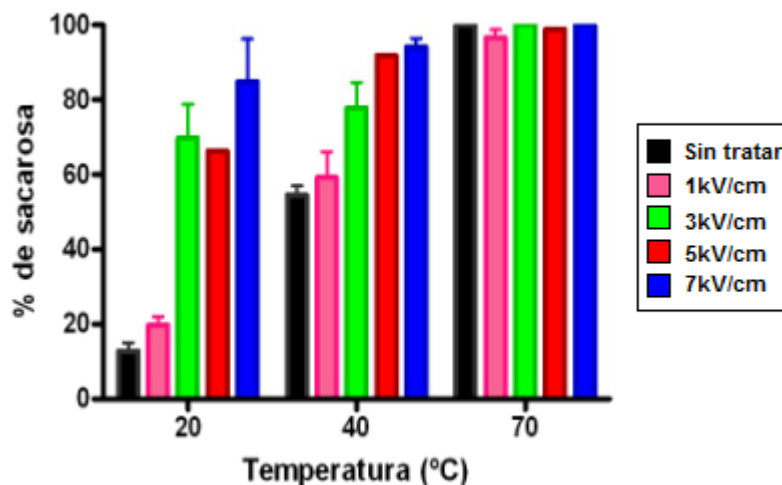


Figura 16. Porcentaje de sacarosa obtenida tras 4 horas de extracción a diferentes temperaturas, con la aplicación de PEMIC (20 pulsos de onda cuadrada, 2 $\mu$ s, 1 Hz).

e) Geometría y tamaño de las células

Los estudios de permeabilización reversible mostraron que los diferentes tipos de células reaccionan de diferente manera a un mismo tratamiento aplicado en cuanto a viabilidad y crecimiento. Los componentes específicos de la membrana y sus propiedades, superficial y elasticidad, pueden explicar estas diferencias. Además, la efectividad de la permeabilización con PEMIC puede ser específica para cada célula y

depender de la localización de los metabolitos dentro de la célula, citoplasma o vacuolas. (Knorr et al., 1994).

La intensidad del campo eléctrico para inducir la permeabilización irreversible de la membrana depende de la geometría y tamaño de las células, en el intervalo de 1-2 kV/cm para células vegetales (tamaño de célula 40-200  $\mu\text{m}$ ) y en el intervalo de 12-20 kV/cm para microorganismos (Tamaño de célula 1-10  $\mu\text{m}$ ) (Heinz et al., 2002, y Toepfl et al., 2005).

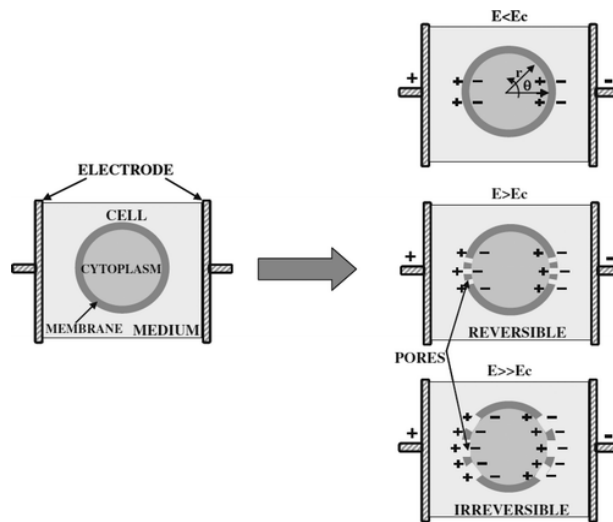


Figura 17. Célula en un campo eléctrico (E). El área afectada por la electroporación se presenta en línea discontinua. ( $E_c$ : Intensidad crítica del campo eléctrico)  
(Fuente: Donsi et al., 2010).

En función del tamaño y la forma de la célula, el campo eléctrico crítico en el cual los poros formados pasan a ser irreversibles oscila entre 1 y 2kV/cm para las células vegetales, y entre 10 y 14kV/cm para los microorganismos. La formación de poros es un proceso dinámico y puede ser reversible o irreversible dependiendo de la intensidad del tratamiento. Cuando los poros inducidos son pequeños en comparación con el área de la membrana y se generan con tratamiento de PEMIC de intensidades bajas, la interrupción eléctrica es reversible de modo que cuando cesa el campo eléctrico la membrana celular vuelve a su estado normal. (Figura 17) (Angersbach, Heinz, & Knorr, 2000). La viabilidad de la célula se mantiene y la biosíntesis adicional de los metabolitos secundarios puede ser activada como respuesta a la condición de estrés inducida por el tratamiento con PEMIC. Aumentar la intensidad del tratamiento, aumentando la intensidad del campo eléctrico y / o el tiempo de tratamiento (que considera el número de pulsos y el ancho de pulso aplicado) promoverá la formación de grandes poros y la permeabilización reversible se convertirá en un desglóse irreversible.

### **1.3.2 Permeabilización celular reversible**

El efecto permeabilizante sobre las membranas biológicas que resulta de la aplicación de corrientes eléctricas alternas pulsadas se conoce desde principios del siglo XX, pero fue durante los años noventa cuando se llevó a cabo una investigación exhaustiva sobre esta tecnología. (Soliva Fortuny et al., 2009). Por un lado, la mayoría de los estudios sobre tratamientos de PEMIC se han dedicado al diseño de aplicaciones de pasteurización para productos líquidos, con el fin de lograr niveles adecuados de destrucción microbiana así como observar un impacto en la actividad enzimática (Wouters et al., 2001). Por otra parte, se están estudiando tratamientos de intensidad leve o moderada para explorar su potencial de permeabilización de las estructuras tisulares, permitiendo su implementación en el contexto de operaciones ya existentes como la extracción o el secado. Además, el PE puede proporcionar también un potencial para inducir reacciones de estrés en sistemas vegetales o cultivos celulares, de manera que la bioproducción de ciertos compuestos puede potenciarse o estimularse (Toepfl, Mathys, Heinz, & Knorr, 2006).

Este fenómeno de electroporación reversible induce un estrés celular que, en determinadas circunstancias, puede originar una reacción metabólica y el aumento en la producción de determinados metabolitos celulares de interés en la industria alimentaria. Además, los tratamientos de PEMIC necesarios para esta aplicación apenas modifican la temperatura del producto. En consecuencia, estos tratamientos no dañan ni a las enzimas, ni a las proteínas, ni en general a las sustancias intracelulares de interés en la industria alimentaria. (Calderón-Miranda et al., 1998).

En los últimos años se ha demostrado que el uso de campos eléctricos pulsados es prometedor para la extracción intracelular de materiales de origen vegetal (Soliva-Fortuny, 2009) y bio-suspensiones (Shynkaryk et al., 2009) debido principalmente a su capacidad para causar daño a las células o inducir estrés por permeabilización transitoria de las membranas celulares. El grado de permeabilización influye claramente en la recuperación de compuestos intracelulares tales como compuestos bioactivos, ya que se encuentran en diferentes subestructuras celulares, y su extracción es altamente dependiente del daño celular.

Por otro lado, se ha considerado el empleo de esta tecnología para facilitar la extracción de distintos componentes del interior celular (Vorobiev y Lebovka, 2006) y de la extracción de componentes de interés en la industria alimentaria a temperatura ambiente, como pigmentos, azúcares y otros compuestos, sin necesidad de recurrir al troceado excesivo o al calentamiento. Para ello, no es necesario aplicar intensidades del campo eléctrico tan elevadas: tratamientos inferiores a 10 kV/cm son suficientes para permeabilizar las membranas de células eucariotas, por lo que los costes energéticos son mucho menores. (Saldaña et al., 2009).

Por ejemplo, en la producción de azúcar, se aplicaron PEMIC al zumo de la caña obteniendo mayor rendimiento (74,5% a 5kV, 20 pulsos) que en el tratamiento por calor (73,2%) y en el control (65,5%). Además, la energía consumida fue 10 veces menor que la empleada al aplicarle el tratamiento convencional por calor. (Jarupan Kuldiloke et al., 2008). La pureza de estas extracciones fue mayor con el tratamiento PEMIC que sin él, (96-98% and 90-93% respectivamente (Jemai y Vorobiev, 2006).

Estas aplicaciones de PEMIC inducen a las reacciones de estrés en las plantas estimulando la actividad metabólica y acumulando metabolitos secundarios. En aceites vegetales de oliva, soja y maíz, se aumentó el rendimiento de extracción al aplicar PEMIC de 3kV/cm, además de mejorar la liberación de pigmentos y la producción adicional de metabolitos secundarios como fitoesteroles o isoflavonoides (Guderjan et al., 2005). Dos años después, el mismo equipo de investigación publicó un estudio en aceite de colza en el que, aplicando 7kV/cm y 120 pulsos, se triplicaba el contenido en polifenoles totales respecto al aceite de colza sin tratar. Ellos concluyeron que, a mayor intensidad aplicada, bien fuera con un mayor campo o un mayor número de pulsos, se observaba más cantidad de tocoferoles y polifenoles (Guderjan et al., 2007).

En el zumo de uva para la elaboración de vino (*Vitis Vinifera*) se incrementaron los polifenoles en un 13-28% utilizando PEMIC de 0,5 a 2,4 kV/cm y 50 pulsos. Este aumento de metabolitos secundarios favorecido por la permeabilización de la membrana se debió al estrés generado, por la tecnología de PEMIC, con la consecuente producción de polifenoles.

Otro uso de PEMIC es la deshidratación osmótica en frutas y hortalizas, como en discos de zanahoria con intensidades hasta 16 kV/cm, observando una disminución de la humedad y un aumento en el contenido de sólidos (Rastogi et al., 1999) o en pimiento rojo mejorando la transferencia de masa y la retención de vitamina C. (Ade-Omowaye et al., 2003).

Mientras que la permeabilización reversible se utiliza en el campo de la biotecnología o de la ingeniería genética, campos en los que su efecto está ampliamente estudiado, las aplicaciones de esta tecnología en la industria alimentaria están basadas en la inducción de la producción de determinados metabolitos (respuesta al estrés) y la permeabilización irreversible de las células. Las dos principales aplicaciones en esta última área son la inactivación microbiana y enzimática en alimentos líquidos a temperaturas que no afectan a las propiedades de los alimentos y la mejora de la transferencia de masa a través de las membranas celulares.

### 1.3.3 Estudios en setas

Parniakov et al., 2014 compararon diferentes métodos de extracción en *Agaricus bisporus*: extracción por altas presiones (HPP), combinada con pulsos eléctricos (HPP+PEMIC), agua caliente y etanol. En las extracciones con agua caliente se observaron contenidos relativamente altos de proteínas, polifenoles totales y polisacáridos, sin embargo los extractos estaban turbios y con poca estabilidad, al igual que en los extractos metanólicos. El método combinado de presión y pulsos eléctricos dio un mayor rendimiento permitiendo la producción de extractos de hongos con alta estabilidad coloidal y altos contenidos de proteínas y polisacáridos.

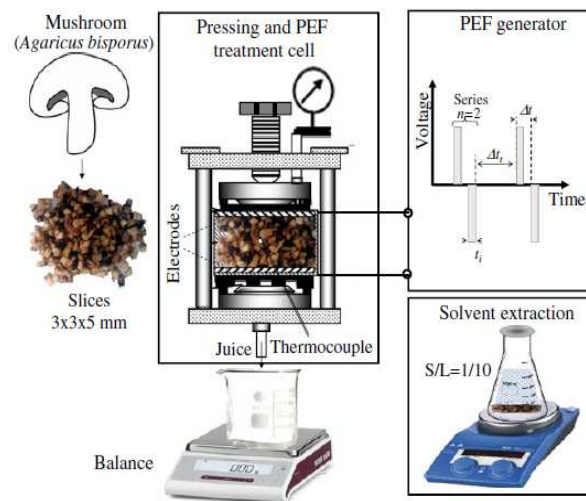


Figura 18. Tratamientos de PEF y presión en champiñón.  
(Fuente: Parniakov et al., 2014)

Xue y Farid, (2015), investigaron, también en *Agaricus bisporus*, la extracción mediante PEF de polisacáridos, fenoles totales y proteínas, observando cómo se incrementaba su concentración al aumentar la intensidad de campo eléctrico, la temperatura y el tiempo de tratamiento. Al comparar el rendimiento obtenido de la extracción convencional observaron que se puede mejorar significativamente la extracción utilizando PEF debido a una alta permeabilización de la membrana celular en un periodo de tiempo de tratamiento muy corto.

Li et al., (2012) utilizaron el tratamiento PEF para estudiar la extracción de polisacáridos y la cepa que proporcionaba mayor rendimiento y mayor actividad anticoagulante a partir de la seta *Auricularia auricular*, comúnmente llamada, Oreja de Judas. El tratamiento PEF mostró los mejores resultados respecto al control y a extracciones con microondas y con ultrasonidos demostrando que puede ser un método muy efectivo a la hora de procesar polisacáridos biactivos naturales.



También han sido extraídos con PEMIC los polisacáridos de *Morchella esculenta*, estudiándose, su estructura química y actividades antitumorales. (Liu et al., 2016). El óptimo de extracción fue de 18kV/cm y 7 pulsos.

Otros grupos de investigación han centrado sus estudios en el micelio de hongos para mejorar su productividad. Ramirez et al., 2010, probaron corriente alterna, corriente continua y pulsos eléctricos en la producción de biomasa micelial de *Ganoderma lucidum* bajo cultivo sumergido. Ellos observaron una sensibilidad mayor a la estimulación en el crecimiento de *G. lucidum* cuando los campos fueron aplicados durante fases tempranas de crecimiento del micelio, (en los primeros días de cultivo justo después del proceso de incubación). Igualmente el uso de campos eléctricos en sistemas de cultivos convencionales y en fermentaciones en estado sólido de algunos hongos ha logrado disminuir el tiempo para el desarrollo del cuerpo fructífero de algunas especies como: *Grifola frondosa* y *Pleurotus ostreatus*, además de otras clases de hongos (Jitsufuchi y Yamamoto 1987, Ohga et al., 2004, Ohga y Iida 2001).

Farooq et al., (2014) estimularon el crecimiento del micelio del hongo *Sparassis crispa* con PEMIC y aplicaron directamente 100, 120, 130 y 170 kilovoltios al compost situado en botellas mejorando, a su vez, la producción del cuerpo fructífero. Ellos confirmaron que la temperatura óptima fue de 25°C y a pH 5-7.

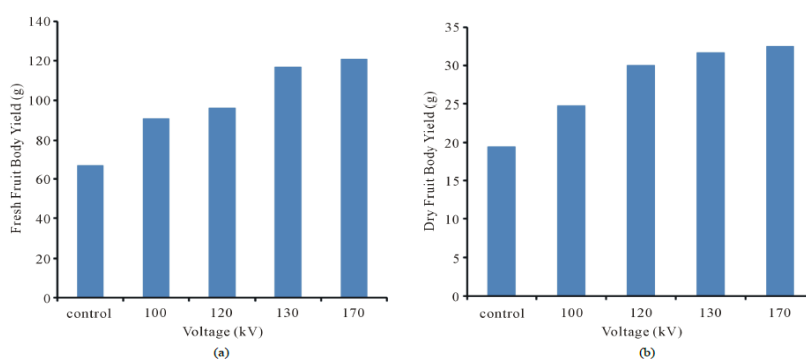
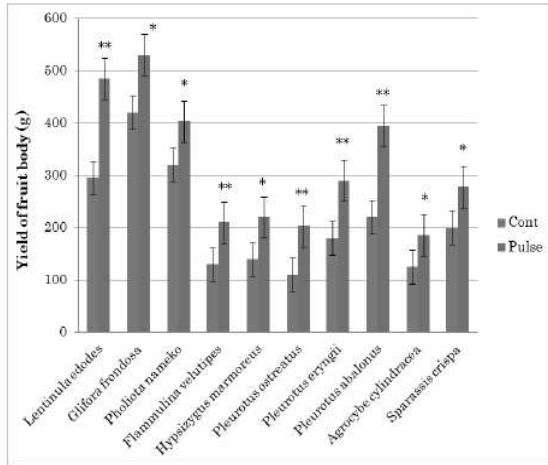


Figura 19. Efecto de la estimulación de PEMIC en el hongo *Sparassis crispa* en fresco (a) y en seco (b).

(Fuente: Farooq et al., 2014)

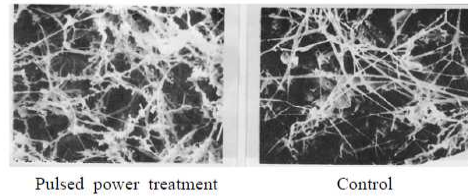
Takaki et al., en 2009 aplicaron PEMIC en troncos con *Lentinula edodes* y *Pholiota nameko*, y en sacos con *Lyophyllum decastes* en el momento anterior a la fructificación. Se aplicó un voltaje de 120kV con pulsos de 50 ns, y mostró un aumento de la producción 1,5 a 2,1 veces mayor con el tratamiento.

En 2012, Ohga aplicó pulsos eléctricos de intensidades entre 100-170 kV al sustrato de 10 setas comestibles justo antes de la fructificación aumentando su productividad y rendimiento (Figura 20). El tratamiento estimuló especialmente la fructificación de la especie *Pleurotus*.



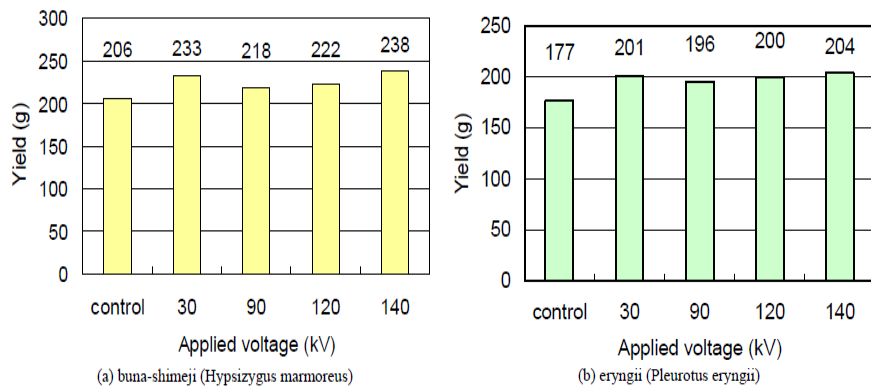
**Fig. 2.** Effect of the pulsed power stimulation for 10 species mushrooms.

Figura 20. Efecto de la estimulación de los pulsos eléctricos en la producción de micelio y setas. (Fuente: Ohga, 2012)



**Fig. 3.** Morphological changes with pulsed power stimulation on mycelia of *Lentinula edodes* with scanning electron microscope observation ( $\times 500$ ).

Los resultados experimentales del estudio de Takaki et al., (2014) en *Pholiota nameko* y *Lentinula edodes* (shiitake) mostraron que la formación del cuerpo fructífero aumentó 1,3-2,0 veces en peso total. El rendimiento acumulado de *Lentinula edodes* durante cuatro floradas se mejoró de 160 a 320 g aplicando tensiones de 50 o 100 kV. Sin embargo, el rendimiento se redujo de 320 a 240 g al aumentar la tensión aplicada de 100 a 130 kV. De la misma forma, Tsukamoto et al., en 2005, obtuvieron un aumento del 15% en la producción de *Lentinula edodes*, *Hypsizygos marmoreus* y *Pleurotus eryngii* (Figura 21).



**Figura 21.** Efecto de la estimulación de los pulsos eléctricos en la producción de *Hypsizygos marmoreus* y *Pleurotus eryngii*. (Fuente: Tsukamoto et al., 2005)

La capacidad de los pulsos eléctricos de alto voltaje para permeabilizar las membranas celulares, puede tener ventajas potenciales en el proceso de producción de hongos, favoreciendo la salida de compuestos bioactivos, o incluso incrementando el porcentaje de ellos en los hongos.

Como se ha podido observar, los resultados obtenidos hasta el momento son muy prometedores, y cabe esperar que en un futuro no muy lejano esta tecnología llegue a implantarse en la industria alimentaria. Aunque es cierto que debido a la gran variedad de posibilidades que presenta la tecnología, todavía es necesario realizar investigaciones sistemáticas que permitan determinar las condiciones de tratamiento más adecuadas para cada producto y cada proceso de transferencia de masa. Probablemente, el hecho de que todavía no se encuentre a escala industrial sea debido a la falta de equipos que permitan procesar cantidades elevadas de materia prima; sin embargo se están invirtiendo grandes esfuerzos para conseguir mejorar los equipos existentes hasta el momento.

## 2 OBJETIVOS

---

El objetivo general de este trabajo fue la caracterización de las principales setas cultivadas en La Rioja desde el punto de vista de su contenido en compuestos bioactivos y su actividad antioxidante, así como la exploración en la aplicación de Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo (PEMIC) para proporcionar un aumento de su potencial saludable y del rendimiento en su producción.

Para ellos se plantearon unos objetivos secundarios:

- Caracterización de todas las setas cultivadas en el Centro Tecnológico de Investigación del Champiñón en cuanto a su composición centesimal, contenidos de fibra dietética, quitosano,  $\beta$ -glucanos, así como actividad antioxidante.
- Evaluación del efecto de la aplicación de PEMIC en el cuerpo fructífero de *Agaricus bisporus*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii* y *Pleurotus ostreatus* sobre la composición centesimal y el contenido de compuestos bioactivos.
- Valoración de la influencia de la aplicación de PEMIC sobre los paquetes de sustrato en el momento previo a la fructificación en *Lentinula edodes*, y *Pleurotus eryngii* sobre el rendimiento del cultivo, composición centesimal, contenidos de fibra dietética,  $\beta$ -glucanos, y actividad antioxidante.



### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

---

Para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han sometido distintas variedades de setas a pulsos eléctricos de moderada intensidad tanto durante la etapa de cultivo como en el cuerpo fructífero, una vez recolectado. Todas las especies estudiadas han sido cultivadas en las instalaciones del Centro Tecnológico de Investigación del Champiñón de La Rioja (CTICH), así como la producción del sustrato utilizado. Las setas, tratadas y sin tratar, se han caracterizado para la obtención de sus componentes bioactivos. A continuación se muestran las metodologías utilizadas en el cultivo de las especies y las analíticas realizadas.

En la tabla 3 se incluyen las setas cultivadas en La Rioja utilizadas en esta tesis. Se incluyen el nombre común y el científico, así como la abreviatura.

Tabla 3.- Nombre común, científico y abreviatura de las setas cultivadas en La Rioja.

<b>Nombre común</b>	<b>Nombre científico</b>	<b>Abreviatura</b>
Seta de chopo	<i>Agrocybe aegerita</i>	AA
Champiñón	<i>Agaricus bisporus</i>	AB
Portobello	<i>Agaricus brunnescens</i>	ABp
Reishi	<i>Ganoderma lucidum</i>	GL
Seta pom pom	<i>Hericium erinaceus</i>	HE
Shimeji (blanca)	<i>Hypsizygus tessulatus</i>	HTb
Shimeji (gris)	<i>Hypsizygus tessulatus</i>	HTg
Seta de olmo	<i>Hypsizygus ulmarius</i>	HU
Shiitake	<i>Lentunila edodes</i>	LE
Seta ostra amarilla	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	PC
Seta de cardo	<i>Pleurotus eryngii</i>	PE
Nameko	<i>Pholiota nameko</i>	PN
Seta de ostra	<i>Pleurotus ostreatus</i>	PO

#### 3.1 Cultivo de las setas

Cada especie de hongo conlleva una metodología diferente de cultivo, por lo que se describe a continuación el proceso de cultivo de las setas, realizado a escala piloto en las instalaciones del CTICH. A continuación se presenta un esquema general del proceso de cultivo de setas:

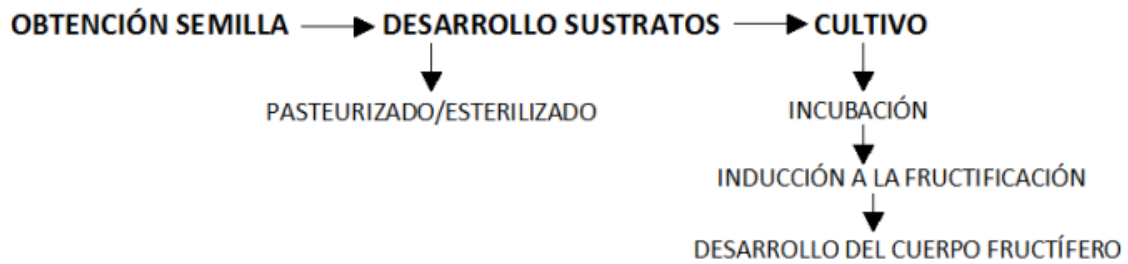


Figura 22. Esquema general del cultivo de setas.

### 3.2 Obtención de la semilla

El micelio utilizado para la obtención de setas se incuba en distintas semillas de cereal (mijo o centeno), siendo la forma más utilizada ya que permite una manipulación fácil y una homogenización de la inoculación en el sustrato. Dada su complejidad y requerimientos de asepsia, las semillas de las se obtienen de las casas comerciales Mycelia o Sylvan.

### 3.3 Desarrollo de sustratos

El sustrato es el medio en el cual crece la semilla y se desarrolla el micelio y, posteriormente, el cuerpo fructífero o seta. En el CTICH se elaboran sustratos pasteurizados (cultivo de especies como AB, ABp, y PO) y sustratos esterilizados (el resto de setas utilizadas en esta tesis).

#### 3.3.1 Equipamiento

Para realizar los ensayos necesarios con las distintas variedades de hongos, el CTICH cuenta con una planta piloto para producir el sustrato. La planta piloto, (Figura 23), está formada por:

a) Zona de mezclas. Las distintas materias primas (ingredientes base y suplementos) de los sustratos deben de ser mezclados lo más homogéneamente posible e hidratados hasta humedades entre 60-70 % en función de la especie. Además se debe disponer de un espacio para el almacenamiento de las materias primas.

b) Área de llenado. También en el exterior, en la parte cubierta, se realiza el llenado de bolsas de manera automática mediante una llenadora que controla el peso de las mismas.

c) Autoclave. Las bolsas llenas se sitúan en el autoclave para su esterilización. Éste tiene una doble puerta: de entrada y otra de salida. De esta manera, la salida de las bolsas esterilizadas se realiza directamente a una sala blanca, eliminando cualquier riesgo de contaminación posterior.

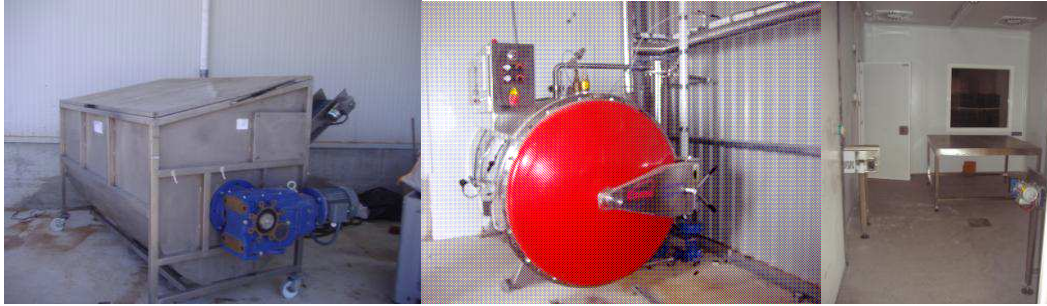


Figura 23.- Equipamiento e instalaciones de la planta piloto para la realización de sustrato de setas.

d) Sala de enfriado. Una vez realizada la esterilización, las bolsas se enfrían hasta aproximadamente 22°C en el cuarto de enfriamiento para poder efectuar la siembra del inóculo inicial o micelio puro.

e) Sala de siembra. Las bolsas listas para inocular se pasan a la sala de siembra mediante unas cintas. En esta sala se incorpora el micelio en el sustrato. Este micelio debe almacenarse en una cámara frigorífica para evitar cualquier contaminación. Las bolsas una vez sembradas se sellan y se llevan a la sala de incubación.

f) Sala de incubación. Aquí se colocan las bolsas en los carros y se mantienen hasta que el micelio invade (coloniza) todo el sustrato. Deben estar perfectamente climatizadas para poder mantener las condiciones ambientales del sustrato (temperatura, humedad, CO<sub>2</sub>) dentro del rango óptimo de crecimiento de la especie a cultivar.

g) Sala de cultivo. , donde se les induce a la fructificación (rascado de la superficie, apertura de orificios en las bolsas, disminución de la temperatura, aumento de la humedad) y posterior recolección de las setas.

### 3.3.2 Elaboración de sustratos

Las setas son organismos heterótrofos y saprófitos que se alimentan de materias vegetales muertas o degradadas y no pueden sintetizar los nutrientes que necesitan por lo que es necesario prepararles condiciones y medios para que puedan desarrollarse correctamente. El material preparado se conoce como sustrato, el cual se obtiene tras un proceso de compostaje.

Las especies de hongos cultivadas son lignocelulósicas, es decir, su nutrición se basa en la lignina, por lo que los sustratos se elaboran con serrín de roble como ingredientes base, dotando de estructura a la mezcla y facilitando su aireación. El serrín más utilizado es el procedente de la fabricación de toneles de roble utilizados en bodegas ya que es una materia prima fácil de conseguir en La Rioja y además, es madera sin ningún tipo de residuo ni tratamiento.



Además, se suelen usar subproductos agrícolas, como salvado de trigo, paja de trigo y suplementos, (harina de uva, huesillo de aceituna, residuos de café) y correctores o tamponadores del pH como el yeso o el carbonato cálcico; para así poder optimizar los requerimientos nutricionales de las setas y potenciar su fructificación.

Se van a distinguir dos grupos de sustrato de cultivo, los que necesitan pasteurización y los que se esterilizan.

#### **a) Sustrato pasteurizado**

##### a-1) AB y ABp

El champiñón blanco y el portobello son hongos que se cultivan sobre sustrato pasteurizado y siguen el mismo proceso, sólo la cepa utilizada los diferencia ya que aporta el característico color tostado al sombrero de ABp. Las materias primas que componen este sustrato son fundamentalmente paja de trigo, estiércol (en España se utiliza de gallina mientras que en otros países europeos se utiliza el estiércol de caballo como fuente de nitrógeno), urea, yeso ( $SO_4Ca$ ) y carbonato cálcico ( $CO_3Ca$ ). El sustrato de champiñón pasa por un proceso de fermentación, el compost obtenido después de este proceso se denomina Fase I, y una posterior pasteurización. El compost ya pasteurizado se conoce como Fase II. Una vez completados estos procesos, se siembra el sustrato con el micelio de la cepa elegida y se incuba en las salas de cultivo.

##### a-2) PO

En *Pleurotus ostreatus* también se realiza una pasteurización al sustrato, al igual que en los casos anteriores de los *Agaricus*, pero con una mezcla de materias primas distintas, paja de trigo, paja de maíz y urea, eliminando el uso de estiércol de gallina

Una vez que el sustrato está listo, se siembra con la cepa seleccionada y se elaboran paquetes de 22kg de peso cubiertos de plástico de color negro con entre 7 y 9 agujeros por saco desde donde se desarrollarán las setas en racimos.

#### **b) Sustrato esterilizado**

AA, HU, PC y LE se cultivan tanto en sustrato pasteurizado como en esterilizado, pero en las instalaciones del CTICH el sustrato de estas setas se esteriliza en bolsas de polipropileno de 3 kg.

Para estas especies se utilizó un sustrato esterilizado elaborado con las mismas materias primas: serrín de roble, paja de trigo, salvado de trigo, maíz, avena, suplemento oleaginoso (basado en soja y semilla de girasol). La diferencia en algunos casos como en GL es la mayor proporción de serrín de roble, o en el caso de PE una mayor cantidad de suplementos oleaginosos.

### 3.3.3 Mezcla y embolsado

Según la seta utilizada, las materias primas se incorporan al mezclador y a su vez se añade agua previamente calentada a 70°C para facilitar su homogeneización. Una vez mezclado, el sustrato pasa por una cinta a un sinfín, a través de la cual se llenan las bolsas de polipropileno con filtro (Unicorn Bags, Texas, USA). Las bolsas llenas se colocan en bandejas en los carros para ser pasteurizadas a 80°C o autoclavadas a 121°C durante 3 horas. Una vez enfriado, las bolsas se inoculan con la semilla del micelio adquirida en la casa comercial Mycelia o Sylvan.

En general, estas bolsas de polipropileno cuentan con un filtro especialmente diseñado para el cultivo de setas (Figura 24). El filtro es micro-poroso por lo que se mantiene el interior libre de contaminantes y permite el intercambio de gases y el mantenimiento de la humedad. Además, este tipo de bolsas son aptas para ser autoclavadas y permiten el termosellado.

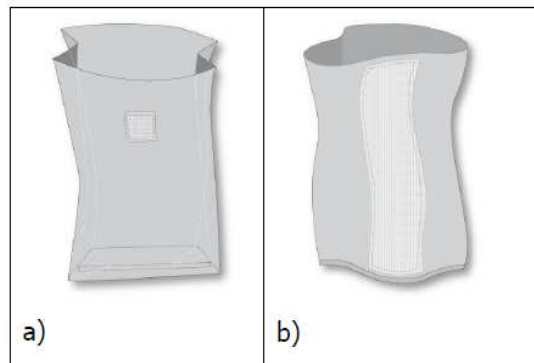


Figura 24. Bolsas para cultivo: a) Bolsa Unicorn parte delantera; b) Bolsa Unicorn parte trasera. (Fuente: Imágenes tomadas de la respectiva casa comercial. <http://www.unicornbags.com/>)

Las bolsas se identifican mediante una pegatina con un código, se sella la parte superior con una termoselladora de manera que la bolsa quede totalmente cerrada, y se agitan para que la semilla quede homogéneamente distribuida por toda la bolsa.

Por último, las bolsas se colocan en carros que se llevan a las salas de incubación donde permanecen de 3 a 8 semanas en función de la especie (Figura 25).



Figura 25. Sala de incubación en las instalaciones del CTICH.

### 3.4 Condiciones de cultivo

#### 3.4.1 Equipamiento

El CTICH cuenta en sus instalaciones con 6 salas de cultivo pequeñas (7m x 3m x 3m) y 3 salas medianas (10m x 4m x 4m) con estanterías de 3 alturas donde se colocan los sacos o paquetes con el sustrato ya incubado. Las condiciones climáticas se controlan a través de un sistema holandés de la marca comercial FANCOM 765, el más extendido en cultivo de setas.

#### 3.4.2 Inducción y fructificación de las setas

Cuando el sustrato es colonizado, se retiran las bolsas de las salas de incubación y se trasladan a las salas de cultivo donde se induce la fructificación mediante la reducción de la temperatura. De esta manera, se consigue que el micelio cambie de su crecimiento vegetativo al crecimiento reproductivo. Las salas de cultivo están climatizadas y son controladas automáticamente, lo que permite obtener y almacenar cierta información asociada al ciclo de cultivo (medidas de temperatura, humedad, CO<sub>2</sub> y ventilación). Esta información unida a la observación del propio ensayo, permite conocer las condiciones óptimas de los parámetros de cultivo.

Las cepas cultivadas en las instalaciones del CTICH tienen distinto comportamiento frente a los sustratos y las condiciones de cultivo. Cada seta requiere unas necesidades concretas de temperatura, aireación, iluminación y humedad relativa en cada estado de crecimiento del hongo, que van desde la incubación, inducción para la fructificación de los primeros primordios y desarrollo del cuerpo fructífero.

A continuación se detallan algunas de las características de cultivo de las setas producidas para la elaboración de esta Tesis Doctoral. Para su producción se han utilizado las condiciones de cultivo recomendadas por Stamets (1993) con algunas modificaciones, (véanse las tablas en las descripciones de cada seta).

##### 3.4.2.1 Cultivo de *Agaricus bisporus* (Champiñón)

En las salas de cultivo las condiciones climáticas están controladas y no es necesaria la luz para el crecimiento del micelio. Cuando el micelio ha colonizado el sustrato, unas dos semanas después de sembrar, se cubre el sustrato con una capa de tierra de cobertura. Esta tierra de cobertura es turba negra a la que se le corrige el pH con carbonato cálcico.



Figura 26. Imágenes del cultivo de *Agaricus bisporus*.

El micelio colonizará también la tierra de cobertura, momento en el cual se induce la fructificación con una disminución de la temperatura y una mayor aireación (menos concentración de CO<sub>2</sub>), véanse las características del cultivo de AB en la tabla 4, con las fases de incubación (crecimiento del micelio), preparación después de cubrir con la tierra de cobertura, inducción o formación de primordios y desarrollo del cuerpo fructífero. Los cuerpos fructíferos cubrirán toda la superficie de cultivo recolectándose en 2 o 3 días toda la cosecha. Esta seta es capaz de producir de 3 a 5 cosechas o floradas aunque a nivel comercial se recogen 3 floradas.

Tabla 4. Características de producción de *Agaricus bisporus* en sus fases de cultivo.

<b><i>Agaricus bisporus</i></b>	Incubación	Preparación	Inducción	Desarrollo
T °C	24-26	24-27	16-18	17-18
Humedad Relativa (%)	90-100	90-100	95-100	85-92
Duración (días)	14	8-12		7-10
CO <sub>2</sub> (ppm)	5000-10000	5000-10000	<1000	<1000
Circulación de aire (l/h)	0	0	4	4
Luz (lux)	OSCURIDAD	OSCURIDAD	OSCURIDAD	OSCURIDAD

#### 3.4.2.2 Cultivo de *Agaricus brunnescens* (Portobello)

El cultivo de Portobello es idéntico al del champiñón blanco. La única diferencia es que la cepa es distinta y se producen champiñones de color crema o tostado. El cultivo de esta especie está poco extendido en España y su cultivo se limita a unos pocos productores.



Figura 27.- Imagen del cultivo de *Agaricus brunnescens*.

#### 3.4.2.3 Cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Seta ostra)

Esta variedad de *Pleurotus spp.* es muy tolerante a diferentes niveles de CO<sub>2</sub> y muy sensible a la luz aumentando la pigmentación del sombrero con altos niveles de luminosidad.

En la fase de incubación, el parámetro o factor que guía es la temperatura del interior del sustrato. El objetivo es alcanzar 30°C en el interior del paquete en el menor tiempo posible. Posteriormente irá aumentando la temperatura del interior de los paquetes como consecuencia del calor generado con el crecimiento del micelio.

Durante este proceso se debe comprobar que la temperatura de los paquetes no supere los 30 – 32°C.

Pasados unos días, la temperatura de los paquetes ira descendiendo progresivamente hasta finalizar la fase de incubación. La situación ideal es realizar las fases de incubación y de fructificación en la misma sala de cultivo solo modificándose las condiciones ambientales.



Figura 28. Imágenes del cultivo de *Pleurotus ostreatus*

En la fase de inducción a la fructificación y desarrollo de las setas se controlan cuatro factores: luz, temperatura ambiente, ventilación y humedad relativa tal y como se muestra en la Tabla 5. Se necesitan de 8 a 10 h. de luz diaria (natural ó artificial), a partir del momento en el que se detecten la presencia de fructificaciones. La temperatura óptima de desarrollo de las setas depende de la variedad, como regla general, oscila entre 10 y 21 °C y se recolectan cuando son jóvenes y en racimos. Durante la fase de fructificación se necesita un aporte continuo de aire nuevo y húmedo. Las humedades más habituales oscilan del 85-90 % y, al igual que los *Agaricus*, puede producir más de una florada, de 3 a 4 generalmente en 55 días aproximadamente. El inconveniente de esta seta es que tiene vida útil corta.

Tabla 5. Características de producción de *Pleurotus ostreatus* en sus fases de cultivo.

<i>Pleurotus ostreatus</i>	Incubación	Inducción	Desarrollo
T °C	24-28	10-16	10-21
Humedad Relativa (%)	85-90	95-1000	85-90
Duración (días)	12-21	3-5	4-7
CO <sub>2</sub> (ppm)	5000-20000	<1000	<1000
Circulación de aire (l/h)	1	4-8	4-8
Luz (lux)	OSCURIDAD	1000-1500	1000-1500

#### 3.4.2.4 Cultivo de *Pleurotus eryngii* (seta de cardo)

Una vez realizado el sustrato de la seta de cardo, se pasan las bolsas a la sala de incubación a 25°C unas 2 o 3 semanas. Cuando el sustrato es invadido completamente por el micelio, las bolsas se trasladan a las salas de cultivo, donde se rasca la superficie

del sustrato (sin abrir la bolsa). Este rascado junto con una disminución de temperatura inducen la fructificación (12-14°C). Cuando los primordios empiezan a aparecer se abren las bolsas para que se puedan desarrollar, en esta fase la humedad relativa de las salas debe ser muy alta, casi del 100%.



Figura 29. Primordios y carpóforos de *Pleurotus eryngii*.

Cuando los primordios tienen el tamaño de un guisante se abren las bolsas para que tengan más cantidad de oxígeno. Aproximadamente una semana después de que aparezcan los primeros primordios (Figura 29), ya están listos para su recolección. Para extraer los cuerpos fructíferos del sustrato es necesaria la utilización de un cuchillo pequeño, ya que los tallos son muy firmes y están fuertemente unidos al micelio.

Una vez recolectada la primera florada se pueden limpiar los sacos e inducir una segunda florada, en total unos 45 días. Para esto es necesario repetir las fases de inducción y desarrollo, eliminando los restos de micelio de la superficie y subiendo la temperatura para que el micelio pueda volver a crecer. Cuando el micelio vuelve a colonizar la parte superior del sustrato se vuelve a bajar la temperatura (12-14°C) y se repite el ciclo, tabla 6.

Tabla 6. Características de producción de *Pleurotus eryngii* en sus fases de cultivo.

<i>Pleurotus eryngii</i>	Incubación	Inducción	Desarrollo
T °C	25	12-14	15-18
Humedad Relativa (%)	90-95	95-100	85-90
Duración (días)	15-21	7	7-10
CO2 (ppm)	5000-20000	500-1000	<2000
Circulación de aire (l/h)	1	4-8	4-5
Luz (lux)	Oscuridad	500-1000	500-1000

Esta especie es muy sensible a la mancha bacteriana causada por *Pseudomonas tolaasii*, por lo que hay que tener especial atención a que no se condense agua sobre la superficie de las setas o a la desinfección de las salas entre un ciclo de cultivo y el siguiente.

#### 3.4.2.5 Cultivo de *Agrocybe aegerita* (seta de chopo):

El cultivo de seta de chopo o *Agrocybe aegerita* es un cultivo muy extendido en el norte de Italia. Para inducir a la fructificación en las salas de cultivo no se rasca la superficie del sustrato, sino que se hacen pequeños agujeros en los laterales de las bolsas (2-3 agujeros por bolsa).



Figura 30. Carpóforos de *Agrocybe aegerita*.

Durante el desarrollo de los carpóforos (Figura 30), la temperatura no debe ser inferior de 18°C ya que las bajas temperaturas reducen los rendimientos finales, tabla 7. Esta seta, que crece en modo de racimos, puede recogerse de 1 hasta 4 floradas en cada cultivo.

Tabla 7. Características de producción de *Agrocybe aegerita* en sus fases de cultivo.

<b><i>Agrocybe aegerita</i></b>	Incubación	Inducción	Desarrollo
T °C	25	16-18	20-22
Humedad Relativa (%)	90-95	95-98	85-90
Duración (días)	30-40	9-11	4-7
CO2 (ppm)	5000-20000	2000-3000	1000-2000
Circulación de aire (l/h)	1 l/h	Sin aire	Muy baja
Luz (lux)	Oscuridad	500-1000	1000

#### 3.4.2.6 Cultivo de *Ganoderma lucidum* (Reishi o seta de la inmortalidad))

El uso de *Ganoderma lucidum* se extiende a más de 2000 años, se conoce por primera vez en china en el año 200 antes de Cristo. Este hongo se caracteriza por la larga duración de su ciclo productivo.

El proceso de incubación se realiza en una sala a 28°C y en completa oscuridad durante 6-8 semanas. Cuando el sustrato es invadido completamente por el micelio, las bolsas se trasladan a las salas de cultivo, donde se realiza un corte en el lateral de las bolsas. Este corte, y una disminución de la temperatura inducen la fructificación (18°C).



Figura 31. Carpóforos de *Ganoderma lucidum*

Aproximadamente 8-12 semanas después del traslado a las salas de cultivo, comienzan a aparecer los primeros primordios. La maduración de los cuerpos fructíferos es lenta, tardando unas 2-3 semanas en alcanzar un tamaño adulto. Para extraer los cuerpos fructíferos del sustrato es necesaria la utilización de un cuchillo pequeño, ya que los tallos son muy firmes y están fuertemente unidos al micelio. Se ha observado que los cuerpos fructíferos difieren mucho en función de la cepa utilizada. Algunos carpóforos son de color rojo barnizado (figura 31 izquierda), en forma de riñón de unos 15-20 cm de diámetro mientras que otras cepas fructifican con la morfología conocida como “cuerno de ciervo “ (figura 31 derecha), produciendo carpóforos alargados de hasta 30 cm de largo. Este hongo puede producir varias floradas espaciadas entre 90-120 días. Las características de su cultivo se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Características de producción de *Ganoderma lucidum* en sus fases de cultivo.

<b><i>Ganoderma lucidum</i></b>	Incubación	Inducción (cuernos)	Inducción (puntas)	Desarrollo
T °C	21-27	18-24	21-27	21-27
Humedad Relativa (%)	95-100	95-100	95-100	90-95
Duración (días)	10-20	14-28	14-28	60
CO2 (ppm)	>50000	20000-40000	5000-20000	<2000
Circulación de aire (l/h)	0-1	0-1	0-1	0-1
Luz (lux)	OSCURIDAD	200-500 (4-8 horas)	500-1000 (12 horas)	750-1500 (12 horas)

Los cuerpos fructíferos de *Ganoderma lucidum* producen gran cantidad de espora de color marrón oscuro y su cuerpo fructífero se consume extraído con agua caliente para té, jarabes y sopas debido a su textura acorchada y fibrosa.

#### **3.4.2.7 Cultivo de *Hericiium erinaceus* (seta pom-pom, melena de león)**

La especie *Hericiium erinaceus*, es muy apreciada no sólo por su sabor sino por las cualidades medicinales que se le otorgan. Los rendimientos de esta especie son menores que en las otras especies ya que las fructificaciones por bolsas son menos numerosas y su contenido de agua es menor que en otras especies. Se pueden obtener de 1 a 3 floradas.





Figura 32. Carpóforos y cuerpos fructíferos de *Hericiium erinaceus*.

Al igual que en el caso de *Agrocybe aegerita*, se recomienda la realización de agujeros de pequeño tamaño (3-5 mm) en los laterales de las bolsas para inducir la fructificación y facilitar la recogida de los cuerpos fructíferos (2-3 agujeros por bolsa). Se puede hacer más número de agujeros para conseguir carpóforos de menor tamaño. Los cuerpos fructíferos de esta especie son de color marfil y de unos 8-10 cm de diámetro (Figura 32).

Las temperaturas demasiado bajas y la circulación de aire seco durante la fase de fructificación pueden cambiar el color de primordios a tonos rosados (Tabla 9). Además, las concentraciones muy altas de CO<sub>2</sub> favorecen que los carpóforos se queden blandos.

Tabla 9. Características de producción de *Hericiium erinaceus* en sus fases de cultivo.

<b><i>Hericiium erinaceus</i></b>	Incubación	Inducción	Desarrollo
T °C	25	16-18	16-20
Humedad Relativa (%)	90-95	95-98	90-95
Duaración (días)	30-40	6-10	6-9
CO <sub>2</sub> (ppm)	5000-20000	1000-2000	800-1000
Circulación de aire (l/h)	1	Muy baja	Muy baja
Luz (lux)	Oscuridad	500-1000	1000

Los carpóforos se deben recoger cuando los “pelos” o “espinas” que lo componen están rectos ya que, si se dejan más tiempo, se curvan y pueden tener un sabor amargo.

#### 3.4.2.8 Cultivo de *Hypsizygus tessulatus* variedades blanca y gris (Seta de haya, shimeji)

La seta de haya (Figura 33), dispone de dos variedades: gris y blanca. El cultivo de esta especie depende del tipo de cepa o variedad. En el caso de la variedad gris, el ciclo es más corto que para la variedad blanca.



Figura 33. Primordios y carpóforos de *Hypsizygus tessulatus*.

Como para muchas especies, para inducir la fructificación se necesitan una bajada de temperatura y un rascado de la superficie del sustrato. Mantener una humedad muy alta es muy importante en la fase de formación de los primordios, en la cual, es necesario evitar al máximo las corrientes de aire ya que los primordios son muy sensibles, tabla 10. Para evitar estos problemas se induce la fructificación con las bolsas cerradas. También es recomendable, disponer de luz vertical en la parte alta de cada estantería ya que esta especie crece hacia la luz y si las luminarias están colocadas en los laterales de la nave los cuerpos fructíferos se estiran y deforman buscando la luz.

Tabla 10. Características de producción de *Hypsizygus tessulatus* en sus fases de cultivo.

<b><i>Hypsizygus tessulatus</i></b>	Incubación	Inducción	Desarrollo
T °C	25	15-18	13-17
Humedad Relativa (%)	90-95	99-100	99-100
Duración (días)	80-100 (gris) 120 (blanca)	14-20	6-18
CO <sub>2</sub> (ppm)	5000-20000	2000-2500	1000-2000
Circulación de aire (l/h)	1 l/h	SIN AIRE	MUY BAJA
Luz (lux)	OSCURIDAD	1000	1000

#### 3.4.2.9 Cultivo de *Hypsizygus ulmarius* (Seta de olmo)

La seta de olmo se parece mucho morfológicamente a *Pleurotus ostreatus* pero siendo más agradable en sabor y textura, con un color más claro, casi blanco. Según Stamets (1993) la seta de olmo solo es comparable en calidad, sabor y textura, con *P. eryngii* y *H. tessulatus*. A continuación, tabla 11, se muestran las condiciones necesarias para su cultivo.

Tabla 11. Características de producción de *Hypsizygus ulmarius* en sus fases de cultivo.

<b><i>Hypsizygus ulmarius</i></b>	Incubación	Inducción	Desarrollo
T °C	21-27	10-13	13-18
Humedad Relativa (%)	95-100	98-100	94-98
Duración (días)	14-21	5-10	4-7
CO2 (ppm)	>10000	<1000	600-1500
Circulación de aire (l/h)	0-1	4-8	4-8
Luz (lux)	OSCURIDAD	500-1000	500-1000

Cuando el sombrero crece hasta estar en forma convexa, el crecimiento lateral continúa, implicando un aumento en el rendimiento. Si se recolectan las setas demasiado pronto se pierde rendimiento, no como en otras setas en las que esta forma significaría el final del crecimiento del hongo. Sin embargo, si las setas se cogen muy maduras, producen una gran cantidad de esporas que pueden dañar los sensores y filtros de las salas o la salud de los trabajadores. Este hongo produce 2-3 floradas con una semana entre ellas.



Figura 34. Carpóforos de *Hypsizygus ulmarius*.

#### 3.4.2.10 Cultivo de *Lentinula edodes* (Shiitake)

*Lentinula edodes* se incuba como mínimo 4 semanas a 25°C en oscuridad. Cuando el sustrato ha sido invadido completamente por el micelio, las bolsas se trasladan a las salas de cultivo. Para inducir la fructificación los sacos se pueden sumergir en agua sin el plástico o se pueden pinchar las bolsas con el sustrato y se llenan de agua durante 24 horas. Alrededor del paquete se forma como una corteza de micelio de color oscuro. Aparecen unas formaciones llamadas “blistering” o “popcorning” que son los precursores de los primordios (justo en el momento en que el carpóforo empieza a salir.)



Figura 35. Detalle del “pop-corn” o “blistering” en los sacos de *Lentinula edodes*.



Figura 36. Primordios y carpóforos de *Lentinula edodes*.

La humedad en el cultivo debe ser muy alta, en la primera florada debe ser del 98%, por eso se recomienda regar la superficie de los sacos a diario y esperar a que baje la humedad para recolectar, tabla 12. Para la segunda florada se suele esperar de 7 a 10 días manteniendo la temperatura a 20°C y bajando la humedad al 80-90%. Puede llegar a dar cinco floradas, pero se realizan ciclos de no más de tres, cada 2-3 semanas durante 8-12 semanas.

Tabla 12. Características de producción de *Lentinula edodes* en sus fases de cultivo.

<b><i>Lentinula edodes</i></b>	Incubación	Inducción	Desarrollo
T °C	21-27	16-21	21-27
Humedad Relativa (%)	95-100	95-100	60-80
Duración (días)	35-70	5-7	5-8
CO2 (ppm)	>10000	<1000	<1000
Circulación de aire (l/h)	0-1	4-7	4-8
Luz (lux)	50-100	500-2000	500-2000

#### 3.4.2.11 Cultivo de *Pholiota nameko* (nameko)

De este cultivo se pueden obtener numerosas floradas, pero generalmente se utilizan las dos primeras con una duración de 60 días. Las bolsas permanecen cerradas hasta que se forman los primeros primordios, para mantener una humedad muy alta en la superficie del sustrato. Una vez desarrollados se corta la parte de arriba de la

bolsa dejando la superficie del sustrato al descubierto, por donde se desarrollarán las setas. Para inducir una mayor fructificación se realiza un primer riego.

La superficie de los carpóforos es de color naranja brillante, con un recubrimiento gelatinoso del mismo color y son de pequeño tamaño pero muy numerosos creciendo en forma de racimos, (Figura 37).



Figura 37. Primordios y carpóforos de *Pholiota nameko*.

*Pholiota nameko* es más sensible a la humedad y el CO<sub>2</sub> que otras setas. En la formación de primordios se deja una niebla en la sala de cultivo y para iniciar la formación del cuerpo fructífero se baja la temperatura a 10-15°C y se aumentan la humedad relativa a 98-100% con niveles de luminosidad >500 lux, tal y como puede apreciarse en la tabla 13. La humedad en el cultivo debe ser muy alta, incluso se recomienda regar la superficie de los sacos a diario.

Tabla 13. Características de producción de *Pholiota nameko* en sus fases de cultivo.

<i>Pholiota nameko</i>	Incubación	Inducción	Desarrollo
T °C	25	10-15	13-17
Humedad Relativa (%)	90-95	98-100	90-95
Duración (días)	30-70	6-9	6-7
CO <sub>2</sub> (ppm)	5000-20000	2000-2500	2000-2500
Circulación de aire (l/h)	1 l/h	SIN AIRE	2-3 cm/s
Luz (lux)	OSCURIDAD	>500	<500

#### 3.4.2.12 Cultivo de *Pleurotus citrinopileatus* (Seta de ostra amarilla)

Es uno de los hongos más espectaculares debido a su color amarillo brillante. De hecho, la intensidad de color del sombrero está directamente relacionada con la intensidad de luz de las salas (Stamets and Chilton 1983). Las bolsas de *Pleurotus citrinopileatus* no se abren como en otras variedades. Primero se les hace un agujero de unos 3-5cm<sup>2</sup> para facilitar la salida de los primordios y después, se desarrolla el "racimo" de setas. Los racimos de setas divergen de una única base desde la que se va desarrollando cada carpóforo. La seta de ostra amarilla es una seta tolerante a las altas temperaturas, pero no aparecen primordios por debajo de 16-18°C. Es bastante

productiva pudiendo recolectarse 4 o incluso 6 floradas, sin embargo es extremadamente frágil en postcosecha, lo cual limita su distribución. En la tabla 14 se muestran sus características de cultivo.

Tabla 14. Características de producción de *Pleurotus citrinopileatus* en sus fases de cultivo

<b><i>Pleurotus citrinopileatus</i></b>	Incubación	Inducción	Desarrollo
T °C	24-29	21-27	21-29
Humedad Relativa (%)	90-100	98-100	90-95
Duración (días)	10-14	3-5	3-5
CO <sub>2</sub> (ppm)	5000-20000	<1000	<1000
Circulación de aire (l/h)	1-2	4-8	4-8
Luz (lux)	OSCURIDAD	500-1000	500-1000



Figura 38. Carpóforos de *Pleurotus citrinopileatus*.

### 3.5 Tratamiento con pulsos eléctricos de moderada intensidad de campo

Se realizaron dos tipos de aplicación de Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo (PEMIC): a sacos ya incubados de PE y LE en el momento previo a la fructificación y a diferentes cuerpos fructíferos de setas recogidas en su estado óptimo de recolección (AB, PO, PE, LE y GL).

#### 3.5.1 Tratamiento con pulsos eléctricos a los paquetes en las instalaciones del CTICH

El paquete con el sustrato se sitúa entre dos electrodos, el de tierra y el de alto voltaje, tal y como se muestra en la figura 39, y entre ellos se genera una diferencia de potencial, lo que hace que se forme un campo eléctrico en el producto.

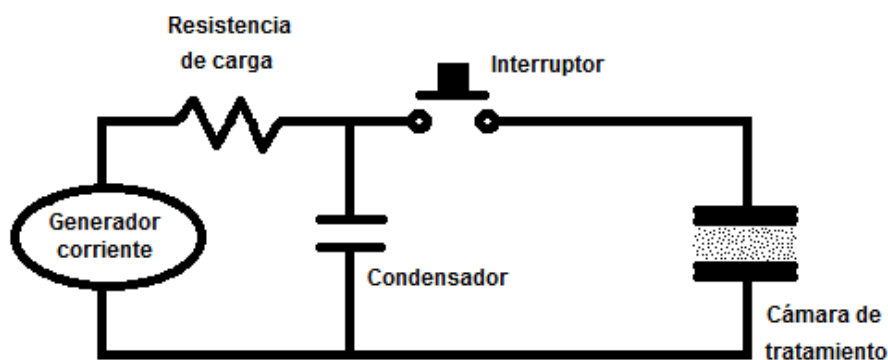


Figura 39. Esquema de la aplicación de PEMIC a paquetes de sustrato.

Se han aplicado nueve tratamientos a los paquetes de *Pleurotus eryngii* y *Lentinula edodes* al pasar de las salas de incubación a las salas de cultivo, en la fase previa a la fructificación y se han comparado respecto a un control. Los tratamientos aplicados se presentan en la tabla 15.

Tabla 15. Tratamientos de pulsos eléctricos de intensidad de campo moderada aplicados a los paquetes de *Pleurotus eryngii* y *Lentinula edodes*.

Intensidad	Número Pulsos	Duración del Pulso	Abreviatura
0,3 KV/cm	2	1 $\mu$ s	0,3-2p
	5		0,3-5p
0,7 KV/cm	2		0,7-2p
	5		0,7-5p
1 KV/cm	2		1-2p
	5		1-5p
0,3 KV/cm	1	10 segundos	0,3-10s
0,7 KV/cm			0,7-10s
1 KV/cm			1-10s

Con estos tratamientos se pretende observar las diferencias entre intensidades de campo, 0,3, 0,7 y 1kV/cm, y número de pulsos, 2 y 5, y se añaden tres tratamientos con un único pulso de 10 segundos de duración.

### 3.5.2 Tratamiento con pulsos eléctricos a los cuerpos fructíferos de setas recolectadas en las instalaciones de la Universidad de Lleida

El equipo de tratamiento, ubicado en la planta piloto del departamento de tecnología de alimentos de la Universidad de Lleida, se compone de tres elementos: generador de pulsos de alto voltaje, panel de control y cámara de tratamiento. El circuito está formado por una resistencia y un condensador, que para cargarlo es necesaria una fuente de alto voltaje. Mediante el panel de control se acciona el interruptor que permite la descarga sobre el alimento situado en el interior de una

base de metacrilato con agua en la cámara de tratamiento, que actúa como resistencia. Los pulsos aplicados son monopolares de caída exponencial.

El generador de pulsos de alto voltaje se encuentra en el interior de la verja. Principalmente se compone de tres elementos (Figura 40): una fuente de alto voltaje, utilizada para cargar de energía al condensador y un interruptor de alto voltaje accionado desde el panel de control.

El panel de control se compone de dos secciones, de gas y de control eléctrico. El panel de control de gas se utiliza para regular la presión de SF<sub>6</sub> en el interior del interruptor de alta tensión. El panel de control eléctrico se utiliza para seleccionar el voltaje máximo del pulso aplicado y para accionar el interruptor de alto voltaje con la ayuda de una fuente de alto voltaje (6000 V) en su interior.

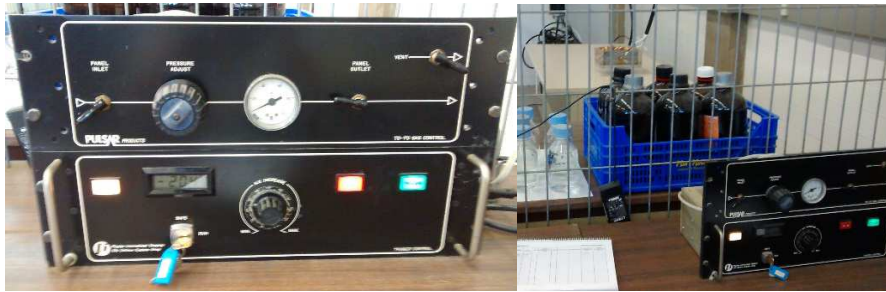


Figura 40. Panel de control y cámara de tratamiento del equipo PEF de la Universidad de Lérida.

Como medida de protección parte del equipo se encuentra cercado por una reja de protección que debe estar cerrada con un candado cuando el equipo está fuera de uso y cerrada durante el tratamiento. Tanto el equipo como la reja tienen tomas de tierra, de baja y alta tensión, independientes de las del edificio. Además, para entrar en la zona de tratamiento mientras se usa, es obligatorio asegurarse que el equipo está descargado. El operador se sube a un taburete, resistente a tensiones de 40 kV, con una pértiga de descarga (tensión de servicio 30 kV) unida a la toma de tierra de alta tensión. Es necesario tocar los bornes (cocodrilos) de conexión con la punta de la pértiga de descarga.

Las variedades de setas utilizadas en este experimento son: *Agaricus bisporus* (AB), *Pleurotus ostreatus* (PO), *Pleurotus eryngii* (PE), *Lentinula edodes* (LE) y *Ganoderma lucidum* (GL), a las cuales se aplicaron 5 tratamientos (tabla 16).



Tabla 16. Tratamientos de pulsos eléctricos de intensidad de campo moderada aplicados a los cuerpos fructíferos de las setas *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Lentinula edodes* y *Ganoderma lucidum*.

CONTROL	
1,2 KV/cm 5 pulsos	2 KV/cm 5 pulsos
1,2 KV/cm 18 pulsos	2 KV/cm 18 pulsos
1,2 KV/cm 30 pulsos	2 KV/cm 30 pulsos

Una vez realizados los tratamientos, se dejan 24 horas en frío y se congelan para su posterior liofilización.

### 3.6 Preparación y análisis de las setas liofilizadas

Una vez recolectados los hongos, se procede en el laboratorio a su limpieza, troceado y congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su liofilización (figura 41). El proceso de limpieza consiste en eliminar, sin utilización de agua, las partes que contienen turba o tierra de cobertura de las setas y aquellas que presentan marcas o defectos, utilizando una tabla de cortar y un cuchillo. Posteriormente se trocean, se introducen en bolsas de plástico y se congelan. Una vez congelados, se liofilizan en balones con unos 100g de la seta a  $-55^{\circ}\text{C}$  durante 48-72h hasta que el peso de los balones es constante. (Christ ALPHA 1-2 LDplus, Martin Christ, Osterode (Alemania))

Transcurrida la liofilización se trituran los liofilizados con la ayuda de un molinillo de café eléctrico inoxidable (JATA ML-469) hasta conseguir un fino polvo. Los liofilizados se conservan en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$  en botes de plástico cerrados con parafilm, envueltos con papel de aluminio para protegerlos de la luz y se codifican.



Figura 41. Preparación de las setas para su liofilización.

#### 3.6.1 Determinación de la composición centesimal.

Las determinaciones de la composición centesimal se realiza siguiendo los métodos de AOAC (2000), excepto en los carbohidratos totales y energía que se calculan por diferencia. Todos los parámetros, excepto la humedad, se realizan con setas liofilizadas por lo que los resultados son en base a peso seco.

### 3.6.1.1 Contenido en Humedad (%)

Se pesan aproximadamente 3g de seta fresca en placas de aluminio y se secan a 70°C durante 24 horas hasta peso constante (Conterm, Selecta, Barcelona, España). Se introduce la muestra en el desecador antes de pesar. Los resultados se expresan el porcentaje de humedad calculados según:

$$\% \text{ Humedad} = [(P_i - P_f)/P_i] \times 100$$

P<sub>i</sub>: Peso de muestra inicial;

P<sub>f</sub>: Peso de muestra tras el secado.

### 3.6.1.2 Contenido en Cenizas (%)

Para la determinación de cenizas se sigue el método 923.03 de la AOAC. Se calcina la muestra liofilizada a 550°C en la mufla (10PR400PAD`P, Horbesal, Barcelona, España) y se calcula el residuo de incineración por diferencia de peso. Los resultados se expresan como porcentaje de cenizas calculado según la expresión siguiente:

$$\% \text{ Cenizas} = [(P_{\text{Peso final}} - P_{\text{Peso inicial}})/P_{\text{Peso muestra}}] \times 100$$

### 3.6.1.3 Contenido en Grasas (%)

El contenido de grasa se obtiene mediante la extracción con sistema Soxhlet durante 6 horas y posterior secado en estufa a 105°C.

Se pesan 5 gramos de muestra liofilizada en el dedal de extracción previamente pesado. Se seca en el matraz de extracción durante 30 minutos a 105°C y se pesa el matraz de extracción para ponerlo en el sistema Soxhlet con el solvente, unos 250 ml de éter de petróleo, y el dedal en el tubo de extracción. Se extrae la muestra de 6 a 8 horas a una velocidad de condensación de 3 gotas por segundo. Una vez terminada la extracción se elimina el solvente por evaporación en rotavapor, hasta que no se detecta olor a éter. Se seca el matraz con la grasa en estufa a 80-90°C hasta que está completamente seco, se enfria en desecador y se pesa.

$$\% \text{ grasa gruda} = ((m_2 - m_1)/m) \times 100$$

$$\% \text{ grasa cruda en base seca} = \% \text{ grasa cruda} \times (100/(100 - \% \text{ humedad}))$$

Dónde:

m: peso de la muestra

m<sub>1</sub>: tara del matraz

m<sub>2</sub>: peso matraz con grasa

### 3.6.1.4 Contenido en Proteínas (%)

El contenido de proteína en las setas liofilizadas se obtiene mediante el método Kjeldhal, siguiendo la técnica general de la AOAC (2000), donde se determina el contenido de nitrógeno, para ser transformado a través de un factor en proteína. Aunque el factor que la norma toma para esta determinación es de 6,25, dado que las setas tienen una cantidad relativamente alta de nitrógeno no proteico, y teniendo en

cuenta investigaciones al respecto (Crisan and Sands, 1978, Zakia Bano and Rajarathnam, 1988 y Shashireka et al., 2005), se utiliza un factor de conversión de 4,38 para la determinación de proteína.

Se pesa 1 g de seta liofilizada en un tubo de digestión de 250ml y se añaden cuatro pastillas de catalizador a cada tubo y 12ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Se introducen los tubos en el bloque digestor previamente calentado, 2020 Digestion Unit, Tecator, (Suecia), se enciende la campana extractora, se coloca la trompa encima de los tubos y se abre el agua de refrigeración. Se mantiene una hora y media a 400°C y se deja enfriar. El destilador de nitrógeno (FOSS Kjeltec 8200 Tecator line (Denmark) adiciona 60ml de agua, 50ml de álcali y 30ml de ácido bórico (4%) y el destilado se recoge sobre un vaso de plástico que se lleva a un valorador semiautomático (CRISON, PH-Burete 24 1s, España).

#### **3.6.1.5 Contenido en Carbohidratos totales (%)**

El contenido de carbohidratos totales se calculó a partir de las siguientes ecuaciones (Manzi et al., 2004).

$$\text{Carbohidratos totales (\%)}: 100 - (\% \text{proteínas} + \% \text{grasas} + \% \text{cenizas})$$

#### **3.6.1.6 Energía (Kcal)**

El contenido de energía total se calculó a partir de las siguientes ecuaciones (Manzi et al., 2004)

$$\text{Energía Total (Kcal)}: 4 * (\% \text{proteína} + \% \text{carbohidratos}) + 9 * \% \text{grasas}$$

#### **3.6.2 Determinación de Fibra Dietética Total, Insoluble y Soluble**

La fibra alimentaria se determinó siguiendo el método enzimático-gravimétrico oficial AOAC 991.43 (Association of Official Analytical Chemists 1995): Total, Soluble and Insoluble Dietary Fibre in Foods, basado en los métodos de Prosky 1992 y Lee 1993.

## Esquema AOAC Fibra

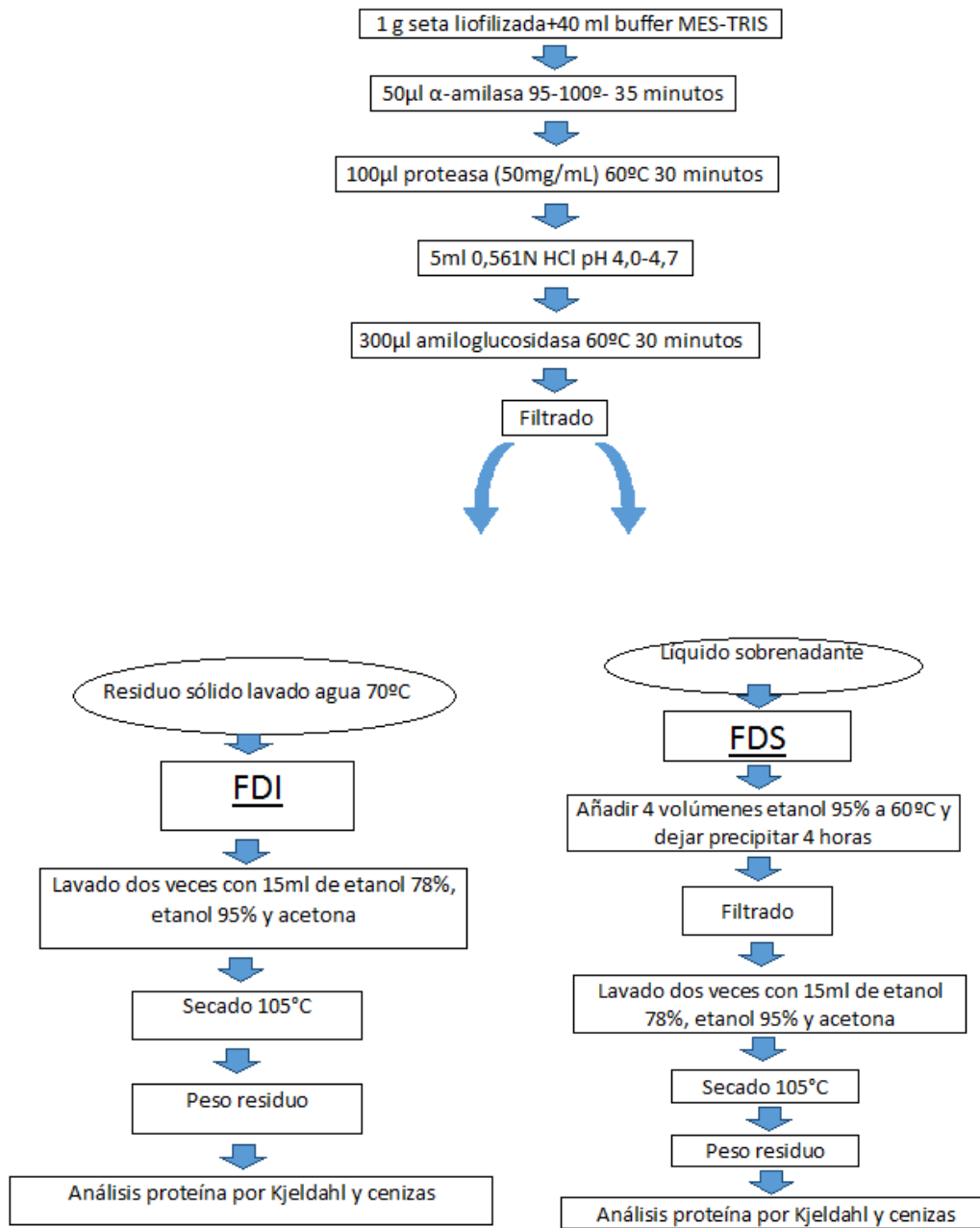


Figura 42. Esquema de la determinación de Fibra dietética soluble (FDS), insoluble (FDI) y total (FDT).

Se pesa 1g del hongo liofilizado junto con los blancos de reactivos en cada análisis. Se agregan 40ml del buffer MES-TRIS ajustado a pH 8,2 a 24°C y se agita para evitar la formación de grumos con un agitador magnético. Se añade a cada muestra y a cada blanco 50µl de solución de α-amilasa termoestable (Sigma Aldrich A3306) y se introducen, tapados con papel de aluminio, en un baño de agua con agitación a 95-

100°C durante 35 minutos y dejándolos enfriar hasta 60°C. Las paredes del vaso se limpian con 10ml de agua para arrastrar la muestra adherida.

A continuación se añaden 100µl de solución de proteasa (50mg/mL) (Sigma Aldrich P3910) a las muestras y blancos. Los vasos cubiertos se incuban en baño de agua a 60°C, con agitación continua durante 30 minutos. Se añaden 5ml de 0,561 N HCl y se ajusta a pH 4,0-4,7 con 1N NaOH o 1N HCl. Es importante que la temperatura de la muestra se mantenga a 60°C ya que el pH podría aumentar a temperaturas más bajas. Por último se añaden 300 µl de solución de amiloglucosidasa (Sigma Aldrich A9913), se cubren los vasos y se incuban en baño de agua a 60°C durante 30 minutos en continua agitación.

### **3.6.2.1 Fibra dietética insoluble, soluble y total**

Para la etapa de filtración se utilizan embudos Büchner de borosilicato esmerilados 29/32 y diámetro de 40mm con placa filtrante de porosidad 40-90 µm y de 80 ml de capacidad. Se pesan los embudos secos, y a cada uno se le añade una cama de agente filtrante Celite de aproximadamente 1,0 gramo; se humedece con 3ml de agua destilada, se redistribuye y aspira para formar una capa uniforme de Celite, registrando el peso de cada uno. Con la ayuda de la bomba de vacío se filtran las muestras a través de los embudos, reservando cada filtrado en un Kitasato debidamente identificado para la determinación de FDS. Cada residuo se lava dos veces con 10 ml de agua destilada precalentada a 70°C. Los lavados de agua se suman a su correspondiente filtrado, y se guardan para la determinación de FDS.

#### **A) FDI**

Los residuos se lavan dos veces con 15 ml de etanol 78%, etanol 95% y acetona y se secan los embudos con el residuo en estufa a 105°C durante toda la noche. Los crisoles se enfrían en un desecador y se pesan. Las cenizas de los residuos se analizan y se determina el contenido de proteína por el método Kjeldahl.

#### **B) FDS**

Cada solución con sus lavados de agua se filtra y pesa en su respectivo vaso previamente tarado. Se añaden 4 volúmenes de etanol 95% precalentado a 60°C y se deja precipitar a temperatura ambiente durante 60 minutos. Antes de filtrar se ponen los embudos con Celite del mismo modo que para FDI, sólo que en este caso se humedece el lecho de Celite con etanol 78% en lugar de agua destilada; se registra el peso de cada uno, antes y después de agregar Celite. Por último, se filtra cada precipitado a través de un crisol con Celite, trasvasando todo el líquido y precipitado de manera cuantitativa utilizando una bomba de vacío. Los residuos se lavan y se procede de la misma manera que en la Fibra Insoluble.

### 3.6.3 Determinación $\beta$ -glucano

La determinación de  $\beta$ -glucano se cuantifica mediante el kit enzimático "Mushroom and Yeast  $\beta$ -glucan Assay Procedure K-YBGL 09/2014" (Megazyme, Ireland).

En las determinaciones descritas por el kit se obtienen los contenidos en  $\alpha$ -glucanos y Glucanos Totales, así como los contenidos en D-glucosa en oligosacáridos, sacarosa y D-glucosa libre. Muchos estudios han realizado sus determinaciones con el mismo kit sin tener en cuenta los oligosacáridos o monosacáridos presentes ya que el  $\beta$ -glucano, el compuesto bioactivo de interés, se obtiene por diferencia. (Papaspyridi et al., 2010, Synytsya et al., 2008 y 2009, McCleary and Draga 2016 y Sari et al., 2017).

#### 3.6.3.1 Determinación de glucanos totales ( $\alpha$ -glucanos+ $\beta$ -glucanos)

Para realizar la solubilización e hidrólisis parcial de los glucanos totales se añade la muestra liofilizada (100mg) a un tubo Pyrex de 20 x 125 mm. Se adicionan 1,5 ml de HCl concentrado (37% v/v) a cada tubo y se tapan y agitan vigorosamente en un vórtex. Los tubos se colocan en un baño de agua a 30°C durante 45 minutos y se agitan en el vórtex cada 15 min para asegurar la completa disolución del  $\beta$ -glucano. Se añaden 10 ml de agua a cada tubo, se cierran y agitan en un vórtex. Después de 5 minutos a 100°C se aprietan los tapones y se continúan incubando durante 2 horas. Los tubos se dejan enfriar a temperatura ambiente y se añaden 10ml de KOH 2N para enrasarlos posteriormente a 100ml utilizando tampón acetato de sodio 200mM (pH 5,0) y ajustar el volumen. Una alícuota de la mezcla se centrifuga a 1500g durante 10min.

Para la determinación de glucanos totales, alícuotas de 0,1ml (por duplicado) de extractos centrifugados se transfieren al fondo de tubos de vidrio Pyrex (16 x 100 mm). Al fondo de cada tubo se añade una mezcla, 0,1 ml, de exo-1,3-glucanasa (20 U/ml) más  $\beta$ -glucosidasa (4 U/ml) en tampón acetato de sodio 200 mM (pH 5,0), se mezclan en un vórtex e incuban a 40°C durante 60 min. Proporcionado por el kit, se añaden 3,0ml de mezcla de glucosa oxidasa/peroxidasa a cada tubo e incuban a 40°C durante 20min. La absorbancia de todas las diluciones se mide a 510 nm frente a un blanco de reactivo.

#### 3.6.3.2 Determinación de $\alpha$ -glucanos

La muestra de seta liofilizada (100 mg) se añade a tubos Pyrex de 20 x 125 mm. Se introduce una barrita magnética agitadora (5 x 15 mm) y 2 ml de KOH 2 M a cada tubo y se resuspende en un baño de hielo/agua sobre un agitador magnético durante 20 min. Se añaden 8 ml de tampón acetato de sodio 1,2 M (pH 3,8) a cada tubo con agitación e inmediatamente, se adicionaron 0,2 ml de amiloglucosidasa (1630 U/ml) más invertasa (500 U/ml) proporcionada por el kit, se mezcla bien y se colocan los tubos en un baño a 40 °C durante 30 minutos mezclando intermitentemente con un vórtex. Los contenidos de cada tubo se transfieren a un frasco volumétrico de 100 ml y

se ajusta el volumen con agua. Se mezcla bien y una alícuota de la solución se centrifuga a 1500 g durante 10 min.

Alícuotas de 0,1 ml (por duplicado) de los sobrenadantes se transfieren a tubos de vidrio, se añaden 0,1 ml de tampón acetato de sodio (200 mM, pH 5,0) más 3,0 ml de reactivo GOPOD (Glucosa oxidasa más peroxidasa y 4-aminoantipirina en tampón (48 ml, pH 7,4) de ácido p- hidroxibenzoico y ácido sódico (0,4% p/v) e incuban a 40 °C durante 20 min. La absorbancia de las soluciones se mide a 510 nm frente a un blanco de reactivo.

El blanco de reactivo consiste en 0,2ml de tampón acetato de sodio (200mM, pH 5,0) y 3,0ml de reactivo glucosa oxidasa/peroxidasa. El patrón de D-glucosa consta de 0,1ml de patrón D-glucosa (1mg/ml), 0,1ml de tampón acetato de sodio (200mM, pH 5,0) y 3,0 ml de reactivo glucosa oxidasa/peroxidasa.

Los cálculos se realizan con la plantilla que proporciona el kit de Megazyme.

#### 3.6.4 Determinación de quitosano

Para la extracción de quitosano a partir de setas se trabaja también con liofilizado. Se utiliza el método de extracción de Nitschke et al (2011) con algunas modificaciones de Pochanavanich y Suntornsuk (2002). A continuación se presenta un esquema de la metodología utilizada en la determinación de quitosano, Figura 43.

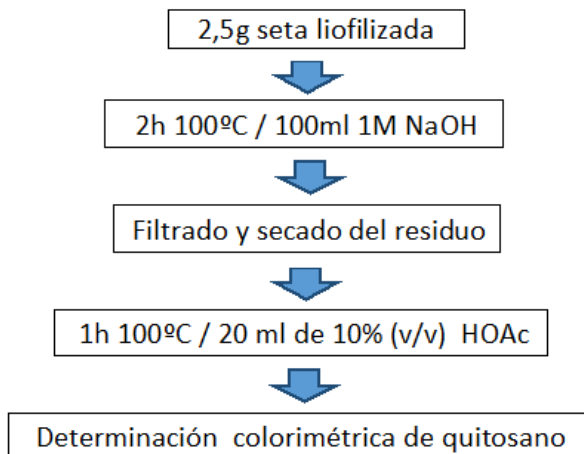


Figura 43. Esquema de la determinación de quitosano.

Se pesan por triplicado 2,5 gramos de cada seta liofilizada, se resuspenden en 100 ml de NaOH 1M y se incuban en un baño a 100 °C durante 2 horas en agitación constante para conseguir la desproteínización de la muestra. Las soluciones se filtran y el residuo se lava varias veces con agua destilada hasta obtener un pH ligeramente superior a 7. Para su posterior utilización se congelan y liofilizan.

El residuo liofilizado se resuspende en 20 ml de 10% (v/v) ácido acético (HOAc) y se sumerge en un baño a 100°C durante 1 hora realizando una hidrólisis ácida. Las muestras se centrifugan y el sobrenadante se utiliza para la determinación de quitosano. Finalmente el quitosano precipita adicionando NaOH al 40% hasta que el pH sea de 10,0 y posteriormente se deja en reposo para una completa sedimentación. El quitosano se recupera por centrifugación, se lava con agua, etanol al 95% (1:20 p/v) y acetona (1:20 p/v), y se seca en estufa a 60°C.

La determinación de quitosano se realiza mediante el método colorimétrico de Ma et al (2013) con el cromóforo 2B realizando las mediciones en el espectrofotómetro a 516nm. El quitosano secado en estufa se disuelve completamente en 2 ml de ácido acético y se diluye con agua destilada a 10 ml. Una cantidad conocida de la solución (10 a 90 mg de quitosano) se mezcla con 1.50 mL del cromotrofo 2B ( $1,2 \times 10^{-3}$  mol/L) y 1,50 ml del buffer Clark-Lubs a pH 3,6 y se ajusta a 10 ml con agua destilada. Esta solución se deja 10 minutos a temperatura ambiente y se leen las absorbancias en el espectrofotómetro a 516 nm frente al blanco de reactivos. La recta patrón se realiza con quitosano 99% (1105508 Chitosan Reference Standard, United States Pharmacopeia (USP), SIGMA-ALDRICH)

### **3.6.5 Antioxidantes**

#### **3.6.5.1 Obtención de extractos:**

Las extracciones con solvente orgánico (metanol) para determinar la capacidad antioxidante de las setas se llevó a cabo según el procedimiento de Pérez-Jiménez y Saura-Calixto (2005). Se pesaron 0,250 g de muestra en un tubo de 2,5ml y se adicionó una solución de metanol y agua (50:50 v/v, pH 2). Se dejó a temperatura ambiente durante una hora en agitación y se centrifugó a 2500 g durante 10 minutos para recoger el sobrenadante. Al residuo se añadió 2,5ml de acetona y agua (70:30 v/v) y se agitó y centrifugó en las mismas condiciones. Ambos sobrenadantes se mezclaron y se enraso el volumen a 5 ml.

Los ensayos de DPPH y ABTS miden la capacidad secuestrante de radicales libres, mientras que el método del poder reductor (FRAP ferric reducing antioxidant power) mide el poder antioxidante total, se trata como iguales a los reductores y a los antioxidantes. Se utilizaron soluciones acuosas de Trolox para realizar la calibración (0,01–0,1 mg/ml). Los resultados se expresaron en  $\eta$ mol equivalentes de Trolox por 100 mg del hongo liofilizado ( $\mu$ g TE/100 mg).

#### **3.6.5.2 Ensayo del radical DPPH. 2,2-Difenil-1-Piricrilhidrazilo:**

El método DPPH se caracteriza por ser una técnica rápida y sencilla que permite determinar la capacidad de captura de radicales libres de un compuesto. Este método fue desarrollado por Brand-Williams et al en 1995, se basa en la reducción de la absorbancia medida a 517 nm del radical DPPH, por antioxidantes. Tiene un color



violeta pero cuando se mezcla con una sustancia capaz de donar un átomo de hidrógeno se forma la especie reducida produciéndose una pérdida de color violeta y aparición del color amarillo. La cuantificación se realiza utilizando patrones de Trolox.

Se siguió la metodología de Rufián-Henares y Morales (2007) en la que 50 µl del extracto se mezcló con 250 µl de la solución DPPH (74 mg/l en metanol). Se dejó durante 60 min y se midió la absorbancia a 520 nm en un lector de placas (Victor X3 multilabel plate reader (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) manteniendo la temperatura de la sala a 30 °C.

### **3.6.5.3 Ensayo ABTS**

Se trata de una reacción de transferencia de un electrón, basada en la capacidad de los antioxidantes para capturar el radical catiónico ABTS•+ (ácido 2,2' azinobis-3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico), captura que produce un descenso en la absorbancia a 658 nm. El descenso producido por el Trolox es comparado con el producido por el antioxidante que se está analizando en el mismo tiempo (Miller et al., 1993).

Para el ensayo de ABTS se empleó el método de Rufián-Henares y delgado-Andrade (2009) con ligeras modificaciones. Se preparó el reactivo ABTS•+ 12-16 horas antes disolviendo ABTS 7mM con 2.45mM persulfato potásico, y se diluyó en etanol y agua 50:50 hasta una absorbancia de  $0.7 \pm 0.02$ . Se utilizaron 20 µl del extracto de cada seta y 280 µl de la solución de ABTS y se incubaron 20 min en oscuridad leyendo las absorbancias a 730nm en el mismo lector de placas. (Victor X3 multilabel plate reader (Perkin-Elmer, Norwalk, CT).

### **3.6.5.4 Ensayo Poder Reductor FRAP (Ferric Reducig Antioxidant Power)**

El principio de este método consiste en que las sustancias que tienen un potencial reductor, reaccionan con el ferricianato de potasio ( $Fe^{3+}$ , ión férrico) para formar ferricianato de potasio ( $Fe^{2+}$ , ión ferroso) el cual reacciona con el cloruro de hierro para formar el complejo ferrocianuro férrico dando lugar a un color azul característico (azul de prusia) que absorbe a 700 nm.

Para el ensayo del poder reductor se empleó el método de Rufián-Henares y Delgado-Andrade (2009). Se mezclaron 280 µl del reactivo FRAP calentado a 37 °C con 20 µl del extracto de setas. El reactivo FRAP contenía 2.5ml de una solución 10mM TPTZ en 40mM HCl, 2.5mL de 20mM  $FeCl_3$  y 25mL de buffer acetato 0.3 M, pH 3.6. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 min en oscuridad y se leyó la absorbancia a 595nm en el lector de placas indicado anteriormente.

### **3.6.5.5 Fenoles Totales**

El ensayo Foin-Ciocalteu, ha sido utilizado durante muchos años como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos naturales. Se trata de una reacción redox, por lo que se considera como método de evaluación de la actividad antioxidante total. Es un método preciso y sensible y la detección se basa en la

aparición en la muestra de una coloración azulada debido a la oxidación de los fenoles con la presencia del reactivo Folin (mezcla de ácido fosfotúngstico  $H_3PW_{12}O_{40}$ ) que se reducen por oxidación de los fenoles, a una mezcla de óxidos azules de tungsteno y molibdeno. Se obtiene una máxima absorbancia a 765 nm y es cuantificado con la ayuda de un espectofotómetro con una recta de calibrado utilizando el ácido gálico como patrón.

El contenido en Fenoles Totales se determinó siguiendo el método colorimétrico Folin-Ciocalteu descrito por Saura-Calixto y Goñi (2006) con alguna modificación. Se mezclaron 10  $\mu$ l de muestra y 10  $\mu$ l del reactivo Folin-Ciocalteu en 96 pocillos y se dejaron 3 min. Se añadieron 200  $\mu$ l de una solución (75 g/l) y se enrasó a 250  $\mu$ l con agua Milli-Q, se mezcló y dejó en oscuridad 60 min. La absorbancia se midió a 750nm en el lector de placas (Victor X3 multilabel plate reader (Waltham, MA)) frente a una curva patrón de ácido gálico (0–200 mg/l). El contenido de Fenoles Totales se expresó como  $\mu$ g equivalentes de ácido gálico por 100 mg de muestra liofilizada ( $\mu$ g GAE/100mg).



## 4 CAPÍTULO I: COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LAS SETAS CULTIVADAS EN LA RIOJA

En la tabla 17 se muestran los 13 hongos, producidos en La Rioja, que han sido utilizados para el estudio de la composición nutricional, cantidad de fibra dietética,  $\beta$ -glucanos, quitosano y actividad antioxidante.

Tabla 17. Nombre científico, común y abreviatura de las setas producidas en La Rioja y caracterizadas para la realización de la Tesis Doctoral.

Nombre científico	Nombre común	Abreviatura
<i>Agrocybe aegerita</i>	Seta de chopo	AA
<i>Agaricus bisporus</i>	Champiñón	AB
<i>Agaricus brunnescens</i>	Portobello	ABp
<i>Ganoderma lucidum</i>	Reishi, seta de la inmortalidad	GL
<i>Hericium Erinaceus</i>	Melena de león, seta pompón	HE
<i>Hypsizigus Tessulatus</i> blanca	Seta de haya (Shimeji)	HTb
<i>Hypsizigus Tessulatus</i> gris	Seta de haya (Shimeji)	HTg
<i>Hypsizigus Ulmarius</i>	Seta de olmo	HU
<i>Lentinula Edodes</i>	Shiitake	LE
<i>P. cornucopiae</i> (var. <i>citrinopileatus</i> )	Seta de ostra amarilla	PC
<i>Pleurotus eryngii</i>	Seta de cardo	PE
<i>Pholiota Nameko</i>	Nameko	PN
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Seta de ostra	PO

### 4.1 Composición centesimal

En las trece setas estudiadas, el contenido de humedad varió de 78,34 g/ 100 g en GL a 92,72g/100 g en AB. Los hongos, en general, contienen un alto porcentaje de humedad que va a depender principalmente de la especie y de otros parámetros de cultivo, como son la humedad de las salas, el sustrato, la florada o el almacenamiento. (Guillamon et al 2010). GL presentó una humedad menor al resto, 78%, aproximadamente un 10% menos que el resto de setas debido a su estructura filamentosa y aspecto acorchado. (Stamets, 1993). Nuestros resultados coincidieron con los de otros autores como Deepalakshmi y Mirunalini (2014) en PO, Khan et al., (2008) en *Pleurotus* spp., o Carneiro et al., (2013) en LE.

El mayor contenido en cenizas fue observado en PO (10,73g/100g), y el más bajo se encontró en la seta GL, (2,2g/100g), que fue similar a los resultados presentados por Mau et al., (2001) y Cheung (1997) (1,77 y 1,7 g/100 g, respectivamente).

Tabla 18. Composición nutricional de setas cultivadas en La Rioja. <sup>a)</sup>

	Humedad (g/100g)	Cenizas (g/100g)	Grasa (g/100g)	Proteína (g/100g)	Carbohidratos (g/100g)	Energía (kcal/100g)
<b>AA</b>	90,45±0,13 <sup>gh</sup>	7,36±0,15 <sup>c</sup>	3,42±0,41 <sup>abc</sup>	19,16±0,34 <sup>d</sup>	70,73±1,60 <sup>defg</sup>	387,18±1,41 <sup>bcd</sup>
<b>AB</b>	92,97±0,03 <sup>j</sup>	10,12±0,02 <sup>e</sup>	3,82±0,13 <sup>abc</sup>	18,82±0,03 <sup>cd</sup>	67,23±0,05 <sup>cde</sup>	378,54±0,76 <sup>bc</sup>
<b>ABp</b>	88,71±1,26 <sup>de</sup>	10,40±0,01 <sup>ef</sup>	1,67±0,11 <sup>a</sup>	27,82±0,28 <sup>f</sup>	60,12±0,21 <sup>b</sup>	366,75±0,53 <sup>a</sup>
<b>GL</b>	78,34±0,07 <sup>a</sup>	2,20±0,07 <sup>a</sup>	4,24±0,15 <sup>bcd</sup>	16,19±0,42 <sup>bc</sup>	77,37±0,33 <sup>gh</sup>	412,40±0,96 <sup>e</sup>
<b>HE</b>	87,14±0,13 <sup>bc</sup>	7,75±0,14 <sup>c</sup>	3,56±0,43 <sup>abc</sup>	15,27±0,02 <sup>b</sup>	73,23±0,21 <sup>efgh</sup>	386,30±2,57 <sup>bcd</sup>
<b>HTb</b>	89,69±0,08 <sup>fg</sup>	8,99±0,19 <sup>d</sup>	2,80±0,28 <sup>abc</sup>	22,31±0,05 <sup>e</sup>	65,96±0,08 <sup>bcd</sup>	377,51±2,60 <sup>ab</sup>
<b>HTg</b>	90,33±0,05 <sup>g</sup>	7,54±0,24 <sup>c</sup>	4,18±0,67 <sup>bcd</sup>	19,34±0,13 <sup>d</sup>	69,09±1,67 <sup>def</sup>	389,98±2,43 <sup>cd</sup>
<b>HU</b>	89,11±0,09 <sup>ef</sup>	10,17±0,09 <sup>ef</sup>	5,08±0,38 <sup>cd</sup>	36,65±0,10 <sup>g</sup>	48,25±0,31 <sup>a</sup>	384,70±1,28 <sup>bc</sup>
<b>LE</b>	90,03±0,09 <sup>g</sup>	6,36±0,04 <sup>b</sup>	2,79±0,24 <sup>abc</sup>	12,25±0,06 <sup>a</sup>	78,53±0,21 <sup>h</sup>	388,63±1,20 <sup>bcd</sup>
<b>PO</b>	91,42±0,10 <sup>i</sup>	10,73±0,06 <sup>f</sup>	6,34±0,81 <sup>d</sup>	23,01±0,11 <sup>e</sup>	60,38±0,88 <sup>bc</sup>	388,60±3,76 <sup>bcd</sup>
<b>PE</b>	86,83±0,09 <sup>b</sup>	5,98±0,04 <sup>b</sup>	1,86±0,72 <sup>ab</sup>	17,79±0,00 <sup>bcd</sup>	74,40±0,65 <sup>fgh</sup>	385,38±3,84 <sup>bcd</sup>
<b>PC</b>	88,05±0,33 <sup>cd</sup>	8,48±0,02 <sup>d</sup>	6,07±0,03 <sup>d</sup>	26,61±0,14 <sup>f</sup>	58,84±0,24 <sup>bc</sup>	396,41±0,29 <sup>d</sup>
<b>PN</b>	91,27±0,14 <sup>hi</sup>	6,43±0,12 <sup>b</sup>	2,03±0,67 <sup>ab</sup>	15,57±0,15 <sup>b</sup>	75,55±0,24 <sup>fgh</sup>	383,98±4,41 <sup>bc</sup>

Nota: Los datos se presentan en porcentaje (g/ 100g) en peso seco excepto la humedad (porcentaje en peso fresco) y Energía (kcal/ 100 g peso seco)

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

El bajo contenido en grasas en estas trece setas, que varió de 1,67 g/100 g en ABp a 6,34 g/100 g en PO, concuerdan con los datos del estudio de Rahi y Malik, (2016), que encontraron un rango de 1,1 a 8,3 g/100 g. Sin embargo, PO fue la seta que más cantidad de grasa presentó en su composición, 6,34 g/100 g, aportando un valor superior a otros estudios como el de Cheung, (2013), que obtuvo un rango entre 1,6-2-2 g/100 g y el de Prasad et al., (2015), mostrando un contenido en grasa de 1,4g/100 g. Estas discrepancias se debieron a las diferencias en los sustratos o semillas seleccionadas para el cultivo de PO (Sharma et al., 2016). Además, la grasa aportada por la seta PO muestra una buena proporción de ácidos grasos insaturados, al menos, el 72%, y al ser esenciales en nuestra dieta, las setas son consideradas alimentos saludables (Mattila et al., 2002).

Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con otras setas como PC, HU, GL y HTg que aportaron valores de grasa entre 4.18 a 6.07 g/100g. Estos bajos niveles de grasa confirman que los hongos pueden ser utilizados en dietas especiales de adelgazamiento y poco calóricas.

HU, ABp y PC presentaron los mayores valores de contenido en proteínas, observándose en las setas del estudio un rango entre 12,25g/100g en LE y 36,65g/100g

en HU. Estos valores coincidieron con otros estudios realizados en hongos en los que se aprecian altos niveles de proteínas (19–35%) que pueden ser comparados con datos, en base seca, de otros alimentos como arroz 7,3%, trigo 13,2%, soja 39,1%, o leche 25,2% (Mattila et al., 2000). De igual forma, Rahi y Malik en 2016, obtuvieron un rango de 20-30% de proteínas en peso seco. Ellos explicaron que el contenido de proteínas de las setas comestibles, en general, es aproximadamente el doble que en espárragos y col y cuatro y doce veces más que en naranjas y manzanas respectivamente. Por tanto, los hongos tienen menor contenido proteico que cualquier carne pero más cantidad que en frutas y hortalizas, concluyendo que las setas pueden ser usadas en dietas con alto valor proteico siendo recomendables para vegetarianos. (Chang and Milles 1993).

Las setas contienen cantidades relativamente altas de carbohidratos, variando 51 a 88% (en peso seco) en la mayoría de especies cultivadas (Kalac, 2013). En el presente estudio se observó un rango entre 48,25 a 78,53% en HU y LE respectivamente. Los carbohidratos fueron los macronutrientes más abundantes y los mayores valores se encontraron en la seta LE, (78,53%), al igual que en el estudio de Reis et al., (2012). Ya en 1978, Crisan y Sands mencionaron que la especie *Pleurotus* contenía un rango de carbohidratos de entre 46,6 y 81,8% comparado con el 60% de AB en base seca. En este caso, PE y PN fueron iguales estadísticamente y diferentes de PC, PO y AB, también sin mostrar diferencias significativas entre ellas.

En relación a los hongos que pertenecen al mismo género, especie o variedad, se han apreciado diferencias significativas en su composición nutricional. PE, siendo del mismo género pero de diferente especie, mostró diferencias significativas con PO en todos los parámetros estudiados. Sin embargo, solo mostró diferencias significativas en humedad con PN. PC mostró valores iguales estadísticamente a PO en el contenido en grasas y carbohidratos, pero diferentes a PE.

Por otro lado, HTg and HTb, siendo de la misma especie pero de diferente variedad mostraron la misma humedad, contenido en grasa y carbohidratos pero diferencias significativas en cenizas, proteínas y energía. Y lo mismo ocurrió con AB and ABp que no mostraron diferencias significativas en el contenido de cenizas y grasa. Estas variaciones en la composición centesimal pueden ser debidas a la temperatura o humedad relativa durante la incubación, fructificación y almacenamiento. (Ouzouni, et al., 2009). Para las setas cultivadas, el tipo y cantidad de sustrato utilizados también puede influenciar en los resultados finales (Park, et al., 2003).

La calidad de las setas también se ve influenciada por otros parámetros como las condiciones de pre y post-cosecha. Todos estos factores influyentes justifican la variabilidad en los datos publicados de la composición centesimal por varios autores (Manzi et al., 1999), además de la variabilidad genética de las setas de diferentes orígenes geográficos y productores.

Debido a su alto contenido en humedad, las setas son básicamente alimentos bajos en calorías (de 366 a 412 kcal en ABp y GL, respectivamente), lo que encaja bien en esta tendencia de alimentación saludable al reducir la ingesta de calorías. (Rai, 2003).

## 4.2 Fibra dietética

El contenido de Fibra Dietética presentó una gran variación entre las especies estudiadas (Tabla 19).

Tabla 19. Fibra dietética en setas cultivadas en La Rioja (g/100g peso seco).<sup>a)</sup>

Setas	FDI	FDS	FDT
<i>Agrocybe aegerita</i> (AA)	35,65±0,16 <sup>e</sup>	5,00±0,14 <sup>c</sup>	40,66±0,07 <sup>c</sup>
<i>Agaricus bisporus</i> (AB)	24,75±0,24 <sup>ab</sup>	0,72±0,24 <sup>a</sup>	25,47±0,04 <sup>a</sup>
<i>Agaricus brunnescens</i> (portobello) (ABp)	24,26±0,70 <sup>a</sup>	4,68±0,18 <sup>bc</sup>	28,93±0,81 <sup>a</sup>
<i>Ganoderma lucidum</i> (GL)	68,40±0,62 <sup>g</sup>	0,68±0,30 <sup>a</sup>	69,08±0,35 <sup>e</sup>
<i>Hericium erinaceus</i> (HE)	34,67±0,23 <sup>e</sup>	5,56±0,20 <sup>cd</sup>	40,23±0,09 <sup>c</sup>
<i>Hypsizygus tessulatus blanca</i> (HTb)	28,81±0,18 <sup>bc</sup>	5,28±0,06 <sup>c</sup>	34,09±0,19 <sup>b</sup>
<i>Hypsizygus tessulaatus gris</i> (HTg)	28,27±0,24 <sup>abc</sup>	4,94±0,08 <sup>bc</sup>	33,21±0,22 <sup>b</sup>
<i>Hypsizygus ulmarius</i> (HU)	30,08±0,63 <sup>cd</sup>	4,08±0,09 <sup>b</sup>	34,16±0,72 <sup>b</sup>
<i>Lentinula edodes</i> (LE)	39,80±1,60 <sup>f</sup>	7,44±0,36 <sup>f</sup>	47,24±1,33 <sup>d</sup>
<i>Pleurotus ostreatus</i> (PO)	33,69±0,75 <sup>de</sup>	6,75±0,10 <sup>ef</sup>	40,44±0,84 <sup>c</sup>
<i>Pleurotus eryngii</i> (PE)	27,19±0,48 <sup>abc</sup>	6,36±0,16 <sup>de</sup>	33,55±0,52 <sup>b</sup>
<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (PC)	34,58±0,35 <sup>e</sup>	5,51±0,38 <sup>cd</sup>	40,09±0,20 <sup>c</sup>
<i>Pholiota nameko</i> (PN)	37,25±2,40 <sup>ef</sup>	7,05±0,09 <sup>ef</sup>	44,30±2,44 <sup>cd</sup>

a) Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas ( $P < 0.05$ ).  
FDI: Fibra Dietética Insoluble; FDS: Fibra Dietética Soluble; FDT: Fibra Dietética Total

En las setas estudiadas el contenido de FDI, que estaba entre 24,26 y 68,40 g/100g en ABp y GL respectivamente, fue significativamente mayor que el contenido en FDS (de 0,68g/100g en GL a 7,44g/100g en LE). Esto se debió a que FDT está constituida principalmente por compuestos insolubles en agua (FDI), siendo la quitina y los  $\beta$ -glucanos los más representativos, mientras que la cantidad de solubles (FDS) es menor del 10% en materia seca. (Cheung, 2013). Además, algunos investigadores afirmaron que la calidad de la FDT está determinada por su proporción de FDS, que proporciona una mejor capacidad de retención y fermentabilidad (Xie y Li 2006). Por tanto, cuanto mayor es el contenido FDS, con más funciones fisiológicas que el FDI, mejor es la calidad FDT, siendo LE, PN y PO las setas con mayor contenido de FDS.

Los mayores contenidos de FDT (69,08 g/100g) se observaron en GL, y los menores (25,47 g/100g) en AB. Cheung, (2013), mostró resultados similares en HE y HT (variedades blanca y gris) y PN. Además, de acuerdo con el estudio de Synytsya et al.,

(2008) el contenido de FDT de cuatro semillas diferentes de PO y PE varió ampliamente entre 34,5 y 63,1 g/100 g en el sombrero y 38,9 g/100 g y 64,8 g/100 g en el pie. Di Anibal et al., (2015) y Papaspyridi (2010) obtuvieron valores parecidos a los obtenidos en este estudio (Tabla 19) en AB, ABp, PO y LE.

El contenido de fibra dietética mostró una especificidad evidente en cuanto a las variedades y especies. No se encontraron diferencias significativas ni entre AB y ABp, ni HU y HT (variedades blanca y gris). Sin embargo, el género *Pleurotus* mostró diferencias en PE con PO y PC, pero no entre PO y PC, con una cantidad mayor de FDT que en la especie *Hypsizygus* o en AB.

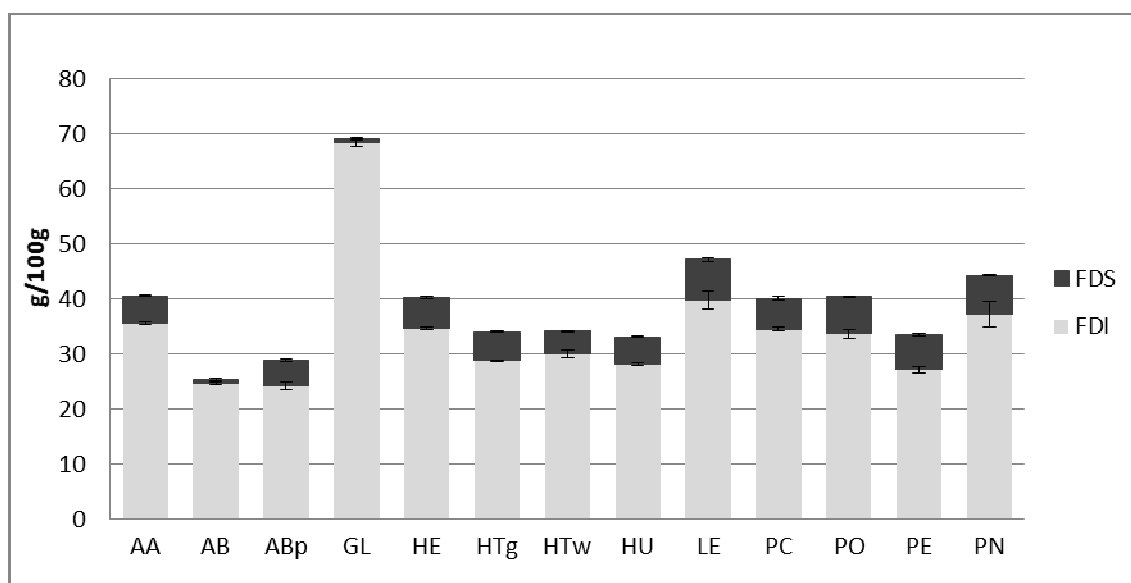


Figura 44. Contenido de Fibra Dietética Total (FDT), Soluble (FDS) e insoluble (FDI).

Según el estudio de Rahi y Malik, 2016, las setas contienen 10–50% de fibra dietética, excepto GL, que presentó 69,08g/100g en FDT y 68,4 g/100g en FDI, debido a su morfología. Es por esto que GL se consume generalmente en forma de extracto de té, cápsula o como suplemento dietético debido a que GL es una seta demasiado dura y leñosa para ser comestible (Wasser, 2005 y Yuen y Gohel, 2005).

### 4.3 $\beta$ -glucanos

Las setas contenían pequeñas cantidades de  $\alpha$ -glucanos, desde 0,52g/100g en GL a 5,61g/100g en PN. En general, los valores de  $\alpha$ -glucanos son bajos en setas cultivadas, menores de 10g/100g aproximadamente, (McCleary & Draga, 2016; Synytsya et al., 2008). A pesar de ello, los  $\alpha$ -glucanos, presentes en las paredes celulares de las setas, aumentan la sensibilidad a la insulina, ejerciendo así un efecto antidiabético. (Zhang y Cheung 2002). El contenido de  $\beta$ -glucanos fue desde



7,71g/100g en AB y 7,96g/100g en ABp sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre ellas, hasta 40,64g/100 g en PE.

El contenido en glucanos, (Tabla 20), muestra diferencias significativas entre las especies de *Pleurotus*, pero no en las especies y variedades de *Agaricus*, que mostraron los menores valores de glucanos. Al igual que en la fibra dietética, HTg y HTb (27.94 y 26.01 g/100 g respectivamente) tampoco mostraron diferencias significativas en los resultados obtenidos de glucanos.

Tabla 20. Glucanos en setas cultivadas en La Rioja (g/100 g peso seco).<sup>a)</sup>

Setas	Glucanos Totales	$\alpha$ -glucanos	$\beta$ -glucanos
<i>Agrocybe aegerita</i> (AA)	32,82±1,13 <sup>f</sup>	2,43±0,06 <sup>f</sup>	<b>30,39±1,19<sup>e</sup></b>
<i>Agaricus bisporus</i> (AB)	12,39±0,54 <sup>a</sup>	4,68±0,08 <sup>h</sup>	<b>7,71±0,47<sup>a</sup></b>
<i>Agaricus brunnescens</i> (portobello) (ABp)	11,04±0,22 <sup>a</sup>	3,08±0,05 <sup>g</sup>	<b>7,96±0,19<sup>a</sup></b>
<i>Ganoderma lucidum</i> (GL)	24,40±0,28 <sup>d</sup>	0,52±0,04 <sup>a</sup>	<b>23,89±0,25<sup>c</sup></b>
<i>Hericium erinaceus</i> (HE)	16,90±0,13 <sup>b</sup>	1,84±0,07 <sup>de</sup>	<b>15,06±0,19<sup>b</sup></b>
<i>Hypsizygus tessulatus blanca</i> (HTb)	28,07±0,45 <sup>e</sup>	2,07±0,02 <sup>e</sup>	<b>26,01±0,45<sup>cd</sup></b>
<i>Hypsizygus tessulatus gris</i> (HTg)	28,94±0,82 <sup>e</sup>	1,01±0,003 <sup>b</sup>	<b>27,94±0,82<sup>de</sup></b>
<i>Hypsizygus ulmarius</i> (HU)	16,58±0,19 <sup>b</sup>	3,28±0,02 <sup>g</sup>	<b>13,30±0,18<sup>b</sup></b>
<i>Lentinula edodes</i> (LE)	38,82±0,60 <sup>g</sup>	1,36±0,01 <sup>c</sup>	<b>37,45±0,60<sup>f</sup></b>
<i>Pleurotus ostreatus</i> (PO)	26,72±0,82 <sup>de</sup>	1,61±0,04 <sup>d</sup>	<b>25,11±0,78<sup>cd</sup></b>
<i>Pleurotus eryngii</i> (PE)	45,77±0,35 <sup>h</sup>	5,13±0,04 <sup>i</sup>	<b>40,64±0,39<sup>g</sup></b>
<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (PC)	20,46±0,26 <sup>c</sup>	4,90±0,06 <sup>hi</sup>	<b>15,56±0,28<sup>b</sup></b>
<i>Pholiota nameko</i> (PN)	42,96±0,44 <sup>h</sup>	5,61±0,05 <sup>j</sup>	<b>37,35±0,44<sup>f</sup></b>

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

La seta con mayor contenido en  $\beta$ -glucanos fue PE, seguida de LE (37,45 g/100 g) y PN (37,35 g/100 g) sin diferencias significativas entre ellas.

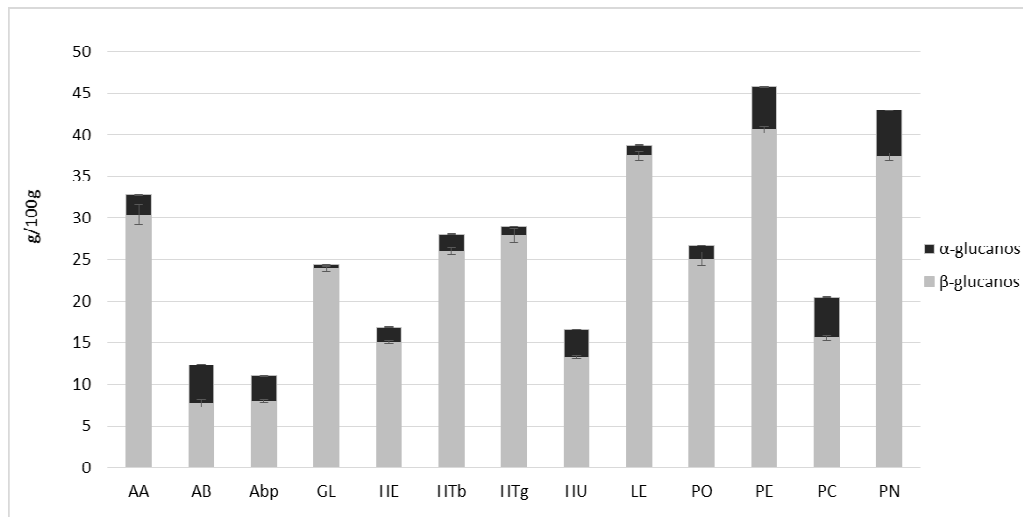


Figura 45. Contenido de Glucanos Totales como sumatorio de  $\alpha$ -glucanos y  $\beta$ -glucanos.

Muchos grupos de investigación han estudiado el contenido de glucanos de hongos usando muestras liofilizadas para la extracción de  $\beta$ -glucanos como Papaspyridi en 2010, con valores de 1% en  $\alpha$ -glucanos y 29,9% en  $\beta$ -glucanos en PO. Otros resultados indicaron que el contenido de  $\beta$ -glucanos en LE, PE y AB fueron 20, 28 y 11 mg/100 mg respectivamente; Gil-Ramírez et al., 2011 and Bak, 2014).

McCleary y Draga (2016) y Sari et al., (2017), determinaron, con el mismo kit enzimático que el utilizado en el presente estudio, una amplia variedad de setas, cultivadas y silvestres, coincidiendo con nuestros resultados en  $\beta$ -glucanos de las setas AB, ABp, LE, PC, PE y PO.

Los datos experimentales obtenidos son comparables a los encontrados en la bibliografía teniendo en cuenta que la composición de cada seta puede estar asociada con los factores ambientales de sus condiciones de cultivo y recolección (Palacios et al., 2011). También se ha demostrado que la cepa utilizada para la inoculación de las setas, las condiciones de crecimiento o el grado de maduración pueden modificar los resultados. Por ejemplo, Synytsya et al., (2008), mostraron una amplia variedad del contenido de  $\beta$ -glucanos en diferentes variedades de PE y PO. Además, Sharma et al., (2016), obtuvieron diferentes  $\beta$ -glucanos en las mismas variedades de PO y PE con diferentes sustratos de residuos agrícolas.

#### 4.4 Quitosano

La recta patrón del quitosano comercial, representada en la figura 46, se realizó con las siguientes concentraciones de quitosano: 1, 3, 5, 7, 9, 20, 40, 60 y 90 mg/litro.

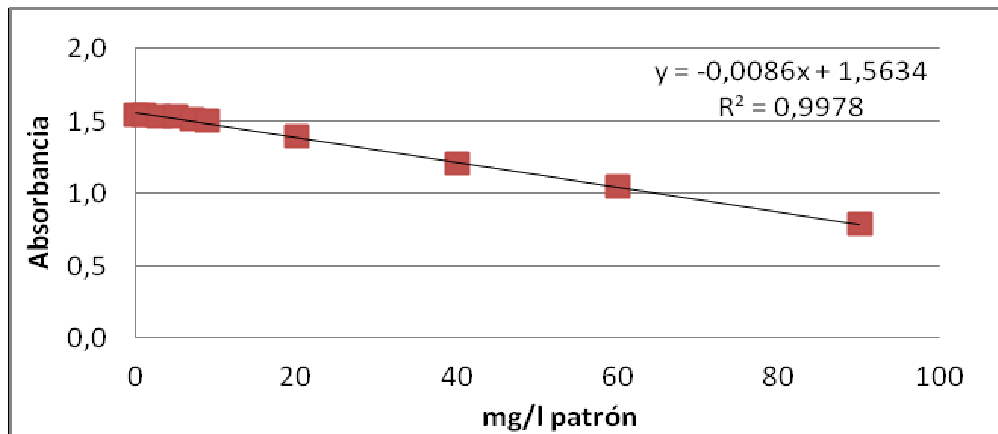


Figura 46: Recta patrón quitosano comercial.

Los resultados obtenidos tras la determinación colorimétrica del quitosano, mostraron unos valores muy bajos de quitosano, de 2,13mg/g en LE a 14,73mg/g en PN. A continuación se presentan en la Tabla 21.

Tabla 21. Cantidad de quitosano en las setas cultivadas en La Rioja (mg quitosano/g seta liofilizada).

<i>Agrocybe aegerita</i> (AA)	7,53±2,15 <sup>a</sup>
<i>Agaricus bisporus</i> (AB)	nd
<i>Agaricus brunnescens</i> (portobello) (ABp)	10,62±3,70 <sup>a</sup>
<i>Ganoderma lucidum</i> (GL)	11,81±6,43 <sup>a</sup>
<i>Hericium erinaceus</i> (HE)	4,24±1,50 <sup>a</sup>
<i>Hypsizygus tessulatus blanca</i> (HTb)	6,15±3,85 <sup>a</sup>
<i>Hypsizygus tessulatus gris</i> (HTg)	nd
<i>Hypsizygus ulmarius</i> (HU)	3,94±3,72 <sup>a</sup>
<i>Lentinula edodes</i> (LE)	2,13±1,40 <sup>a</sup>
<i>Pleurotus ostreatus</i> (PO)	4,92±3,60 <sup>a</sup>
<i>Pleurotus eryngii</i> (PE)	4,48±2,40 <sup>a</sup>
<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (PC)	5,15±1,21 <sup>a</sup>
<i>Pholiota nameko</i> (PN)	14,73±2,85 <sup>a</sup>

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

Nd: no detectado.

Como se puede apreciar, HTg y AB no presentaron quitosano en la determinación, y en el resto de setas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de quitosano, al igual que en el estudio de Vetter, (2007),

en el que analizó el contenido en quitina en AB, LE y PO sin encontrar diferencias significativas entre ellas.

Según la revisión bibliográfica, los rendimientos de quitina y quitosano bajo fermentación sumergida y en condiciones de cultivo de las setas LE, AB, PO y PE, fueron entre 85-196 y 10-40mg/g de producto seco respectivamente (Kim, 2011). Nitschke et al., (2011) concluyeron que el rendimiento de quitina es mayor en micelio que en cuerpo fructífero, comprobando además, que el rendimiento de quitosano en micelio producido en fermentación en estado sólido es 50 veces mayor que en fermentación sumergida, y el quitosano a partir de hongos tiene menor grado de deacetilación que los quitosanos comerciales a partir de crustáceos. Es por esto, que los resultados de quitosano obtenidos de los cuerpos fructíferos de las setas mostraron unos valores tan bajos.

Además, aunque los procesos y condiciones de extracción de quitina y quitosano a partir de setas son muy similares, la utilización de ácidos hace que la extracción resulte muy difícil y los rendimientos encontrados sean más bajos debido a los complejos quitina-quitosano con glucanos y otros polisacáridos. (Krishnaveni, y Rangunathan, 2005).

Por tanto, los rendimientos de quitina y quitosano dependen de la especie de seta, el momento de recolección del producto y el proceso de extracción (Dhillon et al., 2013, Kaur y Dhillon, 2015).

#### **4.5 Actividad antioxidante**

En este capítulo, los resultados de la actividad antioxidante de las trece setas cultivadas en el CTICH, expresados en peso seco, se muestran en la tabla 22.

Las setas HT, que sólo difieren en variedad y color, gris (HTg) y blanco (HTb), tuvieron los valores más bajos en Fenoles Totales (86,60 y 63,57  $\mu\text{g}$  EQ gálico/100 mg respectivamente), así como en la actividad antioxidante, siendo los valores obtenidos en DPPH (0,53 y 0,28  $\mu\text{mol TE}/100\text{mg}$  respectivamente), en ABTS (0,38  $\mu\text{mol TE}/100\text{mg}$  en ambas setas) y en la determinación por el radical FRAP (0,50 y 0,52  $\mu\text{mol TE}/100\text{mg}$  respectivamente).

Sin embargo, HU, siendo el mismo género, mostró los valores más altos en el contenido total de fenoles Totales, (286,93  $\mu\text{g}$  GAE/100mg). Babu y Rao (2013) estudiaron la capacidad antioxidante de HU y encontraron que el mayor contenido de fenoles totales podría explicar las actividades antioxidantes más altas en términos de DPPH, capacidad de eliminación de radicales libres y FRAP, la capacidad de reducir los iones férricos.

Sin embargo, aunque en el presente estudio, HU mostró los valores más altos en Fenoles Totales, sin presentar diferencias significativas con PC, no obtuvo el contenido más alto en la actividad antioxidante medida por los métodos ABTS, DPPH y FRAP. Los valores fueron similares a otros estudios como los de Premkumari y Shivashankar (2014) o Usha y Suguna (2014). Además, la actividad antioxidante de HU es mucho mayor que la aportada por Babu y Rao (2013). Estas discrepancias entre los estudios se debieron a la diferencia en los procedimientos de extracción empleados, en este caso se obtuvieron extractos metanólicos y acuosos con acetona y Babu y Rao (2013) extrajeron con etanol y se diluyeron en metanol.

Tabla 22. Actividad antioxidante ( $\mu\text{mol TE}/100\text{ mg peso seco}$ ) y fenoles totales ( $\mu\text{g GAE}/100\text{ mg peso seco}$ ) en setas cultivadas en La Rioja <sup>a)</sup>

Setas	Fenoles Totales $\mu\text{g EQ gálico}/100\text{ mg}$	DPPH $\mu\text{mol EQ Trolox TE}/100\text{mg}$	ABTS $\mu\text{mol EQ Trolox TE}/100\text{mg}$	FRAP $\mu\text{mol EQ Trolox TE}/100\text{mg}$
<b>AA</b>	253,50 $\pm$ 3,65 <sup>f</sup>	2,40 $\pm$ 0,01 <sup>i</sup>	4,65 $\pm$ 0,13 <sup>f</sup>	2,77 $\pm$ 0,04 <sup>f</sup>
<b>AB</b>	177,18 $\pm$ 1,24 <sup>e</sup>	2,09 $\pm$ 0,02 <sup>h</sup>	1,26 $\pm$ 0,04 <sup>bc</sup>	1,71 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>
<b>Abp</b>	252,48 $\pm$ 3,66 <sup>f</sup>	2,38 $\pm$ 0,002 <sup>i</sup>	3,88 $\pm$ 0,04 <sup>e</sup>	2,38 $\pm$ 0,03 <sup>e</sup>
<b>GL</b>	141,72 $\pm$ 1,76 <sup>d</sup>	1,90 $\pm$ 0,03 <sup>g</sup>	1,47 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>	0,97 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>
<b>HE</b>	169,57 $\pm$ 5,73 <sup>e</sup>	1,77 $\pm$ 0,12 <sup>f</sup>	2,46 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>	2,45 $\pm$ 0,06 <sup>e</sup>
<b>HTb</b>	63,57 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup>	0,28 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,38 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,52 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
<b>HTg</b>	86,59 $\pm$ 2,11 <sup>b</sup>	0,53 $\pm$ 0,004 <sup>b</sup>	0,38 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,50 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
<b>HU</b>	286,93 $\pm$ 3,97 <sup>g</sup>	1,83 $\pm$ 0,02 <sup>f</sup>	0,52 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,97 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
<b>LE</b>	96,78 $\pm$ 1,89 <sup>b</sup>	0,97 $\pm$ 0,01 <sup>e</sup>	1,18 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,73 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
<b>PO</b>	175,53 $\pm$ 5,31 <sup>e</sup>	0,75 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>	2,69 $\pm$ 0,04 <sup>d</sup>	1,58 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>
<b>PE</b>	115,50 $\pm$ 2,78 <sup>c</sup>	0,64 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	1,17 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,62 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>
<b>PC</b>	274,72 $\pm$ 5,18 <sup>g</sup>	0,70 $\pm$ 0,01 <sup>cd</sup>	0,54 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	2,41 $\pm$ 0,03 <sup>e</sup>
<b>PN</b>	98,28 $\pm$ 1,49 <sup>b</sup>	0,66 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	0,41 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,58 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas ( $P < 0.05$ ).

Contenido de Fenoles Totales: Ensayo de Folin-Ciocalteu ( $\mu\text{g}$  equivalente ácido gálico GAE/100mg); ensayos DPPH: scavenging activity, ABTS: radical scavenging activity y FRAP: Ferric reducing antioxidant power. ( $\mu\text{mol}$  equivalente Trolox TE/100mg).

ABp y AB presentaron los valores más altos en DPPH (2,40, 2,38 y 2,09  $\mu\text{g TE}/100\text{ mg}$ ), ABTS (4,65, 3,88 y 1,26  $\mu\text{mol TE}/100\text{ mg}$ ) y FRAP (2,77, 2,38 y 1,709  $\mu\text{mol TE}/100\text{ mg}$ ); mostrando AB diferencias significativas con las setas ABp a pesar de ser de la misma especie. Según los resultados obtenidos, Dubost et al (2007) obtuvieron los valores más altos de actividad antioxidante en especies de *Agaricus*, especialmente en ABp.

Aunque DPPH y ABTS midieron la actividad de secuestro de radicales libres con diferentes reactivos, se encontró una tendencia similar, con un mantenimiento en los

valores más altos y los menores obtenidos por ambos métodos. Además, el método FRAP, que midió la capacidad para evitar la transferencia de electrones, llevó la misma tendencia en las trece setas estudiadas.

AB y PO, los hongos más consumidos a nivel mundial, han sido ampliamente estudiados. Rajarathnam et al., (2003) investigaron los compuestos fenólicos presentes en las setas AB y PO frescas y encontraron que el contenido fenólico era aproximadamente tres veces mayor en AB (0,4 mg/g) que en PO (1,2 mg/g), coincidiendo con otros estudios (Palacios et al., 2011 y Reis et al., 2012). Sin embargo, en este estudio se observó que el contenido fenólico en ambas setas fue similar sin mostrar diferencias estadísticas significativas (177  $\mu\text{g}$  GAE/100 mg en AB y 175  $\mu\text{g}$  GAE/100 mg en PO), posiblemente debido a la diferencia en la semilla o cepa seleccionada para el cultivo de PO, lo cual, conlleva a una mejora en la cantidad de fenoles totales (Tajalli et al., 2015, Ghahremani-Majd y Dashti 2005 y Rezaeian et al., 2015).

Otras setas consumidas y producidas globalmente son PE y LE. Los resultados coincidieron con los estudios de varias setas cultivadas en China y Tailandia (Yang et al., 2002 y Kettawan et al., 2011 respectivamente), que mostraron que el mayor contenido de Fenoles Totales en las setas conducían a una mayor actividad antioxidante mediante la capacidad del poder reductor férrico y la del secuestro de radicales libres, siendo los valores obtenidos más altos en PO que en PE y LE.

También se observaron relaciones estadísticamente significativas entre los compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante de los materiales vegetales como en semillas de linaza ( $R^2= 0,963$ ;  $p < 0,001$ ) y cereales ( $R^2= 0,905$ ;  $p < 0,001$ ) (Velioglu et al., 1998). En general, se encontró una correlación entre la actividad antioxidante y la cantidad de Fenoles Totales en las setas, y los resultados indicaron que hubo una relación positiva y significativa ( $p < 0,01$ ) entre ellos. Además, se encontró una correlación positiva entre Fenoles Totales y DPPH ( $R^2= 0,529$ ), entre Fenoles Totales y ABTS ( $R^2 = 0,386$ ) y entre Fenoles Totales y FRAP ( $R^2= 0,692$ ). De esta manera, se pudo confirmar la relación entre estos parámetros en las setas estudiadas, siendo mayor en FRAP, que evitó la transferencia de electrones, que en actividad de secuestro de radicales libres (DPPH y ABTS), aunque todos ellos con nivel de significación de  $p < 0, 01$ .

Los resultados obtenidos en la actividad antioxidante de las 13 setas estudiadas concuerdan con estudios como los de Cheung et al., (2003) o Kettawan et al (2011), en los que un alto contenido de Fenoles Totales aumentó la actividad antioxidante con una correlación positiva entre la cantidad de Fenoles Totales y DPPH, ABTS y FRAP en las setas. Por lo tanto, los Fenoles Totales fueron responsables de las propiedades antioxidantes mostradas.



## **5 CAPÍTULO II: EFECTO DE PULSOS ELÉCTRICOS DE MODERADA INTENSIDAD DE CAMPO (PEMIC) APLICADOS AL CUERPO FRUCTÍFERO DE LOS HONGOS *AGARICUS BISPORUS*, *GANODERMA LUCIDUM*, *LENTINULA EDODES*, *PLEUROTUS ERYNGII* Y *PLEUROTUS OSTREATUS*.**

---

Los Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo (PEMIC) pueden tener efecto positivos sobre la composición centesimal de las setas, su contenido en fibra dietética y glucanos, así como sobre su capacidad antioxidante.

Para probar la hipótesis de que los PEMIC puedan potenciar la actividad antioxidante y la producción de compuestos beneficiosos para la salud, se utilizaron cinco tipos de setas: AB, PO, PE, LE y GL. Las cuatro primeras fueron elegidas por ser las más producidas y consumidas, no solo en La Rioja, sino a nivel mundial. GL, llamada seta de la inmortalidad, fue seleccionada debido a sus múltiples propiedades beneficiosas para la salud.

### **5.1 Composición centesimal**

#### **5.1.1 Cenizas**

En los cuerpos fructíferos de las cinco variedades de setas sometidas a diferentes tratamientos de PEMIC, el contenido en cenizas varió desde 2,45g/100g en GL (1,2kV/cm-5 pulsos) hasta 10,78g/100g en AB (2kV/cm-18 pulsos) (figura 47). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas considerando el conjunto de los resultados, pero si dentro de cada tipo de seta ( $p < 0,05$ ).

Las AB fueron las setas con un mayor contenido en cenizas (10,12g/100g). Cuando se aplicaron tratamientos de 2kV/cm-18 pulsos, su contenido aumentó significativamente hasta 10,78 g/100g, mientras que con el tratamiento más intenso, 2kV/cm-30pulsos, se obtuvo un valor mucho menor, 7,72g/100g, que resultó ser similar a los 7,01g/100g hallados en AB sin tratar por Teklit, (2015).



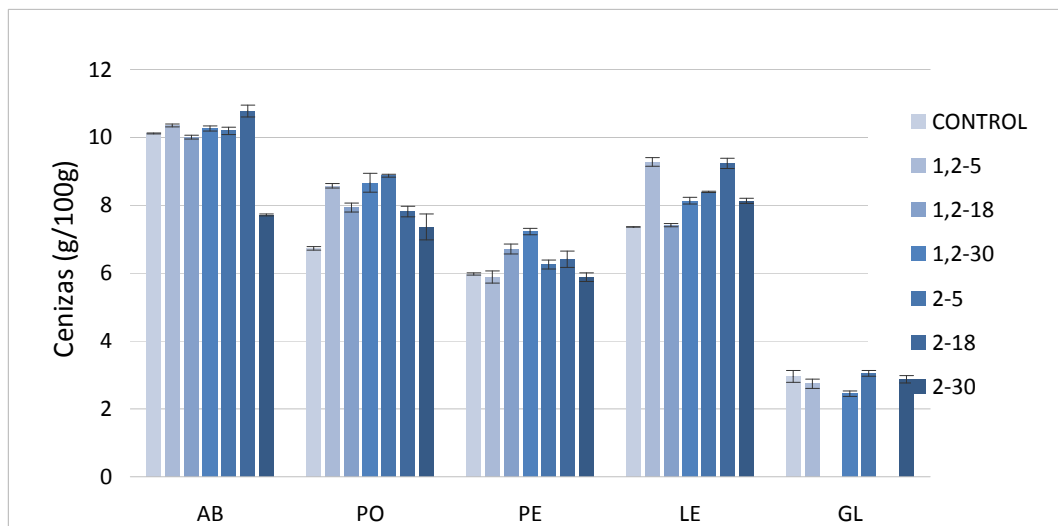


Figura 47. Contenido en cenizas de los hongos tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

AB: *Agaricus bisporus*, GL: *Ganoderma lucidum*, LE: *Leuentinula edodes*, PE: *Pleurotus eryngii*, PO: *Pleurotus ostreatus*. Tratamientos: Control, 1,2 kV/cm-5 pulsos, 1,2 kV/cm-18 pulsos, 1,2 kV/cm-30 pulsos, 2 kV/cm-5 pulsos, 2 kV/cm-18 pulsos y 2 kV/cm-30 pulsos

Aunque en este estudio, con 2kV/cm y 18 pulsos se aumentaran los valores de cenizas, al aplicarles 30 pulsos se produjeron daños irreversibles en la célula debido a la electroporación producida por la aplicación de PEMIC. El tratamiento más intenso no permitió que los poros de la membrana celular, previamente abiertos por la permeabilización, se volvieran a cerrar, produciendo daños en los componentes de la célula y por tanto, disminuyendo el contenido de cenizas y minerales en AB.

El contenido de cenizas en la seta PO aumentó respecto a las muestras sin tratar, excepto en el tratamiento más intenso, 2kV/cm y 30 pulsos, que mostró valores similares al control. El mayor valor se encontró en 2kV/cm y 5 pulsos, (8,87 g/100g), sin mostrar diferencias con ninguno de los tratamientos de intensidad 1,2 kV/cm. En esta seta, PO, los PEMIC provocaron un estrés en la membrana celular favoreciendo que los minerales y vitaminas contenidos en la célula se encontraran más disponibles.

Cuando se aplicó un tratamiento de 2kV/cm-30 pulsos, PO mantuvo igual contenido de cenizas que las setas sin tratar, por lo que se confirma, también en PO, que el tratamiento más intenso pudo hacer que la permeabilización fuera más inestable que la del resto de tratamientos, o incluso irreversible, y no aumentara el contenido en cenizas en la seta liofilizada por daños causados a la célula.

Respecto a PE, los valores de cenizas que aumentaron significativamente respecto al control, (5,98 g/100g), fueron 1,2 kV/cm con 18 y 30 pulsos. Sin embargo, la intensidad 2kV/cm no mostró diferencias entre los diferentes números de pulsos aplicados ni con el control.

El contenido de cenizas en LE aumentó significativamente en todos los tratamientos excepto en 1,2 kV/cm-18 pulsos que se mantuvo como el control, con un valor de 7,36 g/100g. Los mayores valores fueron 1,2 kV/cm-5 pulsos y 2kV/cm-18 pulsos. Ello indica que no es necesario aumentar cualquiera de las dos variables, intensidad o número de pulsos, para aumentar el contenido de cenizas. Además, y al igual que en las muestras de AB, los PEMIC le afectaron aumentando según se ampliaba la aplicación de 5 a 18 pulsos, pero disminuyendo el contenido cuando se aplicaron 30 pulsos. Posiblemente a partir de 2kV/cm, y un alto número de pulsos, se produjo una permeabilización reversible en la membrana celular que permitió aumentar el contenido de cenizas pero sin llegar a un máximo a partir del cual se redujo el valor de cenizas, entre 18 y 30 pulsos.

GL contiene unos valores más bajos en cenizas que otras setas comestibles (Mau et al., 2001). No se observaron diferencias entre tratamientos ni respecto al control por lo que los pulsos eléctricos no afectaron al contenido en cenizas de GL.

### **5.1.2 Grasas**

El menor valor de grasas se observó en PE con el tratamiento 1,2kV/cm-30 pulsos, (1,34 g/100g), y el mayor se encontró en GL donde no superó los 3,41 g/100 g en 1,2kV/cm-5 pulsos (figura 48). Estos valores se encontraron dentro del límite del 6%, establecido por la FDA (2014) para denominar a un alimento “bajo en grasa”, por lo que, aunque la tecnología PEMIC aumentó el contenido de lípidos en algunas setas, no se alcanzó ese límite y ni se modificó la característica de “bajas en grasas”.

En AB, la cantidad de grasa aumentó con ambas intensidades de PEMIC, siendo, los tratamientos en los que se aplicaron 18 y 30 pulsos los que dieron lugar a concentraciones significativamente mayores que el control. Sin embargo, en el tratamiento 1,2 kV/cm no hubo diferencias debidas al número de pulsos aplicados. Aplicando solo 5 pulsos en ambas intensidades no se observó ninguna diferencia respecto al control, esto pudo ser debido a que se permeabilizó la célula de forma reversible sin que se desequilibrara la bicapa lipídica.

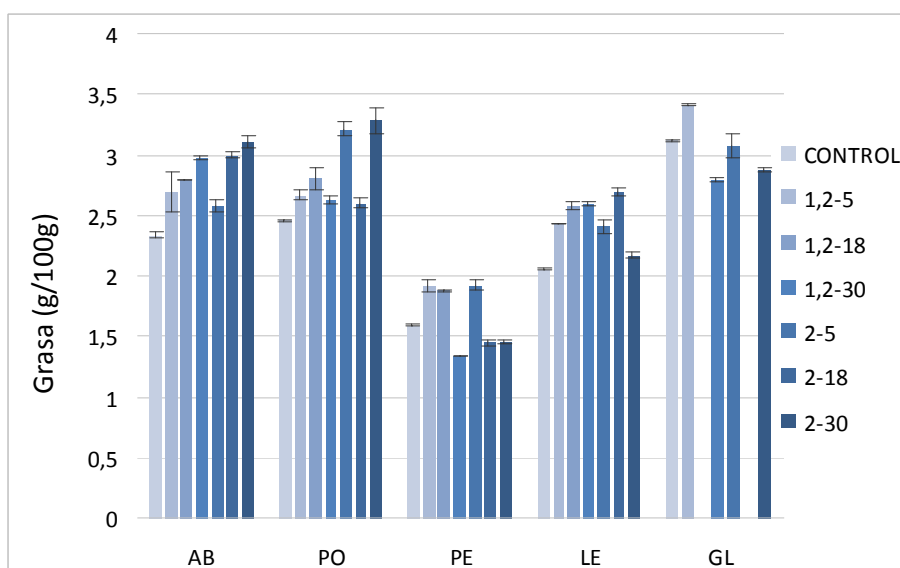


Figura 48. Contenido en grasas (g/100g) de los hongos tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

AB: *Agaricus bisporus*, GL: *Ganoderma lucidum*, LE: *Leuntinula edodes*, PE: *Pleurotus eryngii*, PO: *Pleurotus ostreatus*. Tratamientos: Control, 1,2 kV/cm-5 pulsos, 1,2 kV/cm-18 pulsos, 1,2 kV/cm-30 pulsos, 2 kV/cm-5 pulsos, 2 kV/cm-18 pulsos y 2 kV/cm-30 pulsos.

Respecto a LE, al igual que en las cenizas, el contenido en grasas aumentó respecto al control significativamente, excepto en tratamientos de 2kV/cm-30 pulsos, con un rango muy reducido en las siete muestras realizadas, entre 2,06 y 2,69 g/100 g en el control y las tratadas con 2kV/cm-18 pulsos respectivamente. También se observó que en tratamientos de 1,2 kV/cm no hubo diferencias entre aplicar 5, 18 o 30 pulsos eléctricos, contrario al fundamento de los PEMIC en el que un aumento del número de pulsos mejora la permeabilización de la célula e, incluso, su inactivación (Sale et al., 1967). Tal vez el aumento del número de pulsos no sea suficiente con el incremento de 5 a 18 y 30 pulsos. Existen estudios en aceite de colza en los que se aplicaron tratamientos de 7kV/cm en 60 y 120 pulsos, obteniendo un incremento en la máxima permeabilización de la membrana celular de 17 y 55% respectivamente (Guderjan et al., 2007).

PE mostró los valores más bajos en grasas del estudio, e incluso con el tratamientos con PEMIC disminuyeron su contenido, de 1,6g/100g en el control a 1,34g/100g en el tratamiento 1,2kV/cm-30 pulsos, probablemente debido a modificaciones y daños en la estructura celular producidos por el estrés de la aplicación de PEMIC. El resto de tratamientos se mantuvieron iguales al control o aumentaron el contenido en grasa por la permeabilización de la célula, que mejora la disponibilidad de ciertos compuestos de las setas.

Las grasas encontradas en PO mantuvieron una concentración similar al control excepto cuando se aplicaron 5 o 30 pulsos a intensidad de 2kV/cm, donde aumentó hasta valores de 3,28 g/100g, estando entre los mayores contenidos en materia grasa

encontrados en las cinco setas estudiadas. En general, PO tiene 0,5-5 g/100g de grasas (Khan 2010), por lo que el aumento debido al tratamiento de PEMIC no es significativo. Además, el contenido en grasas se mantiene y no disminuye respecto al control, tal y como observaron Garde-Cerdán et al (2007) en mosto de uva, donde comparaban el tratamiento térmico convencional con Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad.

El tratamiento de 1,2kV/cm-5pulsos a GL mostró el valor más alto de las setas evaluadas, 3,41 g/100g, y fue significativamente diferente al resto de las tratadas de esta especie. Los PEMIC favorecieron la disponibilidad del contenido en grasa al permeabilizarse su membrana celular. Sin embargo, al aumentar a 30 el número de pulsos aplicados, el contenido de grasas disminuyó por el estrés generado en la célula, afectando a los lípidos, componentes fundamentales de la estructura de la membrana celular, que se dañó al perder parte de la estructura que le aportan los lípidos. (Janmey and Kinnunen, 2006)

### 5.1.3 Proteínas

Los valores de proteína se mantuvieron entre 12,29 g /100 y 24,64 g /100 en PO tratado con 2kV/cm-30 pulsos y el control de AB respectivamente, (Figura 49). El contenido proteico de los hongos oscila entre 15 y 35% de peso seco, dependiendo de las especies, de las variedades y de la etapa de desarrollo del cuerpo fructífero (Manzi et al., 2004; Díez y Álvarez, 2001). Además, según la FAO, la calidad proteica de los hongos es mejor que la de la mayoría de los vegetales (FAO, 1981), de modo que, ante un aumento de proteínas por los PEMIC, las setas verían mejorada su calidad nutricional, muy demandada en los alimentos actualmente.

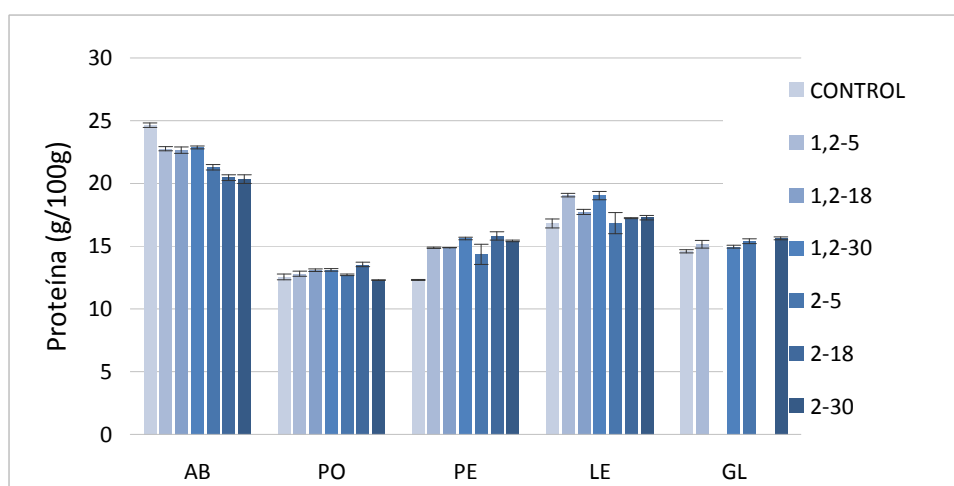


Figura 49. Contenido en proteínas (g/100g) de los hongos tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

AB: *Agaricus bisporus*, GL: *Ganoderma lucidum*, LE: *Leuatinula edodes*, PE: *Pleurotus eryngii*, PO: *Pleurotus ostreatus*. Tratamientos: Control, 1,2 kV/cm-5 pulsos, 1,2 kV/cm-18 pulsos, 1,2 kV/cm-30 pulsos, 2 kV/cm-5 pulsos, 2 kV/cm-18 pulsos y 2 kV/cm-30 pulsos.

Respecto al contenido en proteínas, AB sin tratar fue diferente estadísticamente del resto y mostró el mayor valor de todas las setas analizadas (24,64 g/100 g), valor similar al aportado por Cheung en 1997. Los datos más bajos pertenecen al tratamiento con intensidad 2kV/cm, seguidos de 1,2 kV/cm, independientemente del número de pulsos aplicados en cada uno de ellos. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado en tejidos vegetales tratados con PEMIC, en el que se determinó que es mucho mayor el impacto de la intensidad que el número de pulsos aplicados (Dörnenburg y Knorr, 1993). Además, a mayor intensidad, 2kV/cm, se encontraron menos proteínas, indicativo de que la membrana celular se vio afectada y no dejó disponibles las proteínas.

En PO, solo el tratamiento de 2kV/cm-18 pulsos aumentó su contenido proteico significativamente con respecto a la muestra sin tratar. Los resultados se encontraron en un rango de 12,29 a 13,55 g/100g, en 2kV/cm 30 y 18 pulsos respectivamente, por lo que el tratamiento más fuerte, 2kV/cm-30 pulsos, pudo resultar demasiado intenso y dañar la célula. Estos valores se corresponden con otros estudios como los de Crisan y Sands, (1978) y Rahi y Malik, (2016), así como con el estudio de Sarkis et al., (2015), en el que se aumentó la cantidad de proteína producida por los PEMIC en tortas de sésamo obteniendo, además, incrementos en los compuestos fenólicos.

PE es una de las setas más pobres en proteína (Rodrigues et al., 2015), pero se observó que con el tratamiento aplicado aumentaba su contenido significativamente en todos los tratamientos, sin diferenciarse el número de pulsos o la intensidad aplicada. Estos resultados concuerdan con estudios realizados en AB, utilizando una combinación de altas presiones y PE para permeabilizar las membranas celulares y obtener mayor contenido en proteínas, polifenoles totales y polisacáridos (Parniakov et al., 2014).

La cantidad de proteína de LE se encontró entre 16,82 y 19,07g/100g en las muestras sin tratar y el tratamiento 1,2kV/cm-5 pulsos respectivamente, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre intensidades ni número de pulsos en todos los tratamientos de PEMIC. Además, los valores de proteína en LE, se mantuvieron y no disminuyeron respecto al control, tal y como observaron Garde-Cerdán et al., (2007) en mosto de uva, donde, tras una aplicación de 35kV/cm y tiempo de tratamiento de 1 ms, las proteínas mantuvieron su estructura primaria sin inducir cambios sustanciales en el perfil de péptidos y aminoácidos.

En las cinco setas, los tratamientos más intensos de PEMIC, 2kV/cm-30 pulsos, no tuvieron efecto en cenizas y grasas ya que resultó demasiado intenso y dañaba las células. Sin embargo, el tratamiento 2kV/cm-30 pulsos en GL fue el único que mostró diferencias significativas con el control, (14,60 g/100g), aumentando el contenido en proteínas (15,62 g/100g). Debido a la morfología de GL, diferente del resto de setas por su matriz acorchada y fibrosa, resultó más difícil estresar las células y producir

poros que facilitasen la accesibilidad de diferentes componentes de las paredes celulares, en este caso proteínas.

### 5.1.4 Carbohidratos

Los carbohidratos encontrados en las muestras de AB sin tratar mostraron el menor valor de todas las setas analizadas en este estudio, (62,90g/100g). El mayor valor encontrado en AB correspondió al tratamiento más intenso, 2kV/cm-30 pulsos, (69,03g/100g), diferente del resto de tratamientos e intensidades. (Figura 50).

En los carbohidratos de PO los datos reflejaron una disminución al aplicarle cualquier tratamiento, excepto 1,2kV/cm-18 pulsos y 2kV/cm-30 pulsos que se mantuvieron igual estadísticamente al valor de las setas sin tratar..

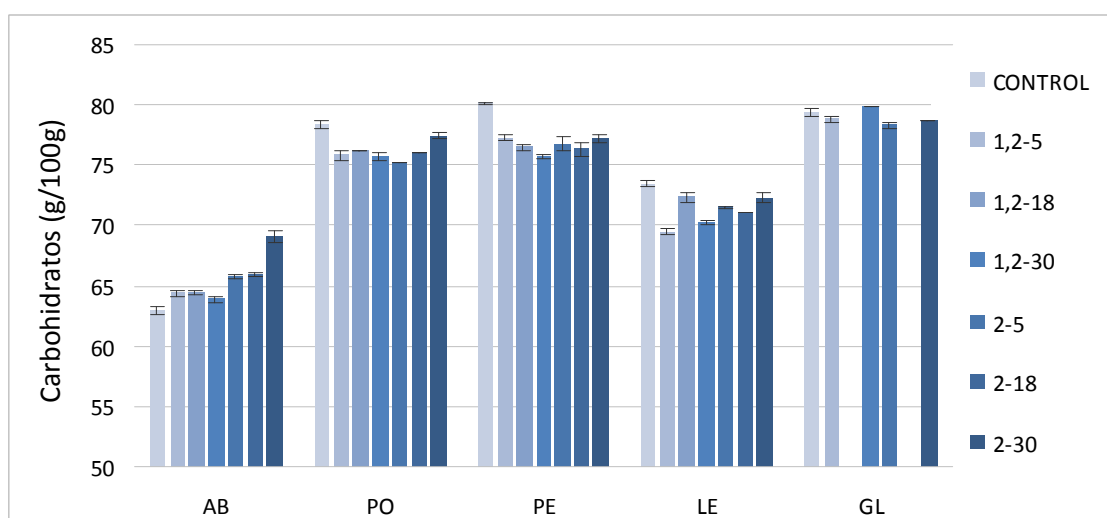


Figura 50. Contenido en carbohidratos de los hongos tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

AB: *Agaricus bisporus*, GL: *Ganoderma lucidum*, LE: *Leuntinula edodes*, PE: *Pleurotus eryngii*, PO: *Pleurotus ostreatus*. Tratamientos: Control, 1,2 kV/cm-5 pulsos, 1,2 kV/cm-18 pulsos, 1,2 kV/cm-30 pulsos, 2 kV/cm-5 pulsos, 2 kV/cm-18 pulsos y 2 kV/cm-30 pulsos.

En GL y PE las setas sometidas a PEMIC mantuvieron o disminuyeron los contenidos en carbohidratos de las setas sin tratar.

### 5.1.5 Energía

Según los resultados obtenidos con el cálculo de la energía observamos que AB es la seta que menos energía proporcionó, (371,13 kcal), mostrando valores similares a los del estudio de Cheung (2013), y como ya se ha visto anteriormente en el capítulo I con las variedades de la especie *Agaricus*, ABp y AB. Los resultados de energía obtenidos con el tratamiento 2kV/cm-30 pulsos fueron mayores en todas las setas y diferentes al resto de tratamientos, aportando 384 kcal. (Figura 51).

GL, PE, PO y LE, mostraron similitud con sus controles en cuanto a la energía aportada sin presentar diferencias estadísticas significativas. La energía fue calculada

con los contenidos en grasas, proteínas y carbohidratos, estudiados anteriormente, por lo que los resultados dependen de la influencia que tuvieron en ellos los tratamientos realizados con PEMIC. Por tanto, el tratamiento aplicado no afectó a la energía aportada por ninguna de las setas estudiadas.

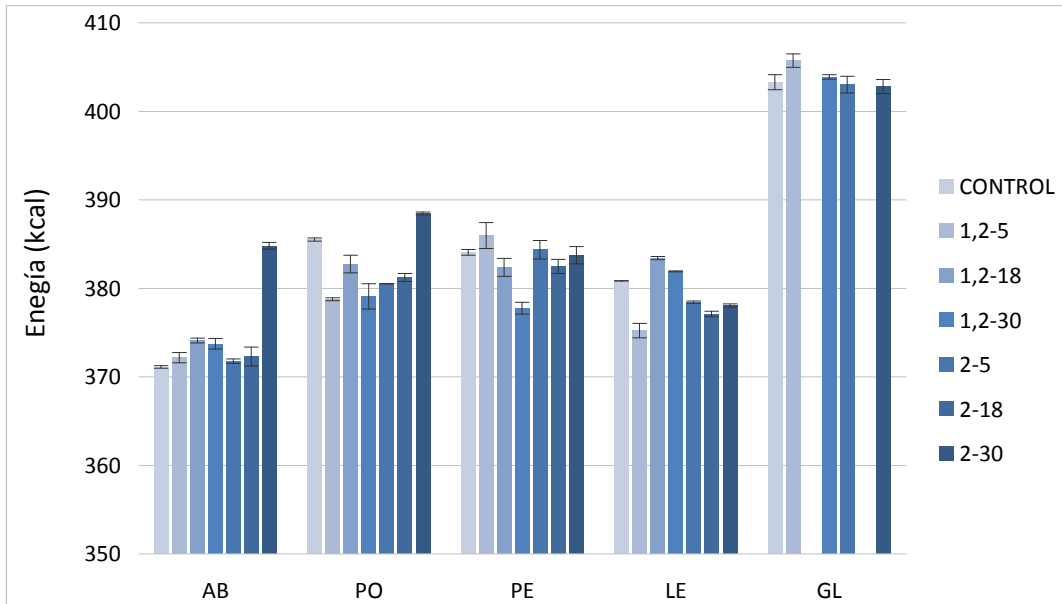


Figura 51. Contenido de energía de los hongos tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

AB: *Agaricus bisporus*, GL: *Ganoderma lucidum*, LE: *Leuntinula edodes*, PE: *Pleurotus eryngii*, PO: *Pleurotus ostreatus*. Tratamientos: Control, 1,2 kV/cm-5 pulsos, 1,2 kV/cm-18 pulsos, 1,2 kV/cm-30 pulsos, 2 kV/cm-5 pulsos, 2 kV/cm-18 pulsos y 2 kV/cm-30 pulsos.

Con los resultados de este estudio se demuestra que la composición centesimal puede verse influenciada por el tratamiento de PEMIC, siendo determinante el tipo de seta utilizada y su grado de sensibilidad a que se modifique su membrana celular. En este caso, GL fue la seta que menos vio alterada su estructura por los PEMIC por lo que su composición centesimal se mantuvo, independientemente del tratamiento aplicado.

### 5.1.6 Fibra dietética

#### 5.1.6.1 Fibra Dietética Insoluble (FDI)

Como se observa en la **Figura 52**, las setas sometidas a tratamientos 1,2kV/cm-5pulsos y 2kV/cm-30pulsos presentaron contenidos de FDI estadísticamente diferentes en AB, GL y PO, superando estadísticamente los valores de las setas sin tratar. La aplicación de la menor intensidad con el menor número de pulsos, 1,2kV/cm-5pulsos, fue suficiente para obtener un aumento en la concentración de FDI en todos los casos.

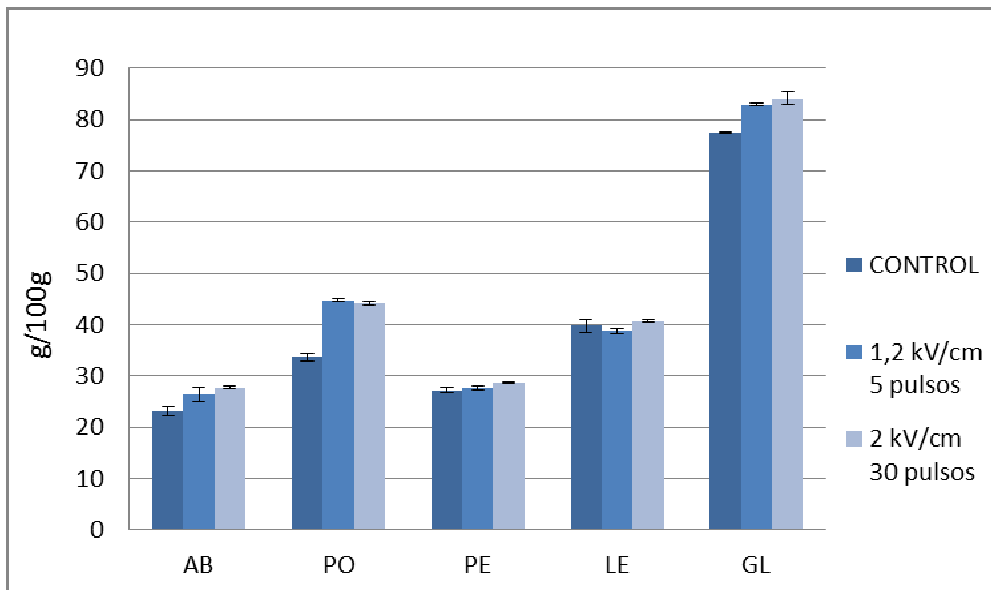


Figura 52. Contenido Fibra Dietética Insoluble de las setas tratadas con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

AB: *Agaricus bisporus*, GL: *Ganoderma lucidum*, LE: *Leuntinula edodes*, PE: *Pleurotus eryngii*, PO: *Pleurotus ostreatus*. Tratamientos: Control, 1,2 kV/cm-5 pulsos, y 2 kV/cm-30 pulsos.

GL no es una seta comestible debido a su estructura fibrosa y acorchada que se puede atribuir en parte a un alto contenido en FDI, por lo que es muy utilizada como nutraceutico en industria farmacéutica o química (Cheung, 1997). La aplicación de PEMIC hizo que el contenido de FDI aumentara respecto al control un 6,96 y 8,54% en los tratamientos 1,2 kV/cm-5pulsos y 2 kV/cm-30 pulsos, lo que no mejora su comestibilidad. La Fibra Dietética forma parte de la pared celular de las setas, por lo que una permeabilización reversible realizada por PEMIC favorece la liberación de sus compuestos, tanto solubles como insolubles.

A pesar del aumento de los valores de FDI en PO respecto al control, 33% aproximadamente, la cantidad que se obtuvo concuerda con los valores de FDI en PO obtenidas de diferentes trabajos realizados por Aishah y Rosly (2013) y Synytsya et al., (2008). Por tanto, la producción de PO realizada en la presente tesis, la más cultivada en La Rioja, podría obtener un contenido similar a otras existentes en el mercado con mayor concentración de FDI. Esto se debe a la electroporación producida en la membrana celular por los PEMIC, donde se crearon unos poros que permitían dejar la FDI disponible para su determinación.

#### 5.1.6.2 Fibra dietética Soluble (FDS)

En los resultados obtenidos de FDS no se apreciaron diferencias entre intensidades ni pulsos aplicados y fueron iguales estadísticamente a las muestras sin tratar (Figura 53). El tratamiento de PEMIC no afectó a la cantidad de FDS en ninguna



de las cinco setas estudiadas en este apartado, coincidiendo con estudios realizados en AB y LE (Di Anibal et al., 2015) o en GL (Nile y Park, 2004).

Sin embargo, gracias a los PEMIC, las membranas celulares exhiben una inestabilidad transitoria por la cual se vuelven permeables facilitando la disponibilidad de los compuestos solubles. De hecho, ya se demostró en 1983 que un campo eléctrico suave, en el rango de 0,1-0,2 kV/cm, pudo mejorar el coeficiente de difusión de sustancias solubles, (Bazhal and Guly, 1983), y más recientemente, se encontró que los PEMIC tenían un efecto creciente sobre la difusión de sustancias solubles a partir de discos de manzana y achicoria (Jemai and Vorobiev, 2002 y Loginova et al., 2010). Según esto, se dedujo que los poros abiertos en setas durante la aplicación de PEMIC no fueron lo suficientemente grandes para afectar al contenido en FDS.

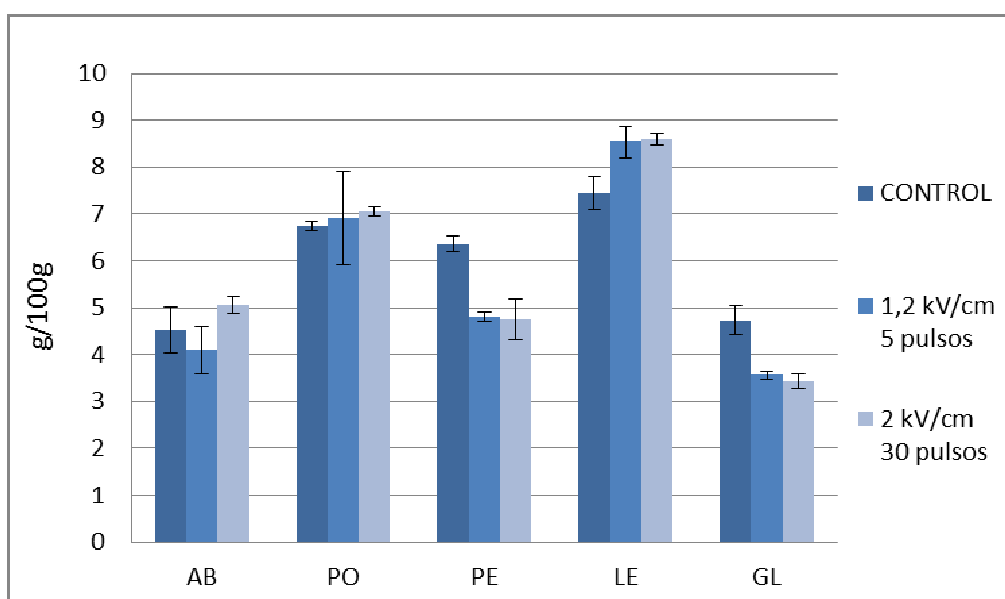


Figura 53. Contenido Fibra Dietética Soluble de los hongos tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

AB: *Agaricus bisporus*, GL: *Ganoderma lucidum*, LE: *Leuntinula edodes*, PE: *Pleurotus eryngii*, PO: *Pleurotus ostreatus*. Tratamientos: Control, 1,2 kV/cm-5 pulsos, y 2 kV/cm-30 pulsos.

El ratio FDI/FDS, varía de 4,27 en el control de PE a 24,61 en el tratamiento 2kV/cm-30 pulsos de GL. Estas variaciones indican qué setas son más beneficiosas en determinadas situaciones; a menor ratio, más cantidad de FDS, mejor control de la hipercolesterolemia, y a mayor ratio, más cantidad de FDI, mejor regulación del tránsito intestinal.

Además, con los tratamientos de PEMIC el ratio aumentó en AB, GL, PE y PO utilizando ambos tratamientos, 1,2kV/cm-5 pulsos y 2kV/cm-30 pulsos, y se favorecieron las propiedades de aumento del volumen fecal y reducción del tiempo de tránsito gastrointestinal. Sin embargo, la seta LE disminuyó el ratio desde 5,35 en las setas sin tratar hasta 4,55 en el tratamiento 1,2kV/cm-5 pulsos, por lo que se favoreció el contenido de FDS promoviendo las mejoras en la reducción del riesgo de

enfermedades cardiovasculares, reducción del colesterol en el suero sanguíneo y promoción de la microflora intestinal (Ferguson et al., 1995).

### 5.1.6.3 Fibra Dietética Total (FDT)

El contenido de Fibra Dietética Total en las cinco especies estudiadas varió desde 27,66 g/100 g en las setas de AB sin tratar a 87,64 g/100 g en 2kV/cm-30 pulsos en GL. En todas las setas estudiadas, la aplicación de PEMIC dio lugar a un aumento de la concentración de fibra dietética.

Todas las setas sin tratar tuvieron menos FDT que aquellas a las que se aplicaron PEMIC, siendo mayores estadísticamente AB, GL y PO en el tratamiento 2 kV/cm-30 pulsos. Es en PO donde se observó una mayor diferencia, con 40,44g/100g en el control y unas muestras tratadas de 51g/100g. Ambos valores son similares a los obtenidos por Synytsya et al., (2008), en su estudio del pie y el sombrero de diferentes variedades de la setas PO y PE, por lo que se podría equiparar el contenido en FDT de la variedad utilizada en esta Tesis Doctoral.

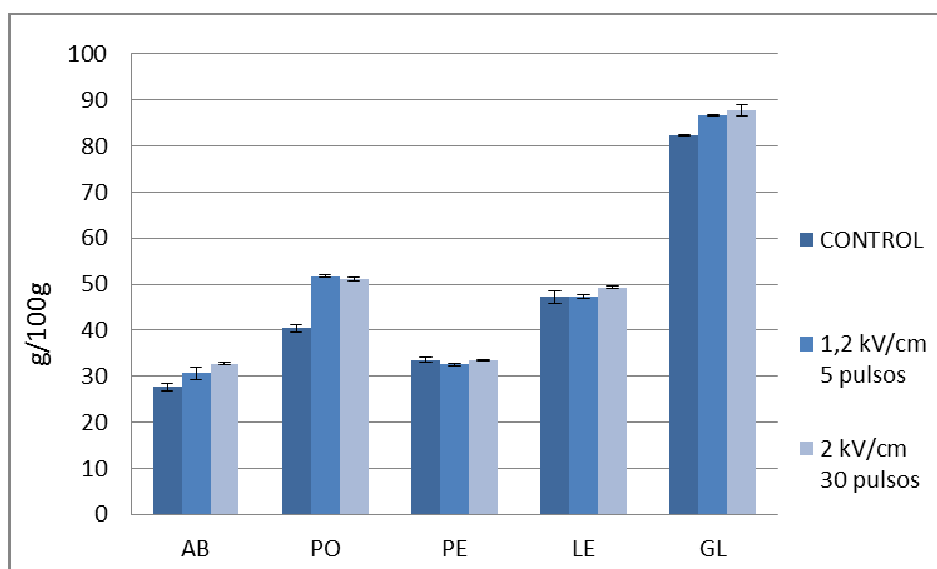


Figura 54. Contenido Fibra Dietética Total de los hongos tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

AB: *Agaricus bisporus*, GL: *Ganoderma lucidum*, LE: *Leuntinula edodes*, PE: *Pleurotus eryngii*, PO: *Pleurotus ostreatus*. Tratamientos: Control, 1,2 kV/cm-5 pulsos, y 2 kV/cm-30 pulsos.

El contenido de FDT en AB fue el menor de los resultados obtenidos, al igual que en el capítulo I de esta tesis (25,47%) y coincidiendo con los trabajos de otros autores (Cheryl et al., 2005 y Nile y Park 2005), pero aumentó con el empleo de PEMIC por lo que se potenciaría esa carencia respecto a la cantidad de fibra de otras setas.

De estos resultados se concluye que gracias a los PEMIC la FDI de las setas fue más fácil de activar y disponer que la FDS, debido al tamaño de poro y a la permeabilización de la membrana celular creada por la tecnología. Además, los PEMIC

aceleran el metabolismo de las setas induciendo la lignificación de la pared celular, un proceso regulado y dinámico que sucede en el desarrollo normal de la célula y en respuesta a diferentes tensiones, (Boudet, 2000)

La lignificación tiene como función principal fortalecer el cuerpo vascular de las células (Barros et al., 2015), por lo que al recibir un estrés por parte de los PEMIC, se indujo una lignificación produciendo un aumento en el contenido de FDI. Además, la FDS estuvo presente en menor concentración, por lo que en el momento de la determinación, al precipitar en etanol la FDS durante una hora, pudo retenerse más cantidad en la célula.

### **5.1.7 Glucanos**

#### **5.1.7.1 $\alpha$ -glucanos**

El rango de valores de  $\alpha$ -glucanos encontrado en las setas tratadas con PEMIC estuvo entre de 0,41g/100g en GL (1,2kV/cm-30 pulsos) y 10,33 g/100g en PE (control). Todas ellas presentaron valores iguales o menores estadísticamente a su respectivo control, por lo que la tecnología de PEMIC no favoreció el aumento de  $\alpha$ -glucanos en AB, PO, PE, LE y GL.

Los valores de  $\alpha$ -glucanos en GL fueron insignificantes, en torno a 0,5g/100g, y no hubo cambios respecto al control, por lo que los PEMIC no fueron capaces de permeabilizar la célula para que los  $\alpha$ -glucanos aumentaran. Estos resultados concuerdan con los del estudio de Cho et al., 2013, que muestran los resultados de ocho variedades diferentes de GL. Sin embargo, se ha realizado una investigación acerca del método de análisis y su fabricante cambió el método al compararse varios métodos basados en ácidos y enzimas para la hidrólisis de  $\beta$ -glucano. Para la mayoría de las muestras, se obtuvieron valores similares de  $\beta$ -glucano con los procedimientos optimizados de HCl, el empleado habitualmente, y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Sin embargo, en el caso de ciertas muestras, específicamente *Ganoderma lucidum* y *Poria cocos*, el procedimiento H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dio como resultado valores significativamente más altos de  $\alpha$ -glucanos, de 22 a 45g/100 en diferentes variedades, y por tanto, valores más bajos de  $\beta$ -glucanos.

#### **5.1.7.2 $\beta$ -glucanos**

En este experimento, donde los PEMIC fueron aplicados directamente sobre los cuerpos fructíferos de las setas, el rango de  $\beta$ -glucanos fue de 11,47 g /100 g en AB (1,2kV/cm-18 pulsos) a 47,45 g/100 g en PE (2kV/cm-5 pulsos) coincidiendo con valores obtenidos en diferentes estudios en setas de diferentes variedades sin tratar. (Gil-Ramírez et al., 2011 y Rop et al., 2009).

Al estudiar los  $\beta$ -glucanos en AB, se observó que era la seta que menor cantidad tenía de este polisacárido de las cinco estudiadas (15,97g/100g), y ninguno de los tratamientos con PEMIC aumentó el contenido de  $\beta$ -glucanos de las AB sin tratar.

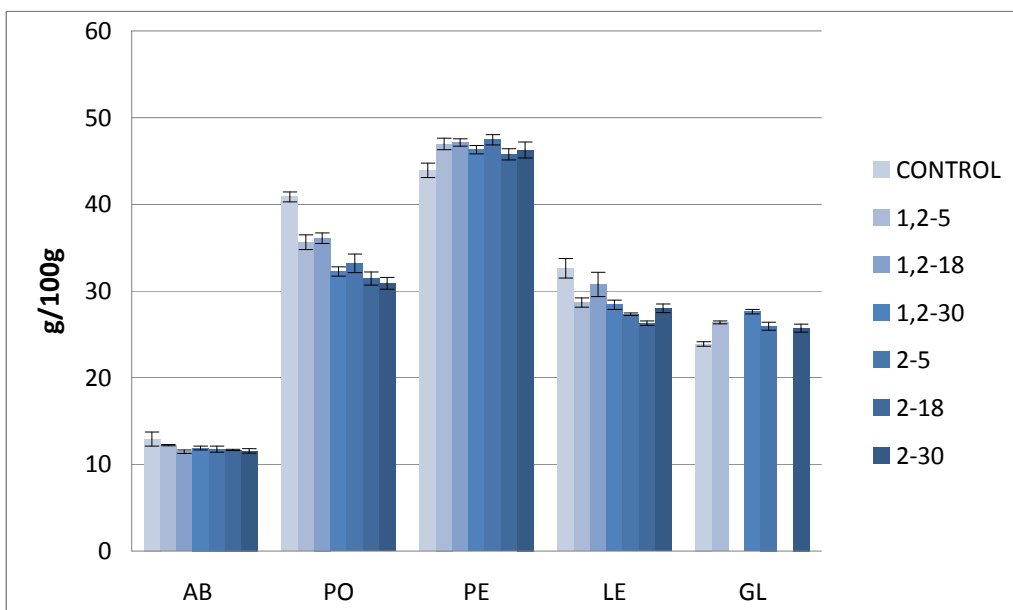


Figura 55. Contenido en  $\beta$ -glucanos de las setas tratadas con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

AB: *Agaricus bisporus*, GL: *Ganoderma lucidum*, LE: *Leuntinula edodes*, PE: *Pleurotus eryngii*, PO: *Pleurotus ostreatus*. Tratamientos: Control, 1,2 kV/cm-5 pulsos, 1,2 kV/cm-18 pulsos, 1,2 kV/cm-30 pulsos, 2 kV/cm-5 pulsos, 2 kV/cm-18 pulsos y 2 kV/cm-30 pulsos.

Los valores de  $\beta$ -glucanos obtenidos en LE estuvieron entre 26,29 g/100 g en 2kV/cm y 18 pulsos y 32,61 g/100g el tratamiento sin recibir PEMIC, valores similares a los obtenidos por Bak et al., (2015), y sin diferencias significativas con el control, de modo que los PEMIC no aumentaron el contenido de  $\beta$ -glucanos en LE.

Los tratamientos aplicados en PE no fueron efectivos en la concentración de  $\beta$ -glucanos, solo el tratamiento 2kV/cm-5 pulsos dio lugar al mayor valor, 47,45 g/100g, y aumentó significativamente su contenido respecto al control pero sin presentar diferencias significativas con el resto de tratamientos a los que se les aplicó PEMIC.

En la seta GL, los  $\beta$ -glucanos aumentaron significativamente su contenido respecto al control en todos los tratamientos de PEMIC, siendo los tratamientos con intensidad 1,2 kV/cm, con 5 y 30 pulsos, los que mostraron los mayores valores con 26,39 y 27,63 g/100 g respectivamente. Este aumento se debió al estrés generado por los PEMIC en las células ya que se produjo una lisis en la membrana permeabilizándola y permitiendo que los compuestos estuvieran más disponibles que en el interior de la célula.

GL, llamada seta de la inmortalidad, destaca más por su contenido en fibra que por los  $\beta$ -glucanos, pero con la tecnología de los PEMIC, la cantidad de estos polisacáridos presentes en la pared celular de GL aumentó, tal y como sucedió en la FDT. Así, esta seta, utilizada en infusiones y para extracciones de compuestos de

interés, presenta sus compuestos bioactivos más disponibles para su aprovechamiento mejorando sus propiedades funcionales.

En general, los  $\beta$ -glucanos de los hongos que se ven favorecidos por la aplicación de PEMIC en los cuerpos fructíferos son GL y PE con el tratamiento 2kV/cm-5pulsos. Los valores se corresponden con los obtenidos en los estudios de Papaspyridy et al., (2010) y Sari et al., (2016), entre otros.

### 5.1.7.3 Glucanos Totales

En la **Figura 56**, se muestra el contenido de Glucanos Totales de las setas a las que se aplicaron Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

Las setas AB tratadas con PEMIC presentaron menores concentraciones de glucanos totales que las que no fueron tratadas, sin mostrar diferencias significativas entre intensidades ni número de pulsos aplicados.

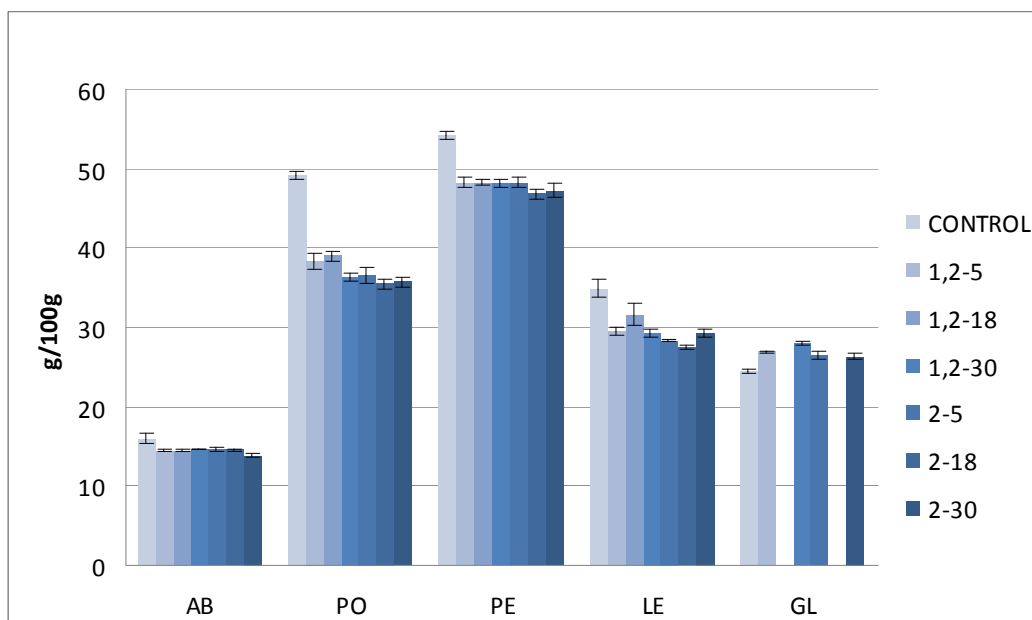


Figura 56. Contenido de Glucanos Totales de las setas a las que se aplicaron Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

AB: *Agaricus bisporus*, GL: *Ganoderma lucidum*, LE: *Leuntinula edodes*, PE: *Pleurotus eryngii*, PO: *Pleurotus ostreatus*. Tratamientos: Control, 1,2 kV/cm-5 pulsos, 1,2 kV/cm-18 pulsos, 1,2 kV/cm-30 pulsos, 2 kV/cm-5 pulsos, 2 kV/cm-18 pulsos y 2 kV/cm-30 pulsos.

En GL, se observó que todos los tratamientos aumentaron su contenido en Glucanos Totales respecto al control, desde 24,40 a 28,04 g/100g en 1,2kV/cm-30 pulsos. Esto se debió a que los PEMIC pueden ser aplicados satisfactoriamente en desintegrar tejido biológico y mejorar la liberación de componentes intracelulares. (Maged and Ayman 2006).

Al contrario que en GL, los glucanos encontrados en PO, PE y LE no mejoraron con el tratamiento de PEMIC. Todos los tratamientos llevaron a una disminución del contenido en  $\alpha$ -glucanos y  $\beta$ -glucanos, y por tanto en glucanos totales, respecto tratamiento sin aplicar PEMIC. Además, los datos obtenidos indicaron que no existen diferencias entre intensidad ni número de pulsos.

### 5.1.8 Actividad antioxidante

A continuación se muestran los resultados obtenidos con los cuatro métodos de análisis utilizados en las cinco variedades de setas tratadas con PEMIC: fenoles totales, ensayos basados en el secuestro de radicales DPPH y ABTS, y reducción de metales, Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP).

#### 5.1.8.1 Fenoles totales

En los tratamientos aplicados al cuerpo fructífero de cada una de las cinco setas, el rango de fenoles totales fue desde 66  $\mu\text{g EQ gálico}/100\text{mg}$  en PO 2kV/cm-30 pulsos hasta 198,8  $\mu\text{g EQ gálico}/100\text{ mg}$  en el tratamiento AB 1,2kV/cm-5 pulsos. Solo las setas PE y LE aumentaron significativamente con los tratamientos de PEMIC respecto a las no tratadas.

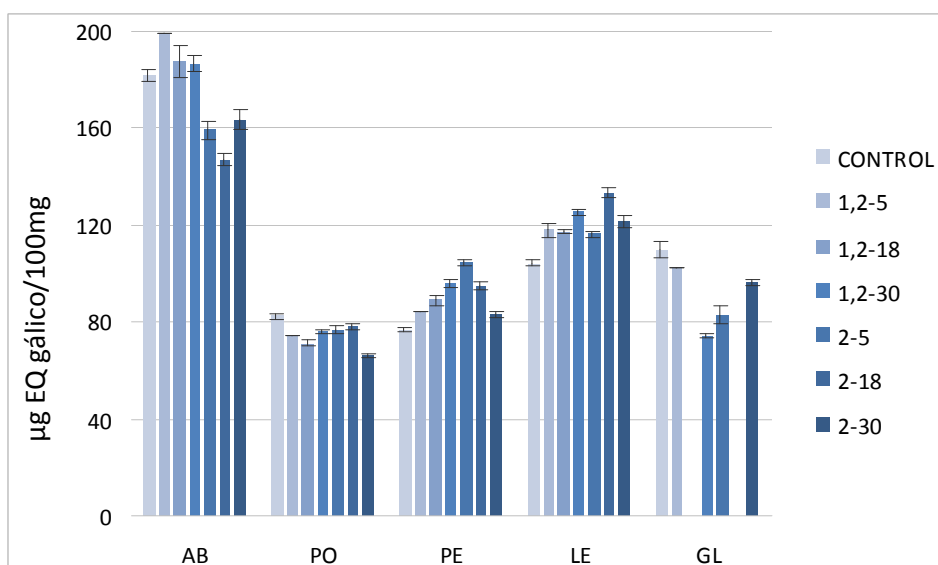


Figura 57. Fenoles Totales de las setas cultivadas en La Rioja tratadas con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ( $\mu\text{g EQ gálico}/100\text{mg}$ ).

AB: *Agaricus bisporus*, GL: *Ganoderma lucidum*, LE: *Leuatinula edodes*, PE: *Pleurotus eryngii*, PO: *Pleurotus ostreatus*. Tratamientos: Control, 1,2 kV/cm-5 pulsos, 1,2 kV/cm-18 pulsos, 1,2 kV/cm-30 pulsos, 2 kV/cm-5 pulsos, 2 kV/cm-18 pulsos y 2 kV/cm-30 pulsos.

Los mayores valores obtenidos de fenoles totales en AB se obtuvieron con la intensidad de 1,2 kV/cm, sin diferenciarse estadísticamente considerando el número de pulsos aplicados ni del control (181,99  $\mu\text{g EQ gálico}/100\text{mg}$ ).

El tratamiento de intensidad 2 kV/cm, independientemente del número de pulsos aplicados, resultó demasiado intenso y los fenoles totales de las setas se redujeron de un 11 a un 20% respecto al control. Los PEMIC se aplican para permeabilizar la pared celular, pero si la intensidad aplicada es muy grande se puede producir un daño en la célula por permeabilización irreversible teniendo como consecuencia la degradación de los compuestos de interés. En un estudio del efecto de los PEMIC en puré de manzana, (Schilling et al., 2007), se aplicaron 1, 3 y 5 kV/cm y 30 pulsos y se determinaron el rendimiento de extracción y la actividad antioxidante. En un primer momento no se observaron diferencias respecto al control, pero según avanzaba el tiempo de almacenamiento, la actividad antioxidante disminuía a partir de 5kV/cm, por lo que los compuestos de interés se degradaron y lo atribuyeron a un daño irreversible en la célula.

AB muestra los mayores valores de las cinco setas coincidiendo los contenidos con los encontrados en otros estudios en setas, como los de Dubost et al (2007), Ketawan et al., (2011) y Reis et al., (2012) donde se observó que las setas del género *Agaricus* eran las que más fenoles totales presentaban, y por tanto, una mayor capacidad de proteger a los organismos o células de los daños causados por el estrés oxidativo (Parniakov et al., 2014).

Respecto a las setas GL y PO no mejoraron su contenido en polifenoles totales respecto al control, además sus resultados son los más bajos de las cinco setas estudiadas en este capítulo (110,1 y 82,3 µg EQ gálico/100mg respectivamente).

Todos los valores de fenoles totales cuando se aplicaron PEMIC en PE aumentaron respecto al control y fue el tratamiento de 2kV/cm y 5 pulsos el que mayor actividad antioxidante presentó con un aumento del 35% respecto al control.

Sin embargo, al aumentar el número de pulsos en la misma intensidad, los fenoles totales disminuyeron, por lo que el estrés producido en la célula fue demasiado grande provocando daños en la membrana celular y por consiguiente, no permitiendo la reacción de fenoles.

Al igual que en PE, todos los tratamientos aplicados a LE mostraron un aumento respecto al control, siendo los mayores valores los obtenidos en los tratamientos de 2kV/cm con 18 pulsos, que dieron lugar a un aumento del 27% respecto al control (133,32 µg EQ gálico/100mg). Esto concuerda con el estudio realizado en uvas en el que se aumentó el contenido de Fenoles Totales del 13 al 28% aplicando 0,5 kV/cm y 50 pulsos (Balasa et al., 2006).

#### **5.1.8.2 DPPH**

Los valores obtenidos en la determinación de DPPH fueron desde 0,34 µmol EQ trolox/100mg en AB 2kV/cm-30 pulsos hasta 2,20 µmol EQ trolox /100mg en LE

1,2kV/cm-18 pulsos. Las setas PO, PE y LE, aumentaron significativamente con los tratamientos de PEMIC respecto al control.

En AB el control mostró el mayor valor, por lo que el tratamiento no mejoró el contenido en DPPH. Por el contrario, en PO todos los tratamientos, excepto 2kV/cm-30 pulsos, dieron lugar en un aumento estadísticamente significativo respecto al no tratado, siendo el que mostró un valor más alto 2 kV/cm-18 pulsos (0,65  $\mu\text{mol EQ trolox}/100\text{mg}$ ).

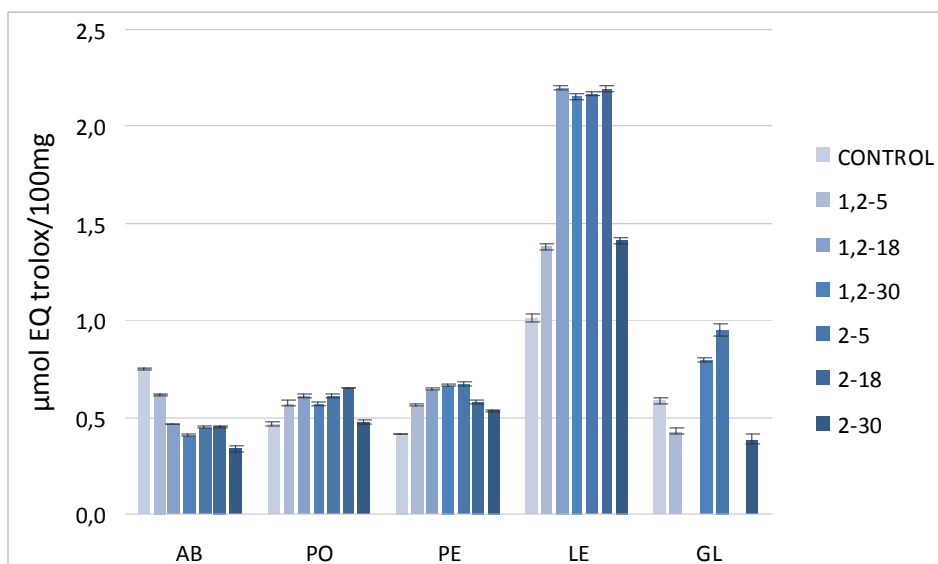


Figura 58. Actividad antioxidante determinada mediante el radical DPPH de las setas cultivadas en La Rioja tratadas con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ( $\mu\text{mol EQ trolox}/100\text{mg}$ )

AB: *Agaricus bisporus*, GL: *Ganoderma lucidum*, LE: *Leuatinula edodes*, PE: *Pleurotus eryngii*, PO: *Pleurotus ostreatus*. Tratamientos: Control, 1,2 kV/cm-5 pulsos, 1,2 kV/cm-18 pulsos, 1,2 kV/cm-30 pulsos, 2 kV/cm-5 pulsos, 2 kV/cm-18 pulsos y 2 kV/cm-30 pulsos.

Todos los valores de PE tratada con PEMIC aumentaron respecto a los que permanecieron sin tratar. Según los datos obtenidos, el tratamiento de 2kV/cm y 5 pulsos fue el que mayor actividad antioxidante aportó, (0,671  $\mu\text{mol EQ trolox}/100\text{mg}$ ), con un aumento del 63% respecto al control, seguido de 1,2kV/cm-30pulsos. Delsart et al., (2014) estudiaron el contenido en taninos y antocianinas (compuestos fenólicos) en uvas y encontraron que la aplicación de PEMIC, 0,7-4kV/cm durante 1-200ms, producía un aumento en sus concentraciones de taninos (34%) y de antocianinas (19%).

Al igual que en PE, los mayores valores de DPPH obtenidos en LE fueron iguales y estadísticamente significativos en 1,2kV/cm-18 pulsos, 1,2 kV/cm-30 pulsos, 2 kV/cm-5pulsos y 2kV/cm-18pulsos, siendo los más altos de las cinco setas. Sin embargo en el tratamiento 2kV/cm-30 pulsos se apreció una disminución de la cantidad de  $\mu\text{moles}$  de



TROLOX por 100 gramos por lo que el aumento de la duración del tratamiento provocó una electropermeabilización causando daños en las células de la seta PE.

El tratamiento de 2kV/cm-5 pulsos aplicado a GL obtuvo los valores más altos. Sin embargo, 2kV/cm-30pulsos, fue menor al control, por lo que parece que la aplicación de PEMIC dañó la membrana celular impidiendo la liberación de los metabolitos que reaccionan con el radical DPPH. Respecto al tratamiento aplicado a 1,2 kV/cm, con 5 pulsos no fue suficiente para superar el contenido de los no tratados, algo que si se consiguió significativamente aplicando 30 pulsos.

Independientemente de la seta utilizada, el tratamiento de 2kV/cm resultó excesivo al aplicar 30 pulsos, lo que se traduce en una permeabilización irreversible, en la que los poros producidos por los PEMIC, no se cerraron una vez terminado el tratamiento y se produjo un daño irreversible en la pared celular de las setas, tal y como observó Tsong, (1996), al permeabilizar de forma irreversible tejido vegetal y animal con tratamientos de PEMIC de 0,5 a 3 kV/cm.

### 5.1.8.3 ABTS

Los valores obtenidos fueron desde 0,38  $\mu\text{mol EQ trolox /100mg}$  en LE 1,2-5 hasta 3,02  $\mu\text{mol EQ trolox /100mg}$  en AB 2-18.

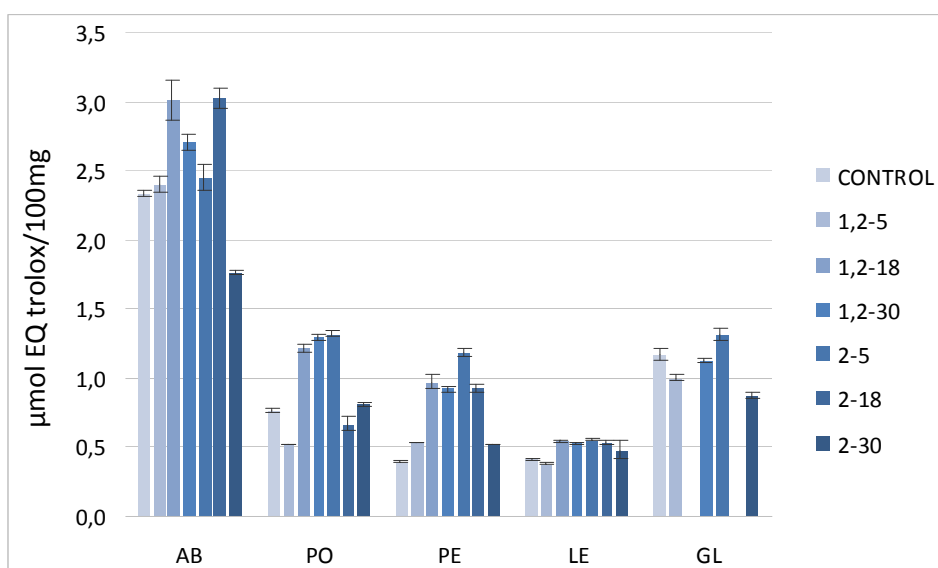


Figura 59. Actividad antioxidante determinada mediante el radical ABTS de las setas cultivadas en La Rioja tratadas con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ( $\mu\text{mol EQ trolox/100mg}$ )

AB: *Agaricus bisporus*, GL: *Ganoderma lucidum*, LE: *Leutininula edodes*, PE: *Pleurotus eryngii*, PO: *Pleurotus ostreatus*. Tratamientos: Control, 1,2 kV/cm-5 pulsos, 1,2 kV/cm-18 pulsos, 1,2 kV/cm-30 pulsos, 2 kV/cm-5 pulsos, 2 kV/cm-18 pulsos y 2 kV/cm-30 pulsos.

En AB la mayor actividad antioxidante se obtuvo al aplicar los tratamientos 2 kV/cm-18pulsos y 1,2 kV/cm con 18 y 30 pulsos siendo diferentes significativamente de las no tratadas. Hay que destacar el descenso del valor en el tratamiento más

intenso debido a un estrés excesivo provocado por los PEMIC, tal y como se ha comentado anteriormente en otras determinaciones.

En PO las setas tratadas con 1,2 kV/cm-30 pulsos y 2 kV/cm-5 pulsos fueron las que presentaron valores más altos de actividad antioxidante, al igual que en la seta GL, presentado diferencias estadísticamente significativas en el tratamiento 2 kV/cm-5 pulsos.

Todos los valores obtenidos en PE aumentaron respecto a las muestras sin tratar. Según los datos obtenidos, el tratamiento de 2kV/cm y 5 pulsos fue el que mayor actividad antioxidante aportó.

Los resultados más altos obtenidos en los tratamientos de PEMIC en LE no mostraron diferencias significativas estadísticamente obteniéndose valores de 0,53-0,55  $\mu\text{mol EQ trolox /100mg}$ , en 1,2 kV/cm con 18 y 30 pulsos y 2 kV/cm con 5 y 18 pulsos.

#### **5.1.8.4 FRAP**

El método FRAP, basado en la capacidad de reducción férrica, mostró unos resultados que fueron desde 0,48  $\mu\text{mol EQ trolox /100mg}$  en el control de PO hasta 2,73  $\mu\text{mol EQ trolox /100mg}$  en el tratamiento de 1,2kV/cm-18 pulsos de AB. Respecto a las setas sin tratar, mejoraron los tratamientos aplicados a PO, PE y LE , así como a los tres tratamientos de intensidad 1,2 kV/cm de AB tal y como se observa en la figura 60.

AB, con los mayores valores de las cinco setas, aumentó además sus valores con la intensidad 1,2 kV/cm con las tres duraciones del tratamiento, 5, 18 y 30 pulsos, siendo significativamente diferentes a las muestras de AB sin tratar. Sin embargo, con la intensidad 2kV/cm se estresó en exceso la membrana celular y no se vio mejorada la capacidad de reducción férrica del reactivo FRAP. Por tanto, AB fue la seta más recomendable para ser consumida por proteger las células del estrés oxidativo, tal y como recomendaron Rajarathnam et al., (2003), y Bubuneanu et al., (2015), entre otros.

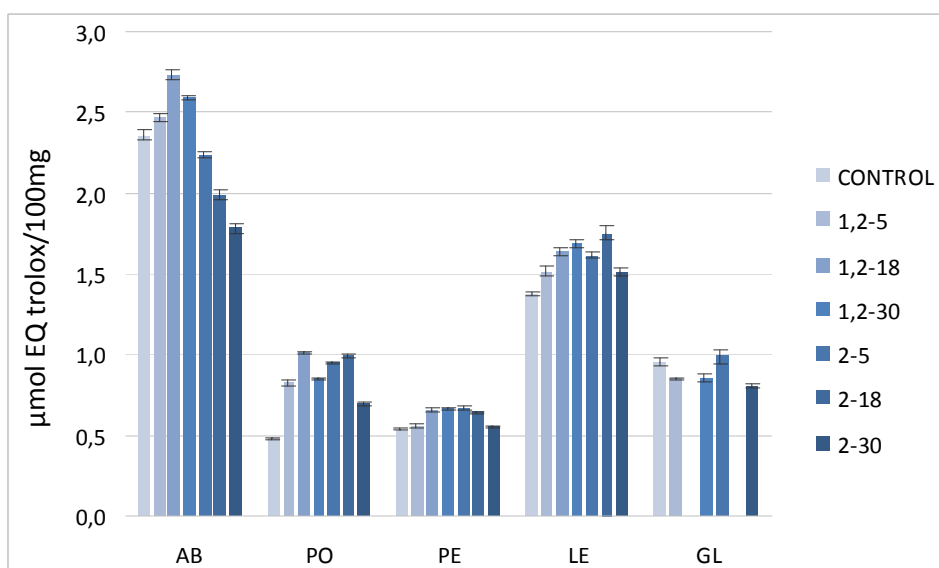


Figura 60. Actividad antioxidante determinada mediante el radical FRAP de las setas cultivadas en La Rioja tratadas con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. ( $\mu\text{mol EQ trolox}/100\text{mg}$ )

AB: *Agaricus bisporus*, GL: *Ganoderma lucidum*, LE: *Leuatinula edodes*, PE: *Pleurotus eryngii*, PO: *Pleurotus ostreatus*. Tratamientos: Control, 1,2 kV/cm-5 pulsos, 1,2 kV/cm-18 pulsos, 1,2 kV/cm-30 pulsos, 2 kV/cm-5 pulsos, 2 kV/cm-18 pulsos y 2 kV/cm-30 pulsos.

Respecto a PO, todos los tratamientos a los que se aplicaron PEMIC aumentaron la capacidad de reducción férrica de las setas sin tratar, siendo 1,2kV/cm y 2kV/cm, ambos con 18 pulsos, los tratamientos que mostraron los valores más altos. La electroporación de las células realizada por la tecnología de PEMIC permitió un aumento de la disponibilidad de los metabolitos secundarios, al igual que en el estudio con mango de Parniakov et al., (2015), donde obtuvieron un incremento en el contenido de compuestos antioxidantes, como compuestos fenólicos.

En PE todos los tratamientos mostraron valores que aumentaron respecto a los no tratados excepto los tratamientos de 1,2kV/cm-5 pulsos y 2kV/cm-30 pulsos (0,56 y 0,55  $\mu\text{mol EQ trolox}/100\text{mg}$ ). En LE, al aplicar los PEMIC se aumentó la actividad antioxidante siendo los mayores valores los obtenidos del tratamiento 2kV/cm-18 pulsos, seguido, sin diferencias significativas, de 1,2kV/cm-30 pulsos. Los PEMIC tienen la capacidad de inducir un estrés subletal a las células por la permeabilización de las membranas celulares y el movimiento electroforético de los compuestos entre compartimentos celulares, lo que facilita su obtención (Roselló-Soto et al., 2015)

En la seta GL, a pesar de mostrar los valores más altos en cuanto a la capacidad de reducción férrica de las cinco setas evaluadas, no reflejó diferencias estadísticamente significativas en las seas tratadas con PEMIC y las que no tuvieron ningún tratamiento.

Los Fenoles Totales participan en gran medida en la actividad antioxidante de los hongos, tal como se ha demostrado en estudios previos donde se ha encontrado una correlación lineal entre fenoles y actividad antioxidante (Dubost et al., 2007).

Todas las setas de este estudio tratadas con PEMIC mostraron una correlación positiva entre el contenido de Fenoles Totales y la actividad antioxidante determinada tanto frente a radicales (DPPH, ABTS) como a transferencia de electrones (FRAP). La correlación positiva y significativa entre Fenoles Totales y ABTS ( $R^2=0,683$ ) así como entre Fenoles Totales y FRAP ( $R^2= 0,901$ ) indica que los fenoles totales de las setas estudiadas inhiben los radicales libres por el mecanismo del poder reductor más que por el de la actividad secuestrante, coincidiendo con las correlaciones de las 13 setas en el capítulo I.

Por tanto, los fenoles totales y la actividad antioxidante mostraron una alta y positiva correlación, especialmente si se considera el ensayo con el radical FRAP ( $R^2= 0.901$ ,  $p<0,01$ ) en concordancia con el estudio realizado por Ghahremani-Majd, (2015). Los hongos son una fuente importante de antioxidantes que podrían proteger al cuerpo humano de los radicales libres. Además, el efecto producido en las células de las setas por la tecnología de PEMIC favorece el aumento de su actividad antioxidante.



## 6 CAPÍTULO III: EFECTO DE LA APLICACIÓN DE PULSOS ELÉCTRICOS DE INTENSIDAD DE CAMPO MODERADA EN PAQUETES DE *LENTINULA EDODES* (SHIITAKE) Y CARACTERIZACIÓN DE SUS COMPUESTOS BIOACTIVOS

El estudio se realizó en las instalaciones del CTICH, donde se cultivaron, trataron con PEMIC, recolectaron y caracterizaron los diez tratamientos de la seta *Lentinula edodes*. Se han estudiado la producción, composición centesimal, cantidad de fibra dietética y  $\beta$ -glucanos, y actividad antioxidante.

### 6.1 Producción

En la producción de LE no se observaron diferencias significativas. A continuación, en la Tabla 23, se muestran los valores obtenidos en gramos por paquete y el % respecto a control.

Tabla 23. Producción de *Lentinula edodes* (g/paquete) en los paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo y porcentaje respecto al control. <sup>a) b)</sup>

PRODUCCIÓN LE	g/paquete	% respecto al CT
<b>CONTROL</b>	508,10±73,72 <sup>a</sup>	100
<b>0,3-2p</b>	451,80±70,55 <sup>a</sup>	88,92
<b>0,3-5p</b>	452,90±58,54 <sup>a</sup>	89,14
<b>0,7-2p</b>	423,20±70,98 <sup>a</sup>	83,29
<b>0,7-5p</b>	423,60±49,16 <sup>a</sup>	83,37
<b>1-2p</b>	447,50±79,52 <sup>a</sup>	88,07
<b>1-5p</b>	459,14±13,40 <sup>a</sup>	90,36
<b>0,3-10s</b>	379,40±42,80 <sup>a</sup>	74,67
<b>0,7-10s</b>	353,33±25,40 <sup>a</sup>	69,54
<b>1-10s</b>	402,00±34,53 <sup>a</sup>	79,12

a) Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas ( $P < 0.05$ ).

b) Nomenclatura se muestra en la tabla 15.

El control mostró el mayor rendimiento por paquete (508 g), pero sin mostrar diferencias estadísticamente significativas con el resto de tratamientos a los que se les aplicó la tecnología PEMIC.

Se han realizado investigaciones en cultivo de LE, y el rendimiento en la producción acumulado durante cuatro floradas se duplicó aplicando tensiones de 50 o 100 kV, (0,55 y 1,11 KV/cm). Sin embargo, el rendimiento se redujo de 320 a 240g al aumentar la tensión aplicada de 100 a 130 kV (1,11 a 1,44 kV/cm) (Takaki et al., 2014).

En el presente estudio se esperaba un aumento en el rendimiento de la producción de LE debido a la aplicación de PEMIC, ya que con la permeabilización reversible de la membrana celular, se activaría el crecimiento del micelio. De hecho, los tratamientos más extremos, con 10 segundos de aplicación de PEMIC, sufrieron un “estrés” tan prolongado en la membrana celular que, 5 días después de la aplicación, se observaron los paquetes con mucha más cantidad de micelio que en el resto de tratamientos, tal como se muestra en la figura 61.



Figura 61. Paquetes de *Lentinula edodes* cinco días después de aplicar los tratamientos 0,3 kV/cm, 0,7kV/cm y 1kV/cm con 10 segundos de aplicación de los PEMIC.

Bouzzara y Vorobiev, en 2000, observaron en zumo de remolacha que en un tratamiento a 0,04 kV/cm se necesitaban 200 segundos para permeabilizar las membranas, mientras que a 10 kV/cm, únicamente se necesitaron 5 $\mu$ s. Esto pudo suceder con los tratamientos de 10 segundos por un proceso de electroporación sufrido en la membrana celular, sin embargo, y en contra de lo esperado, no desembocó en un mayor crecimiento de cuerpos fructíferos en esos paquetes, que fueron los que presentaron menor producción.

En las Figuras 60 y 61 se aprecia la producción acumulada durante la primera, segunda y tercera florada de LE, observándose que los tres tratamientos de 10 segundos no presentaron mayor producción que el resto de tratamientos a pesar de su cantidad de micelio inicial. Esto puede ser debido a que se pasó de permeabilizar la membrana, como en los tratamientos de 2 y 5 pulsos, a inactivarla, dañando la célula e impidiendo que pudiera recuperarse para seguir con el ciclo de producción de primordios y carpóforos.

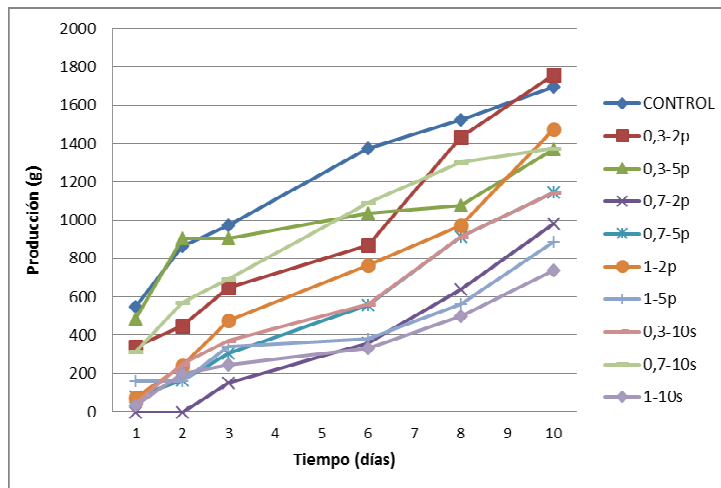


Figura 62. Producción de *Lentinula edodes* en la primera florada (kg).

En la primera florada, desde el primer día de recogida se recolectó mayor cantidad de setas de los paquetes que no habían sido tratados. A día 10, el último de la primera florada, el tratamiento 0,3kV/cm-2p mostró el mayor peso recogido hasta el momento, sin embargo en la segunda florada, los paquetes que no recibieron PEMIC volvieron a ser los más productivos, haciéndose más acusado en la tercera florada.

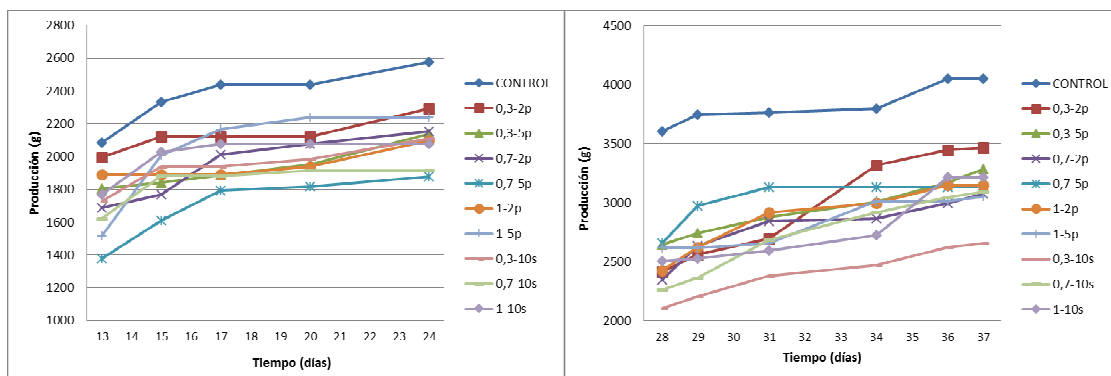


Figura 63: Producción *Lentinula edodes* de la segunda y tercera florada.

Según la bibliografía revisada, en función del tamaño y la forma de la célula, el campo eléctrico crítico en el cual los poros formados pasan a ser irreversibles oscila entre 1 y 2 kV/cm para las células vegetales, y entre 10 y 14 kV/cm para los microorganismos (Toepfl et al., 2005) y, si se quiere aplicar tratamientos para conseguir una inactivación microbiana suficiente que garantice la seguridad de los alimentos, se requieren intensidades del campo eléctrico superiores a los 25 kV/cm (Toepfl y col., 2006). Además, Schoenbach et al., en 1997 observaron que cuando un pulso era mayor de 50µs, la intensidad de campo crítica era de 4,9kV/cm.; y con un pulso de menos de 2µs, el valor aumentaba hasta 40kV/cm. Es por esto que la intensidad crítica de esta aplicación debió haber disminuido en gran medida al aplicar los pulsos eléctricos durante 10 segundos, y por tanto haber realizado un daño



irreversible en la célula impidiendo que crecieran los primordios. De hecho, los tres tratamientos de 10 segundos de aplicación, obtuvieron los menores pesos por paquete.

## 6.2 Composición centesimal

Tabla 24. Composición centesimal de *Lentinula edodes* (g/100g) obtenidas en los paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. <sup>a) b)</sup>

	Humedad	Cenizas	Grasas	Proteína	Carbohidratos	Energía (kcal)
<b>CONTROL</b>	89,88±0,24 <sup>ab</sup>	5,74±0,15 <sup>ab</sup>	2,17±0,01 <sup>de</sup>	17,34±0,03 <sup>b</sup>	75,48±0,83 <sup>bcd</sup>	384,27±3,39 <sup>a</sup>
<b>0,3-2p</b>	90,89±0,46 <sup>ab</sup>	5,99±0,07 <sup>b</sup>	2,19±0,02 <sup>e</sup>	19,07±0,08 <sup>d</sup>	73,48±0,65 <sup>a</sup>	383,34±3,80 <sup>a</sup>
<b>0,3-5p</b>	89,33±0,25 <sup>a</sup>	5,63±0,15 <sup>ab</sup>	2,09±0,01 <sup>bcd</sup>	18,18±0,07 <sup>c</sup>	74,80±0,60 <sup>b</sup>	384,44±3,84 <sup>a</sup>
<b>0,7-2p</b>	90,69±0,21 <sup>ab</sup>	5,52±0,08 <sup>ab</sup>	2,10±0,02 <sup>bcd</sup>	17,01±0,05 <sup>b</sup>	76,06±0,74 <sup>cd</sup>	384,93±3,24 <sup>a</sup>
<b>0,7-5p</b>	89,29±0,44 <sup>a</sup>	5,37±0,03 <sup>a</sup>	2,04±0,01 <sup>abcde</sup>	16,82±0,12 <sup>b</sup>	76,46±0,54 <sup>de</sup>	385,33±3,53 <sup>a</sup>
<b>1-2p</b>	90,99±0,34 <sup>ab</sup>	5,51±0,04 <sup>ab</sup>	2,12±0,03 <sup>cde</sup>	17,22±0,09 <sup>b</sup>	75,86±0,63 <sup>cd</sup>	385,02±3,68 <sup>a</sup>
<b>1-5p</b>	91,84±0,26 <sup>b</sup>	5,52±0,08 <sup>ab</sup>	1,99±0,03 <sup>abc</sup>	17,11±0,09 <sup>b</sup>	76,05±0,63 <sup>cd</sup>	384,52±3,59 <sup>a</sup>
<b>0,3-10s</b>	89,40±0,77 <sup>a</sup>	5,45±0,05 <sup>a</sup>	1,89±0,03 <sup>a</sup>	17,18±0,09 <sup>b</sup>	76,11±0,56 <sup>cd</sup>	384,51±3,34 <sup>a</sup>
<b>0,7-10s</b>	90,31±0,20 <sup>ab</sup>	5,31±0,09 <sup>a</sup>	1,93±0,02 <sup>ab</sup>	18,13±0,04 <sup>c</sup>	75,28±0,64 <sup>bc</sup>	385,19±3,37 <sup>a</sup>
<b>1-10s</b>	89,40±0,72 <sup>a</sup>	5,31±0,16 <sup>a</sup>	1,99±0,05 <sup>abcd</sup>	16,15±0,25 <sup>a</sup>	77,22±1,00 <sup>e</sup>	385,41±3,04 <sup>a</sup>

Nota: Los datos se presentan en porcentaje (g/ 100g) en peso seco excepto la humedad (porcentaje en peso fresco) y Energía (kcal/ 100 g peso seco)

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

<sup>b)</sup> Las codificaciones de los tratamientos se encuentran en la tabla asdfa de Materiales y Métodos.

En la humedad de las setas LE obtenidas a partir de paquetes tratados con PEMIC no se observaron diferencias significativas respecto al control. Los valores se movieron en un rango entre 89,29 y 91,84 g/100g en peso fresco, siendo valores habituales en la seta LE, (Cheung 2013).

Se han realizado estudios en los que la tecnología de PEMIC ha sido utilizada para deshidratación de alimentos con unos buenos resultados (Toepfl et al., 2006), sin embargo, al aplicarla en los paquetes, en lugar de en las setas cultivadas, no se observó una disminución de la humedad. Hay que mencionar que la seta LE necesita mucha humedad y que diariamente se regaban los paquetes, por lo que la humedad del sustrato y de los cuerpos fructíferos de las setas se repuso en el caso de que PEMIC pudieran haberlos deshidratado durante el proceso de fructificación.

En el contenido en cenizas, los valores fueron iguales estadísticamente respecto a los resultados aportados por las setas de los paquetes sin aplicar PEMIC, variando desde 5,31 hasta 5,99 g/100 gramos en 0,7kV/cm-10 segundos y 0,3 kV/cm-2 pulsos respectivamente.

Los tratamientos 1kV/cm -5pulsos y 0,3kV/cm-10s y 0,7kV/cm-10s, mostraron valores menores de contenido en grasas, (1,89 g/100g) y fueron diferentes estadísticamente respecto al no tratado por PEMIC, (2,17 g/100g), por lo que la electroporación producida en esos tratamientos por la tecnología PEMIC permeabilizó la célula donde se encuentran los lípidos, que definen las propiedades físicas de la membrana, fluidez y grosor, (Janmey y Kinnunen, 2006). Además, en la membrana plasmática, las cargas asociadas a sus partes hidrofílicas contribuyen a crear un gradiente eléctrico entre la cara externa y la interna, y por tanto a modular el potencial eléctrico. El estrés generado por los PEMIC desestabilizó ese gradiente eléctrico y provocó la rotura de la membrana, por lo que disminuyó el contenido en grasas de los tratamientos 1kV/cm- 5 pulsos, 0,3kV/cm-10 segundos y 0,7kV/cm 10 segundos.

El tratamiento 1kV/cm-10s fue el tratamiento con menor contenido en proteínas, 16,15 g/100g, y diferente estadísticamente al resto. Las proteínas son un componente importante de la membrana celular, por lo que se produjo algún daño al aplicar el tratamiento de PEMIC disminuyéndose el contenido de proteína.

Además, 0,7 kV/cm -10s y 0,3 kV/cm con 5 y 2 pulsos, este último presentando el mayor valor en proteínas, 19,07 g/100g, superaron a los datos obtenidos de los paquetes no tratados significativamente. Gracias a la aplicación de PEMIC, las proteínas modifican su estructura y actividad enzimática, aunque no se conoce con exactitud el mecanismo. (Tsong, 1990; Bendicho et al., 2003). Algunos posibles mecanismos que lo explican podrían ser la implicación de la polarización de la molécula proteica, o la atracción de estructuras polarizadas por fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas o enlaces covalentes formando agregados (Castro et al., 2001; Pérez et al., 2004). Flourey et al., (2006) explicó el efecto de los PEMIC sobre las proteínas de la leche como el resultado de una modificación de la carga aparente después de la exposición a PEMIC con la subsiguiente modificación de las interacciones iónicas de las proteínas.

Las setas LE de los paquetes sin tratar con PEMIC, con un contenido en carbohidratos de 75,48 g/100g, fueron diferentes estadísticamente a las setas tratadas con 0,7kV/cm-5 pulsos y 1kV/cm-10 segundos, con 76,46 y 77,22 g/100g respectivamente.

Todos los tratamientos tuvieron similares valores de energía sin mostrar diferencias estadísticamente significativas (384 kcal), por lo que los PEMIC no ejercieron ningún efecto en la energía de LE.

### 6.3 Fibra dietética

#### 6.3.1 Fibra Dietética Insoluble (FDI):

El menor valor observado de FDI, 43,69 g/100g, se obtuvo en 0,7 kV/cm-10s y no mostró diferencias significativas con los dos tratamientos con intensidad 0,3 kV/cm y el control, 45,60 g/100g.

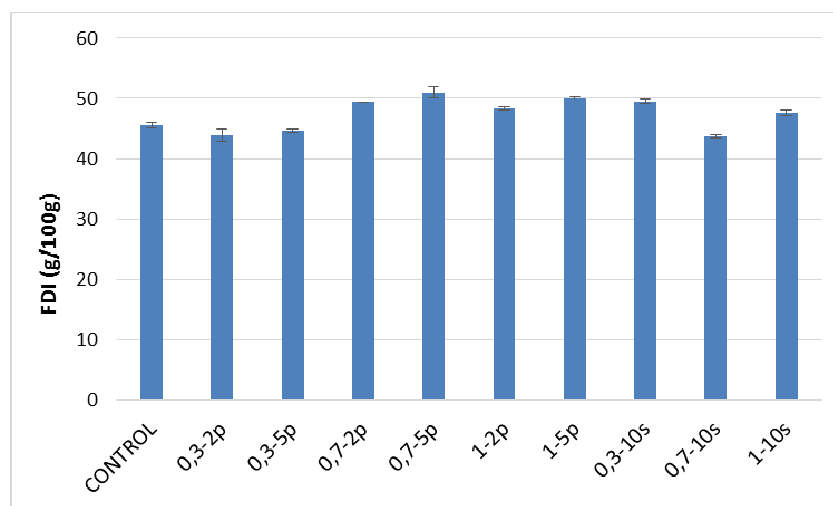


Figura 64. Contenido de Fibra Dietética Insoluble (FDI) (g/100g) de *Lentinula edodes* obtenidas en los paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

Se observó que a partir de la intensidad de 0,7 kV/cm se aumentaba el contenido de FDI cuando se les aplicaban 2 o 5 pulsos. Sin embargo, con 0,3kV/cm la membrana celular no sufrió ningún efecto independientemente del número de pulsos aplicados ya que la intensidad no fue lo suficientemente alta como para permeabilizar la membrana celular.

Lo mismo sucedió en 0,7 y 1kV/cm durante 10 segundos, los PEMIC no superaron el contenido de FDI del control, por lo que la electroporación generada por el tratamiento pudo provocar un estrés celular que impidió la biodisponibilidad del compuesto o incluso una permeabilización que mantuvo los poros abiertos por lo que las células sufrieron daños irreversibles.

Las Fibras Dietéticas contribuyen a dar rigidez a la pared celular haciéndola resistente a impactos y flexiones. Una de las características de la FDI es su grado de lignificación en los tejidos, que incluso permite mayor resistencia al ataque de los microorganismos. (Escudero y González, 2006). Este proceso natural es potenciado por el uso de PEMIC, produciéndose una lignificación al recibir el estrés en la célula, y aumentando la cantidad de FDI, tal y como sucedió en los tratamientos 0,7kV/cm, 1kV/cm y 0,3kV/cm- 10 segundos.

### 6.3.2 Fibra Dietética Soluble (FDS)

Todos los valores obtenidos de FDS, entre 3,28 g/100g, en 0,3 kV/cm-5pulsos, y 4,76 g/100g en 1kV/cm-10s, fueron menores y diferentes a las muestras sin tratar, 5,50 g/100g, por lo que la tecnología PEMIC contribuyó a la disminución del contenido de fibra soluble en *Lentinula edodes*. El único tratamiento que no se vio afectado por la electroporación fue 0,3kV/cm-2 pulsos, por lo que se concluyó que la FDS es mucho más sensible a los PEMIC que la FDI, debido a la permeabilización de la membrana celular, que afecta en primer lugar a los compuestos solubles, más susceptibles de deterioro frente al estrés generado por los PEMIC.

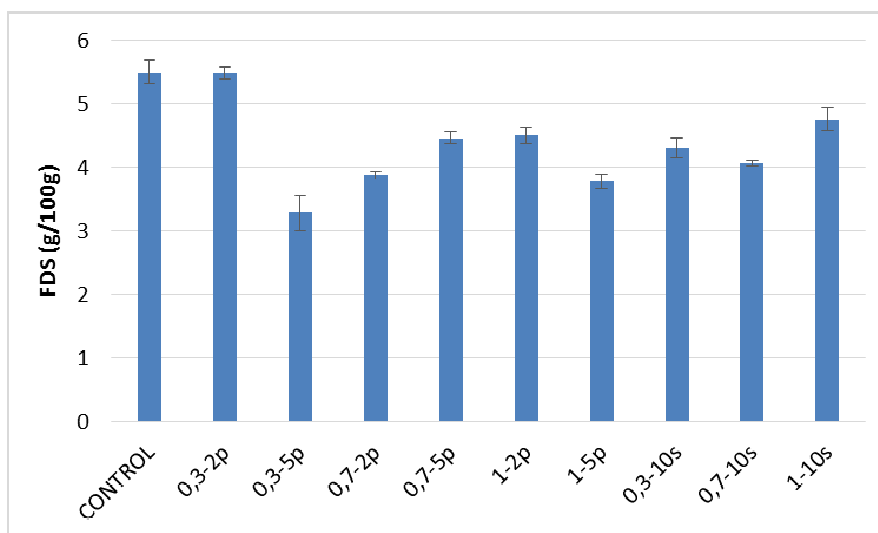


Figura 65. Contenido de Fibra Dietética Soluble (FDS) (g/100g) de *Lentinula edodes* obtenidas en los paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

La fibra forma parte de la pared celular y con el fenómeno de electroporación se aumentó su permeabilidad manteniendo la viabilidad de la célula de forma que se abrieron los poros de la membrana y se volvieron a cerrar una vez cesó el tratamiento. En general, aunque disminuyó la FDS al ser más sensible a la permeabilización, la FDI aumentó en varios de los tratamientos, por lo que PEMIC ayudó a que se incrementara el contenido en FDT en *Lentinula edodes*.

### 6.3.3 Fibra Dietética Total (FDT)

Los tratamientos aplicados de PEMIC de 0,7 kV/cm-5pulsos (55,45 g/100 g), 1 kV/cm-5 pulsos y 0,3 kV/cm-10 segundos mostraron los valores más altos, estadísticamente diferentes a los no tratados, por lo que el contenido en FDT aumentó con el uso de la tecnología PEMIC, figura 66.

El menor valor, 47,75 g/100g, encontrado en las setas pertenecientes al tratamiento 0,7kV/cm-10 segundos, no mostró diferencias significativas con los tratamientos de menor intensidad de campo, 0,3kV/cm, por lo que esta intensidad no fue suficiente para alterar las células, independientemente del número de pulsos

aplicados. Sin embargo, en el tratamiento de 0,7kV/cm durante 10 segundos se produjo un estrés lo suficientemente intenso como para deteriorar la membrana celular, tal y como se ha observado en la composición centesimal.

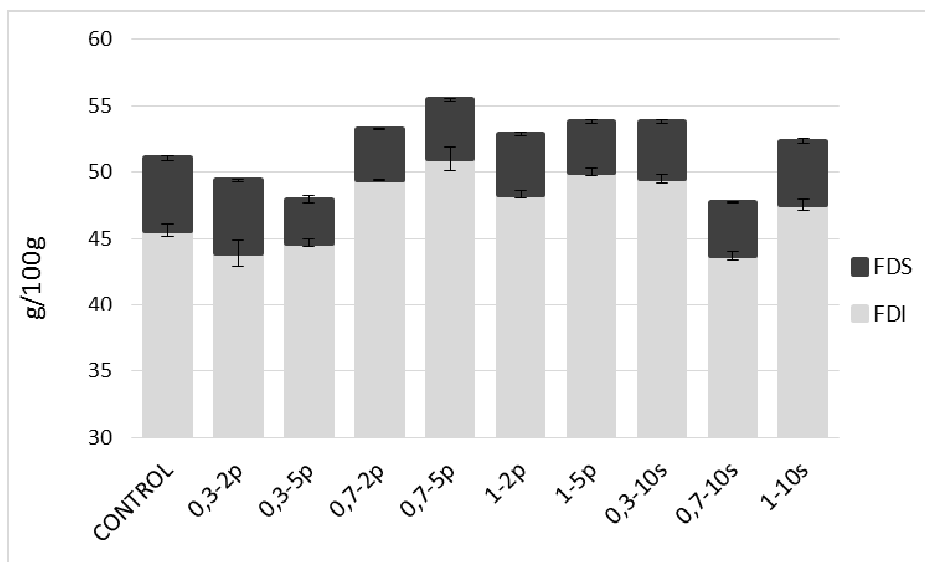


Figura 66. Contenido de Fibra Dietética Total (g/100g) de *Lentinula edodes* obtenidas en los paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

## 6.4 Glucanos

A continuación se muestran los resultados de glucanos obtenidos de las muestras de LE tratadas con PEMIC.

### 6.4.1 $\alpha$ -Glucanos

La aplicación de PEMIC favoreció el aumento de  $\alpha$ -glucanos respecto a la muestra sin tratar, (1,25 g/100g), 0,7 kV/cm (con 2 y 5 pulsos), en 0,3 kV/cm-10s, y 1 kV/cm -10s, el mayor con 2,15 g/100g. Sin embargo, tal como se ha visto anteriormente, los tratamientos en los que los PEMIC no afectaron a la célula fueron los de menor intensidad, 0,3 kV/cm, sin mostrar diferencias significativas en el número de pulsos aplicados, 2 y 5. De igual forma, en un estudio realizado en el vegetal *Chenopodium rubrum*, se observó un mayor impacto de la intensidad del campo eléctrico en la liberación del pigmento que en el número de pulsos dados a un determinado voltaje (Dörnenburg y Knorr, 1993).

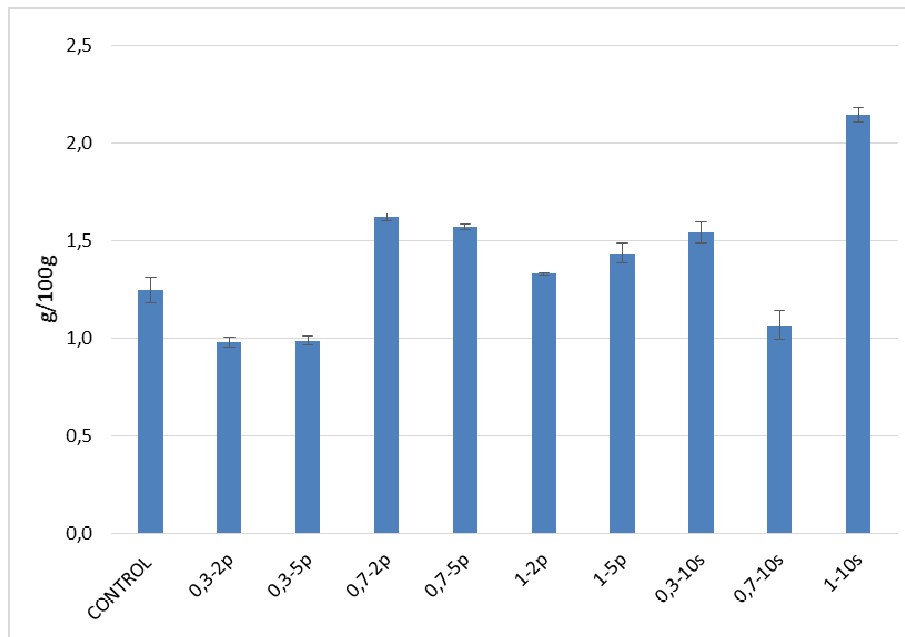


Figura 67. Contenido en  $\alpha$ -glucanos en las setas producidas a partir de paquetes de *Lentinula edodes* tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

#### 6.4.2 $\beta$ - Glucanos

El contenido en  $\beta$ -glucanos aumentó, desde 32,01g/100g en los paquetes de LE que no tuvieron aplicación de PEMIC, a 35,78 y 34,61 g/100g en los mayores valores obtenidos en los tratamientos de 0,3 kV/cm y 1kV/cm, ambos con 10 segundos de aplicación respectivamente. En estos tratamientos con PEMIC, la electroporación facilitó que la membrana celular formara unos poros y se volviera permeable, facilitando la disponibilidad de compuestos como los polisacáridos  $\beta$ -glucanos.

Estos resultados coinciden con los realizados en AB aplicando PEMIC (100–1000 V/cm) y comparándolos con otros métodos como la extracción con agua caliente y altas presiones. Se concluyó que los PEMIC aumentaron la extracción de compuestos valiosos desde el punto de vista nutricional debido principalmente a la permeabilización celular obteniendo extractos claros con alta estabilidad coloidal y facilitando así la separación. Además, la tecnología PEMIC permitió la producción de extractos de hongos con alto contenido de proteínas y polisacáridos. (Parniakov et al., 2014).

Los valores más bajos, (29,20 y 30,27g/100g), fueron los obtenidos en los tratamientos 0,3kV/cm con 2 y 5 pulsos respectivamente, por lo que la aplicación de PEMIC a los sacos no generó el suficiente estrés a la membrana celular como para observar un aumento en el contenido de  $\beta$ -glucanos.

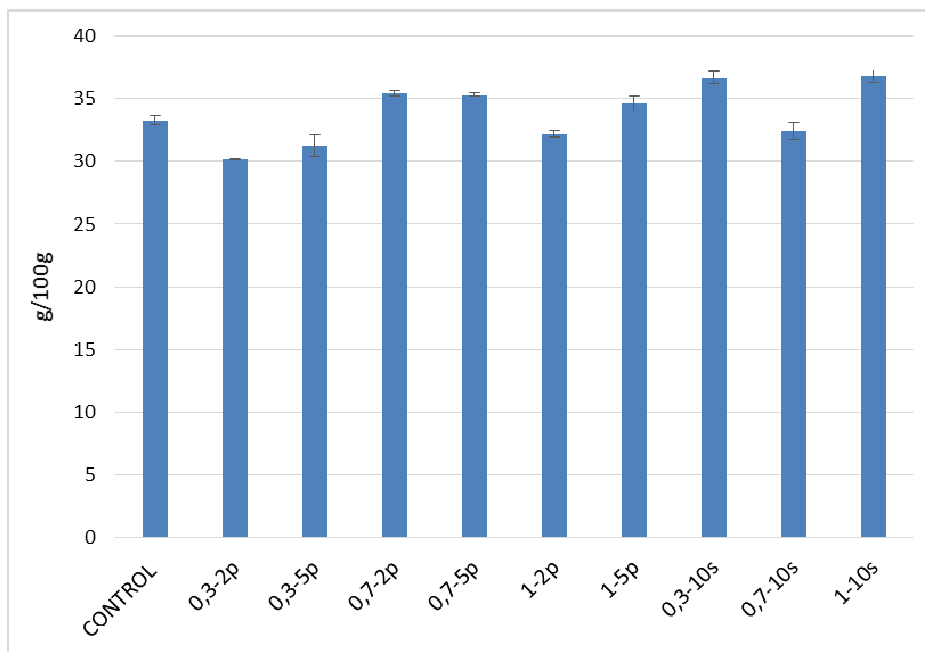


Figura 68. Contenido en  $\beta$ -glucanos en las setas producidas a partir de paquetes de *Lentinula edodes* tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

### 6.4.3 Glucanos totales

Los tratamientos en los que se encontraron valores de glucanos totales mayores que los de las setas LE no tratadas, (33,26g/100g), fueron 0,3kV/cm-10s y 1 kV/cm-10s, el mayor con 36,75g/100g. El tratamiento 0,7kV/cm y 10 segundos no mostró diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento sin PEMIC, por lo que no se produjo una correcta permeabilización. Además, y coincidiendo con los datos obtenidos de producción, composición centesimal y FDT, el tratamiento de 0,7kV/cm-10s obtuvo menores valores de Glucanos Totales respecto a los que se aplicaron PEMIC durante 10 segundos con intensidades de 0,3 y 1kV/cm, por lo que se dedujo que la aplicación fue excesiva y la permeabilización irreversible, provocando daños a la membrana celular.

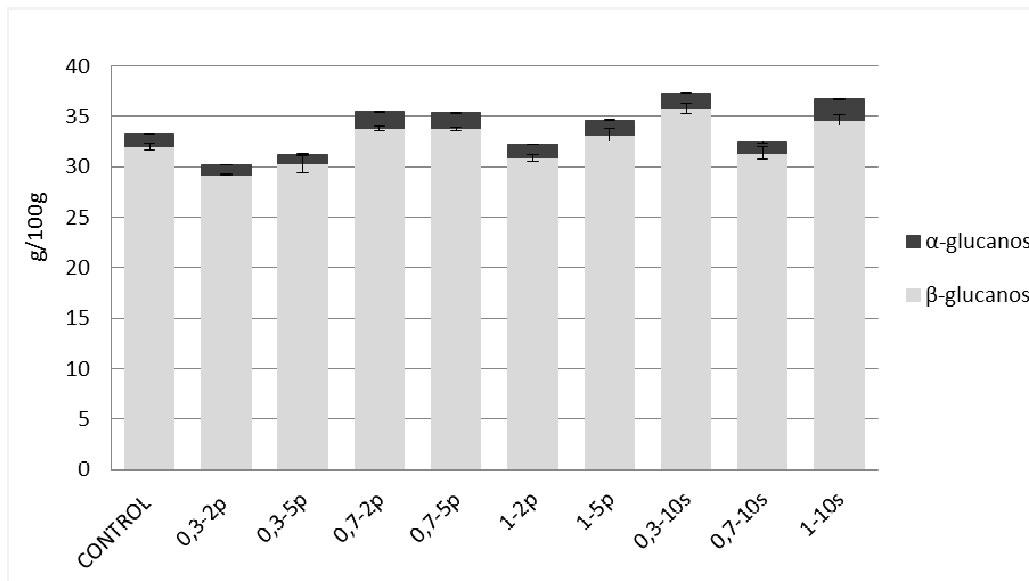


Figura 69. Contenido en Glucanos Totales en las setas producidas a partir de paquetes de *Lentinula edodes* tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

En general, se observó que no hay diferencias entre aplicar 2 o 5 pulsos, se comporta igual estadísticamente en las tres determinaciones (total,  $\alpha$  y  $\beta$ -glucanos) independientemente de la intensidad aplicada.

## 6.5 Actividad antioxidante

A continuación se muestran los resultados obtenidos mediante los cuatro métodos de análisis utilizados en la seta LE obtenida de los paquetes tratados con PEMIC: fenoles totales, ensayos basados en el secuestro de radicales DPPH y ABTS, y reducción de metales, Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP).

### 6.5.1 Fenoles totales

Los valores más altos obtenidos en la determinación de Fenoles Totales fueron en las setas obtenidas de los paquetes tratados con 1kV/cm, con 2 y 5 pulsos, y 0,7kV/cm-10 segundos, (351,79  $\mu$ g EQ gálico/100mg). El resto de tratamientos mantuvo unos valores iguales estadísticamente a los de los paquetes sin tratar. Con la intensidad de 1 kV/cm las células se permeabilizaron mejorando la captación de electrones, pero al aplicar el pulso durante 10 segundos se produjo un estrés tan fuerte en la célula que el daño resultó ser irreversible disminuyendo el contenido en Fenoles Totales.

Contrariamente a la intensidad 1kV/cm, la de 0,7kV/cm con 2 y 5 pulsos no afectó a la estructura de la membrana celular, sin embargo, al aplicarle un pulso de 10 segundos el contenido en Fenoles Totales aumentó significativamente. Las investigaciones sobre la permeabilización de la membrana de tejidos de diferentes



tejidos vegetales, realizadas por Angersbach et al., (1999), Chalermchat et al., (2010), Fincan et al., (2002) y Lebovka et al., (2011) demostraron que no sólo se ve afectada la membrana celular, sino también la membrana de la vacuola, donde se encuentran algunos compuestos bioactivos en mayores concentraciones como los polifenoles o algunos pigmentos con actividad antioxidante.

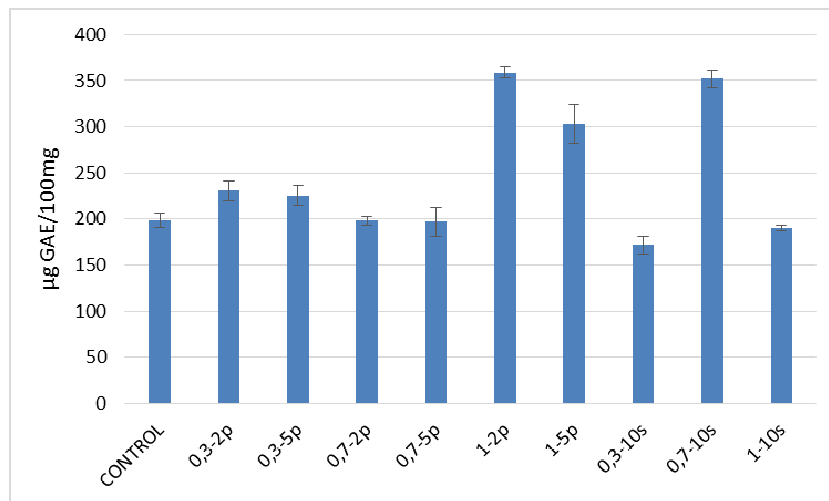


Figura 70. Fenoles Totales en las setas producidas a partir de paquetes de *Lentinula edodes* tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

El tratamiento con PEMIC también se aplicó para optimizar la extracción de polisacáridos de seda de maíz, una hierba medicinal rica en antioxidantes, polifenoles, vitaminas y minerales (Zhao et al., 2011). El rendimiento de polisacáridos en las condiciones óptimas de extracción de PEMIC (30 kV/cm con una duración del pulso de 6 µs) fue del 7%.

### 6.5.2 DPPH

Los resultados más altos aportados por la determinación de actividad antioxidante por DPPH fueron 1kV/cm-5pulsos, 0,7 y 0,3-10 segundos, siendo este último el mayor con (1,11 µmol trolox/100mg) y diferentes de los paquetes de LE sin tratar con PEMIC, (0,48 µmol trolox/100mg). Estas aplicaciones generaron un estrés en la célula que provocó su permeabilización de la membrana y favoreciendo la disponibilidad de los compuestos antioxidantes que reaccionan colorimétricamente con el radical DPPH, el cual cambia de amarillo a violeta. La mejora de la disponibilidad de compuestos bioactivos ha sido ampliamente estudiada ya que la permeabilización celular inducida por PEMIC ha demostrado ser un proceso muy eficiente para la liberación de pigmentos intracelulares con propiedades antioxidantes, por ejemplo antocianinas a partir de uvas para vinificación (Praporscic et al., 2007 y Puértolas et al., 2010).

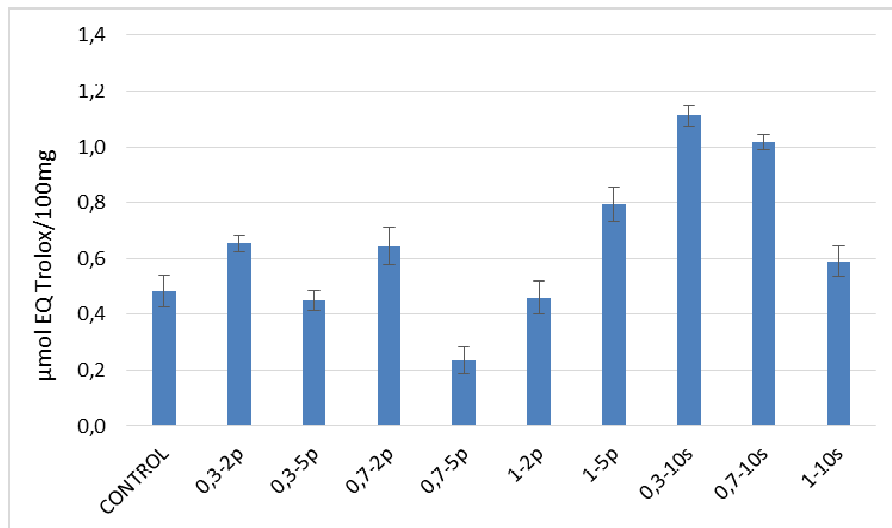


Figura 71. DPPH en las setas producidas a partir de paquetes de *Lentinula edodes* tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

En los resultados obtenidos de DPPH a partir de los paquetes con intensidades 0,3 y 0,7kV/cm, no se observaron diferencias entre aplicar 2 o 5 pulsos, sin embargo, al igual que en los Fenoles Totales, se apreció un aumento en el contenido de DPPH al aplicar un único pulso durante 10 segundos.

En el caso de la intensidad mayor, 1kV/cm, mostró efecto con 5 pulsos pero fue demasiado intensa cuando se aplicaron los PEMIC 10 segundos, ya que el estrés producido en la célula con un tiempo de tratamiento tan prolongado pudo abrir los poros durante la aplicación sin que se pudieran cerrar una vez finalizada, quedando la célula dañada.

### 6.5.3 ABTS

En la determinación de la actividad antioxidante mediante el reactivo ABTS, todos los tratamientos aplicados, excepto 0,3kV/cm-10 segundos, aumentaron significativamente el valor obtenido en el control (2,25 µmol EQ Trolox/100mg). Los paquetes tratados con PEMIC con 1kV/cm y 2 pulsos obtuvieron el mayor valor, (4,03µmol EQ Trolox/100mg), seguido de 0,7kV/cm-10 segundos y aumentando un 44% respecto al control.

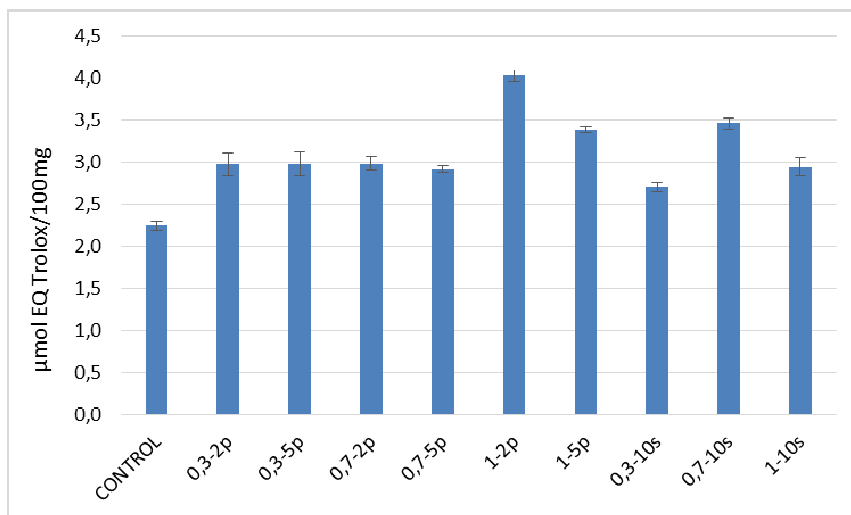


Figura 72. ABTS en las setas producidas a partir de paquetes de *Lentinula edodes* tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el tiempo de tratamiento y las intensidades 0,3 y 0,7kV/cm. Sin embargo, el valor más alto obtenido en la determinación de actividad antioxidante por ABTS, fue el tratamiento 1kV/cm-2pulsos, y mostró diferencias significativas con el resto de tratamientos.

#### 6.5.4 FRAP

En la determinación del Poder Reductor, los tratamientos que vieron aumentado su contenido respecto a las no tratadas con PEMIC fueron 1kV/cm, con 2 y 5 pulsos y 0,7 kV/cm -10segundos. Estas intensidades son menores a otras utilizadas en la evaluación de la tecnología de PEMIC en diferentes matrices. Zhang et al., (2015), estudiaron el efecto de los PEMIC, 5-35 kV/cm, en la vitamina C y observaron, en las determinaciones de los radicales DPPH y FRAP, que se aumentaban sus propiedades antioxidantes. En los valores obtenidos en la determinación del poder reductor, aumentaron su contenido respecto al control un 13,50%, 10,24%, 11,42% y 15,28% con las intensidades 5, 15, 25 y 35 kV/cm respectivamente.

En este estudio, el aumento de la capacidad de transferencia de electrones aumentó un 44%, exactamente la misma cantidad que en la determinación por ABTS con los mismos tratamientos, 1kV/cm-2 pulsos respecto a los no tratados por PEMIC.

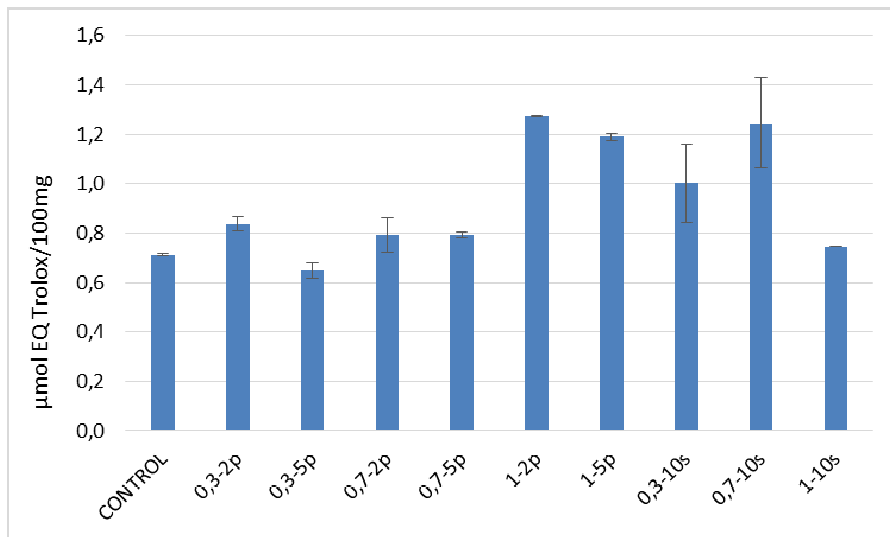


Figura 73. FRAP en las setas producidas a partir de paquetes de *Lentinula edodes* tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

En la actividad antioxidante se mostraron altas y positivas correlaciones indicando la relación entre las cuatro metodologías evaluadas con una significación de  $p < 0,01$ . El rango de la  $r$  de Pearson fue desde 0,71 a 0,83 en las correlaciones evaluadas a partir de los datos obtenidos al tratar paquetes de LE con PEMIC. Por tanto, se confirmó que la presencia de Fenoles Totales influye en la actividad antioxidante y además, la actividad antioxidantes fue demostró tanto en la captación de radicales libres como en la transferencia de electrones.



## 7 CAPÍTULO IV: EFECTO DE LA APLICACIÓN DE PULSOS ELÉCTRICOS DE MODERADA INTENSIDAD DE CAMPO EN PAQUETES DE *PLEUROTUS ERYNGII* Y CARACTERIZACIÓN DE SUS COMPUESTOS BIOACTIVOS

El estudio se realizó en las instalaciones del CTICH, donde se cultivaron, trataron con PEMIC, recolectaron y caracterizaron los diez tratamientos de la seta *Pleurotus eryngii*. Se han estudiado la producción, composición centesimal, cantidad de fibra dietética y  $\beta$ -glucanos, y actividad antioxidante.

### 7.1 Producción

Los tratamientos que mostraron mayores producciones que el control, con diferencias significativas, fueron 0,7kV/cm-10s, 0,3 kV/cm-10s y 0,7 kV/cm-5p, el mayor con 468,75 gramos por paquete. Estos aumentos fueron favorecidos por la aplicación de la tecnología PEMIC, que, mediante una electroporación, produjo unos poros en las membranas celulares, cerrándose al finalizar el tratamiento, que permitieron el paso de los metabolitos y aceleraron los procesos de transferencia de masa. De la misma forma, Tsukamoto et al., (2005), obtuvieron un aumento del 15% en la producción de *Pleurotus eryngii*, *Lentinula edodes* y *Hypsizyguus tessulatus* aplicando 140 kV en botellas con sustrato. En la Tabla 25 se presenta la producción en gramos por saco y el porcentaje del peso obtenido respecto al control. Los tres mejores tratamientos, 0,7kV/cm-10s, 0,3 kV/cm-10s y 0,7 kV/cm-5p, aumentaron la producción un 21, 28 y 30% respectivamente, por lo que el uso de PEMIC resultó ser muy positivo para mejorar el rendimiento de los cultivos de PE.

Tabla 25. Producción de *Pleurotus eryngii* en paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. <sup>a) b)</sup>

PE	g/saco	% respecto al control
CONTROL	360,30±16,37 <sup>ab</sup>	100
<b>0,3-2p</b>	410,70±14,65 <sup>bcd</sup>	113,99
<b>0,3-5p</b>	326,44±18,09 <sup>a</sup>	90,60
<b>0,7-2p</b>	392,00±14,21 <sup>abcd</sup>	108,80
<b>0,7-5p</b>	468,75±13,87 <sup>e</sup>	130,10
<b>1-2p</b>	377,60±12,20 <sup>abc</sup>	104,80
<b>1-5p</b>	387,67±11,15 <sup>abc</sup>	107,60
<b>0,3-10s</b>	464,38±11,40 <sup>de</sup>	128,89
<b>0,7-10s</b>	438,10±16,32 <sup>cde</sup>	121,59
<b>1-10s</b>	320,13±25,90 <sup>a</sup>	88,85

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

b) Las codificaciones de los tratamientos se encuentran en la tabla 15 de Materiales y Métodos.

El menor valor correspondió al tratamiento 1kV/cm-10s, sin diferenciarse estadísticamente del control, posiblemente debido al estrés provocado en la célula por la aplicación de PEMIC con la mayor intensidad durante un largo periodo de tiempo.

## 7.2 Composición centesimal

A continuación se presentan los resultados obtenidos de cada uno de los compuestos de la composición centesimal en las setas producidas de paquetes de sustrato a los que se aplicó la tecnología de PEMIC.

### 7.2.1 Humedad

Los resultados obtenidos en la determinación de humedad fueron muy similares en todos los tratamientos de PEMIC y mostraron valores habituales en PE. (Synytsya et al., 2009). El tratamiento sin aplicación de PEMIC y el 0,7 kV/cm-2p fueron los tratamientos con menor humedad, 88,06 y 87,88 g/100 g respectivamente, siendo diferentes estadísticamente de 1 kV/cm-5p y 0,7 kV/cm-10s, el mayor valor, 89,27 g/100g, en peso fresco, figura 74.

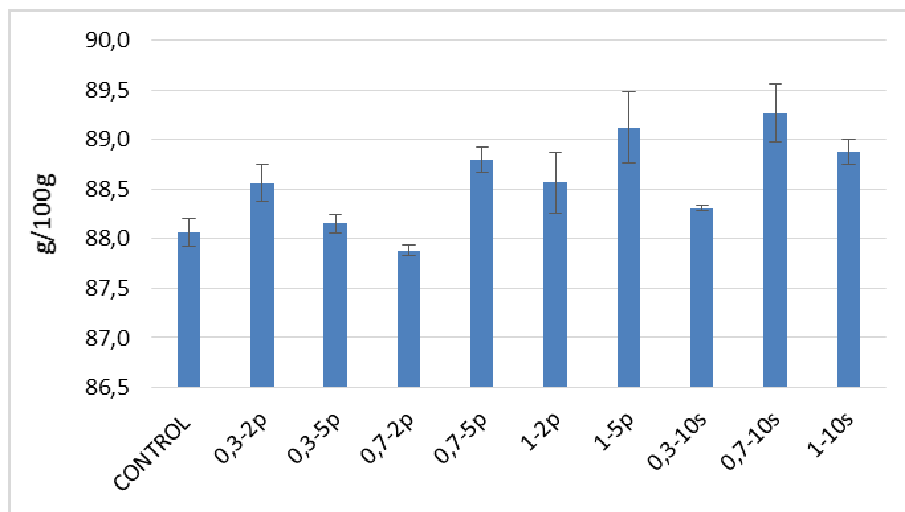


Figura 74. Contenido en humedad de *Pleurotus eryngii* producida en sacos tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad.

Aunque se observaron diferencias significativas, el rango fue muy pequeño y las variaciones no se debieron a los PEMIC, sino a la variabilidad de las muestras por las condiciones en la sala de cultivo.

### 7.2.2 Cenizas

Las muestras no tratadas con PEMIC mostraron un contenido de cenizas de 5,55g/100g, siendo diferentes estadísticamente del tratamiento 0,7kV/cm-10s, el cual presentó el mayor valor con 6,18 g/100g, viéndose aumentado su contenido en minerales gracias al efecto de los PEMIC, figura 75.

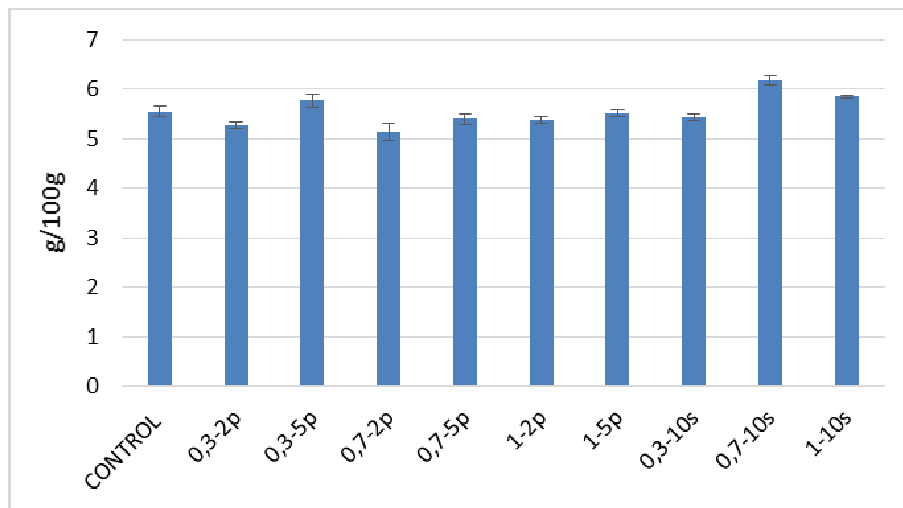


Figura 75. Contenido en cenizas de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

### 7.2.3 Grasas

En relación al contenido en grasas de las muestras tratadas con PEMIC, dos tratamientos disminuyeron significativamente respecto al control, 0,3 kV/cm-2p y 0,7kV/cm-5p. El resto de tratamientos fueron iguales estadísticamente al tratamiento sin PEMIC o incluso mayores, como es el caso de 1 kV/cm-5p y 0,7 kV/cm-10s, con 1,71 y 1,80 g/100g de respectivamente, figura 76.

Los PEMIC provocan la carga de la membrana lipídica, que reordena rápidamente su estructura como respuesta al campo eléctrico. Con esta tecnología, tiene lugar un gran aumento en el transporte iónico y molecular causando la transición de una estructura acuosa mediante poros (Weaver, 2000). El plasma de las membranas celulares y de la capa lipídica se hace permeable a pequeñas moléculas después de haber sido expuesto a un campo eléctrico, y dicha permeabilidad causa hinchazón y una eventual ruptura de la membrana celular (Vega-Mercado et al., 1996).

Las cantidades de grasas obtenidas en las setas PE fueron relativamente bajas si se comparan con otras setas, como HE o AB que, en el capítulo I, mostraron aproximadamente el doble de contenido en grasas (3,56 y 3,82g/100g respectivamente). Además la misma especie, PE, mostró un valor de 1,86g/100g al caracterizarla en el capítulo citado anteriormente, por lo que el valor obtenido



después de la aplicación de PEMIC es aceptable, y PE sigue considerándose un alimento bajo en grasa.

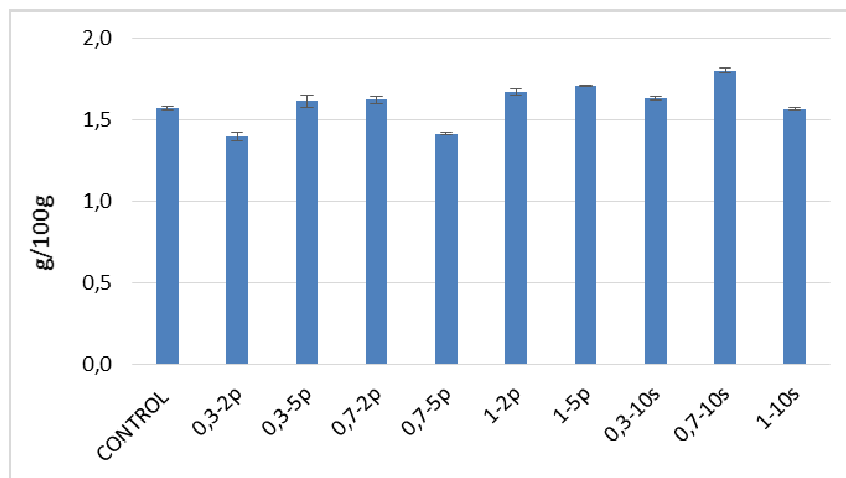


Figura 76. Contenido en grasas de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

#### 7.2.4 Proteínas

El rango obtenido en el contenido en proteínas varió desde 10,21 g/100g, en 0,7kV/cm-2p, hasta 12,35 g/100g, en 0,7 kV/cm -10s. (Figura 77)

Los tratamientos con valores estadísticamente mayores que los de las setas a las que no se aplicaron PEMIC fueron 1 kV/cm-5p, 0,3kV/cm-5p, 0,7 kV/cm-5p y 0,7 kV/cm -10s. Este aumento fue debido a la atracción de estructuras polarizadas por las fuerzas electrostáticas producidas por los PEMIC, ya que la electroporación desestabiliza temporalmente las proteínas de la membrana celular (Castro et al., 1993).

Además se observó que no hubo ningún efecto de los PEMIC en el contenido de proteínas aplicando 2 pulsos, por lo que el tiempo de tratamiento no fue suficiente para permeabilizar de la membrana. Sin embargo, al aumentar la aplicación a 5 pulsos se apreció un incremento en las tres intensidades utilizadas de PEMIC.

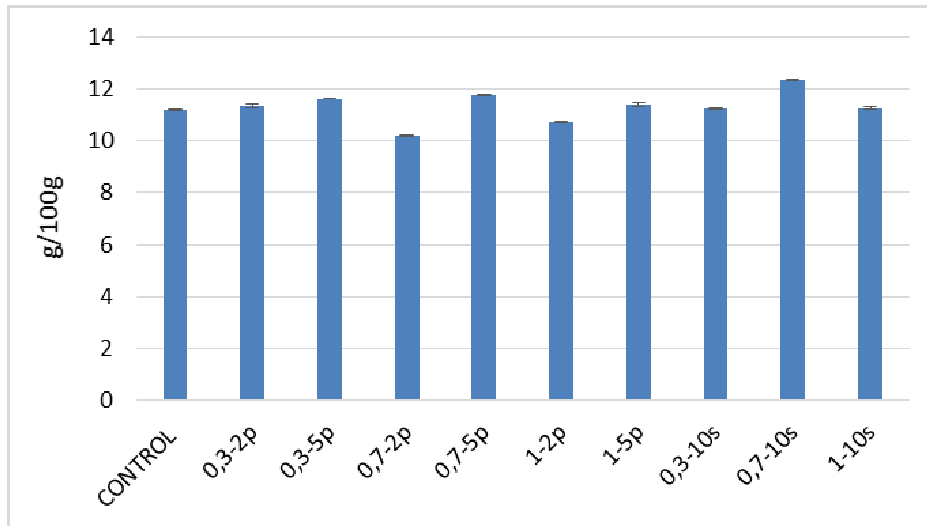


Figura 77. Contenido en proteínas de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

### 7.2.5 Carbohidratos

Los valores de carbohidratos de las setas tratadas con PEMIC, figura 78, representan unos valores relativamente bajos, en PE se encontró un rango que fue desde 79,67 a 83,03g/100g en 0,7 kV/cm-10s y 0,7 kV/cm-2p respectivamente.

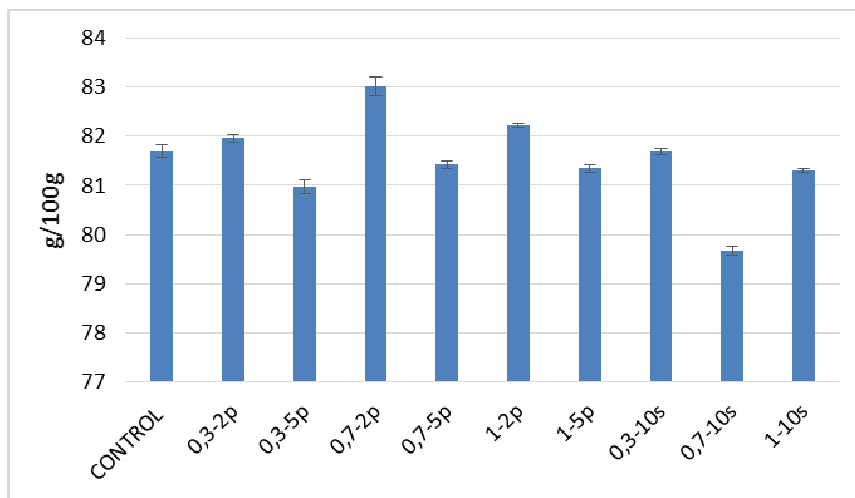


Figura 78. Contenido en carbohidratos de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

### 7.2.6 Energía

Los resultados de energía en PE reflejaron que todos los tratamientos fueron estadísticamente iguales a las setas obtenidas de los paquetes no tratados con PEMIC. Figura 79.

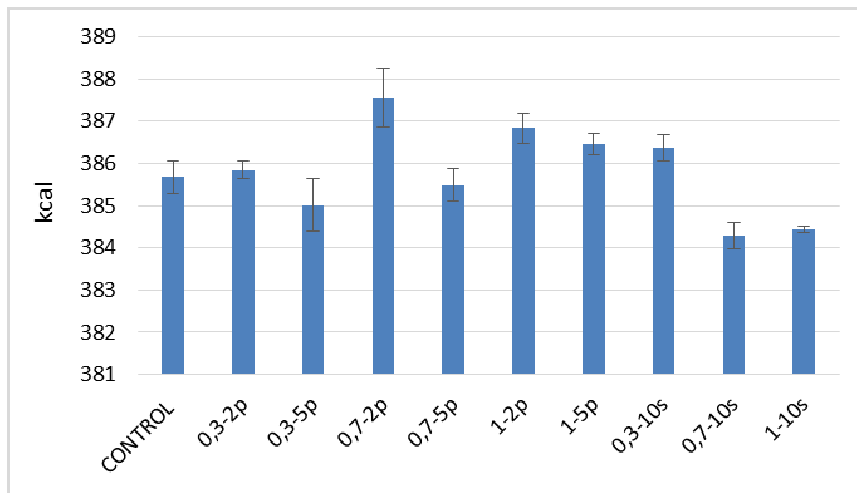


Figura 79. Contenido en energía de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

### 7.3 Fibra dietética

#### 7.3.1 Fibra dietética insoluble

El contenido de FDI aumentó respecto a las muestras no tratadas (31,30g/100g) en los tratamientos 0,7 kV/cm-2p y 0,3 kV/cm-2p, el mayor valor (33,25g/100g), por lo que la permeabilización producida por los PEMIC favoreció la lignificación de la célula que aumentó el contenido de FDI.

Sin embargo, los tratamientos 1 kV/cm-5p, 1 kV/cm-10s, 0,7 kV/cm-10s y 0,3 kV/cm-5p, el tratamiento con el menor valor, 28,47 g/100g, disminuyeron respecto a los no tratados con PEMIC, por lo que el estrés provocado dañó las células.

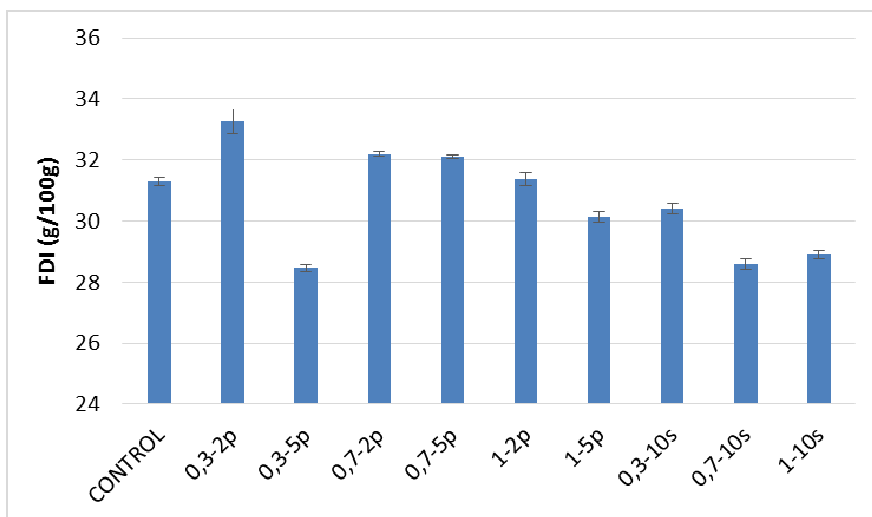


Figura 80. Contenido en Fibra Dietética Insoluble (FDI) de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

Si se compara el número de pulsos, en las tres intensidades la aplicación de 2 pulsos aportó un mayor contenido en FDI que aplicando 5 pulsos, siendo estadísticamente diferentes las intensidades 0,3 kV/cm y 1 kV/cm.

### 7.3.2 Fibra dietética soluble

Los tratamientos que consiguieron aumentar la cantidad de FDS gracias a los PEMIC fueron 1 y 0,7kV/cm durante 10 segundos de aplicación, este último con 5,00 g/100g frente a los 3,89 g/100g que presentó del control.

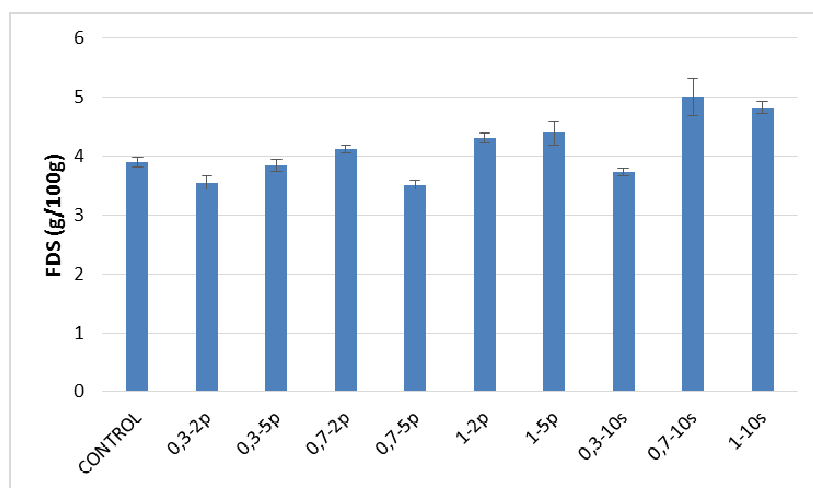


Figura 81. Contenido en Fibra Dietética Soluble (FDS) de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

Algunos investigadores han argumentado que la calidad de la FDT viene dada por su proporción de FDS, que aporta una mejor retención y capacidad fermentable (Xie and Li 2006). Por tanto, en los tratamientos 1 y 0,7kV/cm durante 10 segundos de aplicación, al aumentarse la cantidad de FDS se podría asegurar que la calidad conseguida de FDT con la aplicación de PEMIC fue mayor que en PE sin recibir ningún tratamiento.

### 7.3.3 Fibra dietética total

Las variaciones de FDI y FDS no fueron decisivas en la FDT, en la que todos los tratamientos fueron menores o iguales al control, figura 82, excepto 0,3 kV/cm-2p, el cual mostró valores superiores (36,80g/100g), por lo que los PEMIC tuvieron poca influencia como para modificar el valor global de FDT.

En la siguiente figura se observa la cantidad de FDT como sumatorio de FDI y FDS. (Figura 82).

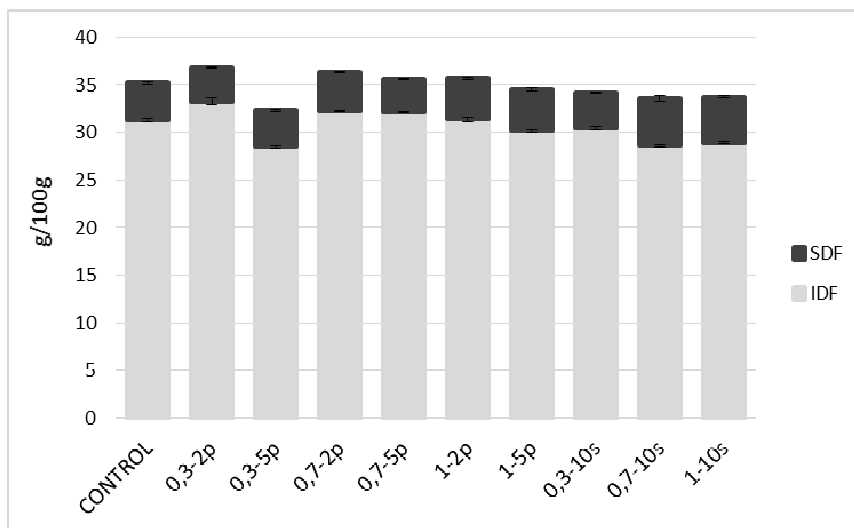


Figura 82. Contenido en Fibra Dietética Total (FDT) de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

## 7.4 Glucanos

### 7.4.1 $\alpha$ -glucanos

El rango de valores de  $\alpha$ -glucanos en PE tratada con PEMIC fue desde 6,18g/100g en 0,3kV/cm-10s hasta 15,30g/100g en el control, siendo el mayor valor significativamente diferentes a todos los tratados con PEMIC.

Los valores de las setas en los  $\alpha$ -glucanos fueron altos comparados con los datos revisados en bibliografía, que suelen estar por debajo de 10g/100g. (Sari et al., 2016, Synytsya et al 2008). Estas diferencias pudieron deberse a la diferencia de semilla o sustrato utilizado (Sharma et al., 2016)

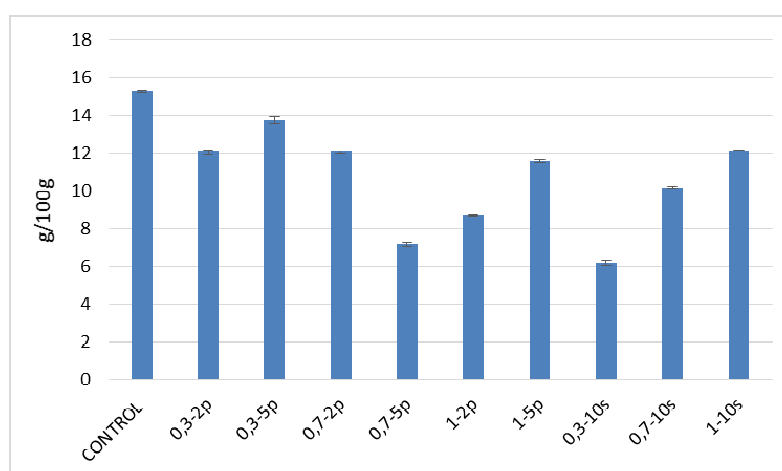


Figura 83. Contenido en  $\alpha$ -glucanos de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

### 7.4.2 $\beta$ -glucanos

Los tratamientos que mostraron los valores más altos y que aumentaron el contenido en  $\beta$ -glucanos respecto a las muestras sin tratar fueron 0,7kV/cm-5p, 1 kV/cm-2p y 0,3kV/cm-10s, el mayor valor obtenido (48,03g/100g). El resto de tratamientos se mantuvieron igual estadísticamente al control.

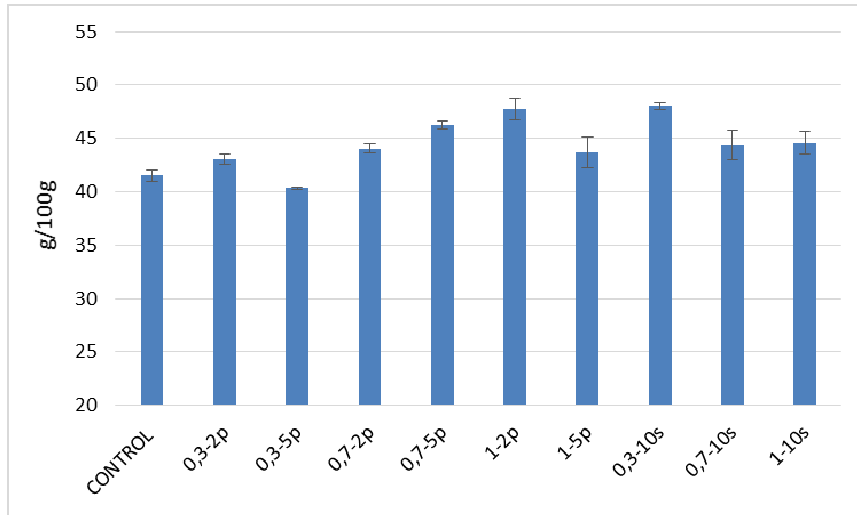


Figura 84. Contenido en  $\beta$ -glucanos de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

### 7.4.3 Glucanos totales

En los Glucanos Totales no se encontraron diferencias estadísticas significativas en ninguno de los tratamientos estudiados.

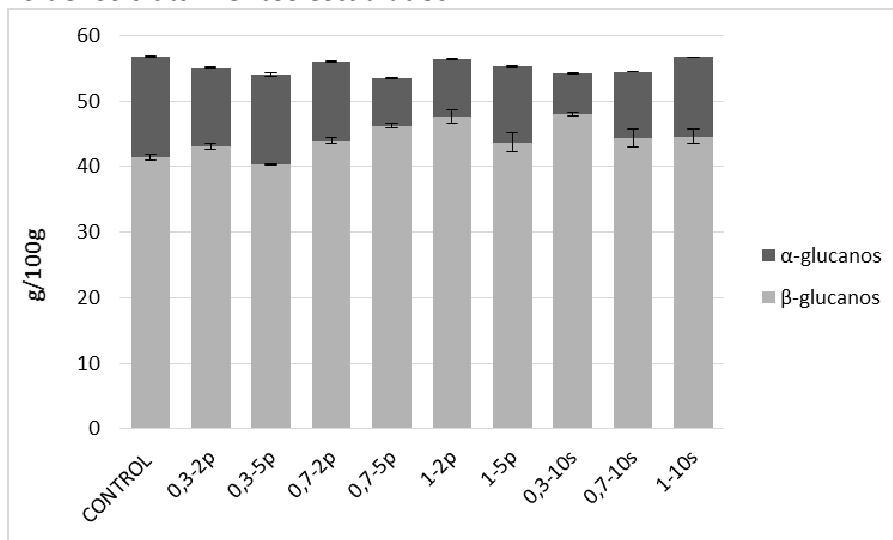


Figura 85. Contenido en Glucanos Totales, como la suma de  $\alpha$ -glucanos y  $\beta$ -glucanos de PE producida a partir de sacos tratados con Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo.

## 7.5 Actividad antioxidante

A continuación se muestran los resultados obtenidos mediante los cuatro métodos de análisis utilizados en la seta PE obtenida de los paquetes tratados con PEMIC: fenoles totales, ensayos basados en el secuestro de radicales DPPH y ABTS, y reducción de metales, Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP).

Tabla 26. Fenoles Totales y actividad antioxidante determinada por los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP de *Pleurotus eryngii* producida a partir de paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. <sup>a)</sup>

PE	Fenoles Totales	DPPH±	ABTS	FRAP
CONTROL	92,05±7,11 <sup>ab</sup>	0,51±0,02 <sup>a</sup>	2,61±0,00 <sup>a</sup>	0,68±0,01 <sup>bc</sup>
0,3-2p	83,11±2,89 <sup>ab</sup>	0,55±0,00 <sup>a</sup>	2,84±0,01 <sup>ab</sup>	0,50±0,08 <sup>a</sup>
0,3-5p	137,58±9,24 <sup>b</sup>	0,64±0,01 <sup>a</sup>	3,22±0,24 <sup>abcd</sup>	0,67±0,00 <sup>bc</sup>
0,7-2p	82,05±0,79 <sup>a</sup>	0,58±0,12 <sup>a</sup>	2,99±0,16 <sup>abc</sup>	0,66±0,00 <sup>abc</sup>
0,7-5p	124,95±21,05 <sup>ab</sup>	0,56±0,00 <sup>a</sup>	3,36±0,22 <sup>abcd</sup>	0,77±0,00 <sup>c</sup>
1-2p	97,05±11,05 <sup>ab</sup>	0,65±0,02 <sup>a</sup>	3,60±0,12 <sup>abcd</sup>	0,55±0,04 <sup>ab</sup>
1-5p	164,95±8,95 <sup>ab</sup>	0,53±0,11 <sup>a</sup>	3,86±0,06 <sup>cd</sup>	0,76±0,00 <sup>c</sup>
0,3-10s	104,16±16,05 <sup>ab</sup>	0,57±0,03 <sup>a</sup>	3,39±0,37 <sup>abcd</sup>	0,72±0,03 <sup>c</sup>
0,7-10s	119,16±13,68 <sup>ab</sup>	0,64±0,01 <sup>a</sup>	4,16±0,07 <sup>d</sup>	0,80±0,01 <sup>c</sup>
1-10s	88,89±1,84 <sup>ab</sup>	0,46±0,03 <sup>a</sup>	3,68±0,21 <sup>bcd</sup>	0,69±0,01 <sup>bc</sup>

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas ( $P < 0.05$ ).

<sup>b)</sup> Las codificaciones de los tratamientos se encuentran en la tabla asdfa de Materiales y Métodos.

Contenido de Fenoles Totales: Ensayo de Folin-Ciocalteu ( $\mu\text{g}$  equivalente ácido gálico GAE/100mg); ensayo DPPH: scavenging activity, ABTS: radical scavenging activity and FRAP: Ferric reducing antioxidant power. ( $\mu\text{mol}$  equivalente Trolox TE/100mg).

En los contenidos de Fenoles Totales de PE obtenidas de paquetes tratados con PEMIC, todos los tratamientos fueron iguales al control, obteniéndose en 1 kV/cm-5p el mayor valor, con 164,95 $\mu\text{g}$  EQ gálico/100mg. Por tanto, la aplicación de PEMIC no afectó a la cantidad de fenoles Totales, tal y como sucedió en LE en el capítulo anterior.

No se encontraron diferencias significativas en los valores obtenidos de la determinación por DPPH por lo que la tecnología de PEMIC no influyó en la mejora del secuestro de radicales libres. De igual forma, Elez-Martínez y Martín-Belloso, (2007), estudiaron la influencia de la tecnología en la actividad antioxidante y el contenido en vitamina C de zumo de naranja y gazpacho, concluyendo que se retuvieron un 87,5-

98,2% y 84,3-97,1% de vitamina C, respectivamente, después de tratamientos con PEMIC. Sin embargo, no encontraron diferencias significativas en la determinación de la actividad antioxidante por DPPH respecto al control, al igual que en las setas PE producidas a partir de paquetes de sustrato tratados con PEMIC.

En la determinación realizada con el radical ABTS, los valores superiores estadísticamente al control (2,61  $\mu\text{mol EQ trolox}/100\text{mg}$ ) fueron los tratamientos 1kV/cm-10s, 1kV/cm-5p y 0,7kV/cm-10 segundos, con 4,16  $\mu\text{mol EQ trolox}/100\text{mg}$ . Por lo que los PEMIC, debido a la permeabilización de la membrana celular, favorecieron el secuestro de radicales libres en los tratamientos más intensos aplicados a los paquetes de PE.

En la actividad antioxidante determinada por el método FRAP, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, excepto en 0,3kV/cm-2p que fue incluso más bajo que las muestras no tratadas con PEMIC.





## 8 CONCLUSIONES

---

Una vez analizados los resultados de la presente tesis doctoral, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- Se ha demostrado la calidad nutricional de las setas, con altos valores de cenizas y proteínas y bajos en grasas, y se ha comprobado la potencialidad de los PEMIC para aumentar la concentración de nutrientes, fibra dietética, y  $\beta$ -glucanos, así como su actividad antioxidante.
- Los resultados obtenidos cuando se aplicaron los PEMIC sobre los cuerpos fructíferos de *Agaricus bisporus*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii* y *Pleurotus ostreatus* son muy prometedores ya que se consiguió un aumento de compuestos bioactivos, especialmente fibra dietética y actividad antioxidante. Además, se observó que la intensidad del campo eléctrico influyó en las propiedades antioxidantes de las setas más que el número de pulsos aplicados al no encontrarse diferencias entre 5, 18 y 30 pulsos.
- Al aplicar los PEMIC sobre el sustrato de *Pleurotus eryngii* se obtuvo un mayor rendimiento del cultivo (30%) pero no se apreciaron mejoras en la composición centesimal ni en los compuestos bioactivos.
- Sin embargo, en los paquetes de *Lentinula edodes*, aunque los PEMIC no produjeron un aumento en la producción, aportaron a las setas una mayor cantidad de proteínas, fibra y  $\beta$ -glucanos (15,7%), disminuyéndose el contenido en grasas (de 2,17 g/100g en las setas sin tratar a 1,89 g/100g en el tratamiento 0,3kV/cm durante 10 segundos). Además la actividad antioxidante se vio favorecida mostrando una positiva y alta correlación afirmando que la presencia de Fenoles Totales influye en la actividad antioxidante demostrada tanto en la captación de radicales libres como en la transferencia de electrones.
- El tratamiento 2kV/cm y 30 pulsos resultó ser excesivo en todos los parámetros estudiados al producirse un estrés en la célula dañándola debido a una permeabilización irreversible por los PEMIC.
- La obtención de setas cultivadas con la utilización de PEMIC es posible teniendo en cuenta que la elección del tratamiento óptimo debe elegirse considerando los objetivos a buscar, incremento de la producción o del contenido en compuestos bioactivos.
- Estos primeros estudios deben ser ampliados y los mecanismos implicados estudiados en profundidad de cara a poder implementar industrialmente esta

tecnología en las setas de forma que pueda aumentarse tanto su potencial saludable como los rendimientos de su cultivo.

- En definitiva, las conclusiones de esta investigación contribuyen a un mejor conocimiento de las setas producidas en La Rioja y su posible incremento de la productividad y calidad en compuestos bioactivos por los PEMIC, que debería repercutir positivamente en su valorización en el mercado en fresco como en la producción de nutraceuticos de gran interés para las industrias alimentaria y farmacéutica.

## 9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Abdul-Hamid, A., Luan, Y.S. (2000). Functional properties of dietary fiber prepared from defatted rice bran. *Food Chemistry*, 68, 15–19.
- Adewusi S.R.A., Alofe F.V., Odeyemi O., Afolabi O.A., Oke O.L. (1993) Studies on some edible wild mushrooms from Nigeria: 1. Nutritional, teratogenic and toxic considerations. *Plant Foods for Human Nutrition*, 43: 115–121.
- Ade-Omowaye, B. I. O., Taiwo, K. A., Eshtiaghi, N. M., Angersbach, A., & Knorr, D. (2003). Comparative evaluation of the effects of pulsed electric field and freezing on cell membrane permeabilisation and mass transfer during dehydration of red bell peppers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, 177-188.
- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 837–842.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. & Blackwell, M. (1996). *Introductory mycology*. 4<sup>a</sup> ed. John Wiley & sons. Inc.USA. 869p.
- Álvarez I., 2003. Inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, España.
- Alquini, G., Carbonero, E.R., Rosado, F.R., Cosentino, C. & Lacomini, M. (2004). Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. *FEMS Microbiol. Lett.* 230, 47–52.
- Anastasi A, Prigione V, Varese GC. (2010). Industrial dye degradation and detoxification by basidiomycetes belonging to different eco-physiological groups. *J Hazard Mater.*;177:260–7.
- Angersbach, A., Heinz, V., Knorr, D. (1999) Electrophysiological model of intact and processed plant tissues: cell disintegration criteria. *Biotechnol.Prog.* 15, 753-762.
- Angersbach, A., Heinz, V., Knorr, D. (2000) Effects of pulsed electric fields on cell membranes in real food systems. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1, 135-149.
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., et al., (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, 3,203–230.
- Arango, C.S. (2010). Obtención in vitro de micelio de hongos comestibles, shiitake (*Lentinula edodes*) y orellanas (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*) a partir de aislamientos de cuerpos fructíferos para la producción de semilla. Tesis doctoral.

- Arango, C. S., y Nieto, I. J. (2013). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 1-8.
- Asatiani, M.D., Kachlishvili, E.T., Khardziani, T.S., Metreveli, E.M., Mikiashvili, N.A., Songulashvili, G.G., Tsiklauri, N.D., Wasser, S.P. and Elisashvili, V.I., (2008). Basidiomycetes as a source of antioxidants, lectins, polysaccharides, and enzymes. *Journal of Biotechnology*, 136, p.5717.
- Askin R, Sasaki M, Goto M (2010) Recovery of water-soluble compounds from *Ganoderma lucidum* by hydrothermal treatment. *Food Bioprod Process* 88:291–297.
- Balasa, A., Toepfl, S., & Knorr, D. (2006). Pulsed electric field treatment of grapes. *Food Factory of the Future 3*, Gothenburg, Sweden.
- Barba, F. J., Parniakov, O., Pereira, S. A., Wiktor, A., Grimi, N., Boussetta, N., Saraiva, J. A., Raso, J., Martin-Belloso, O., Witrowa-Rajchert, D., Lebovka, N., and Vorobiev, E. (2015). Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. *Food Research International*, 77:773–798.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Góngora-Nieto, M. M., Pothakamury, U. R., and Swanson, B. G. (1999). *Preservation of Foods with Pulsed Electric Fields*. Academic Press Ltd, London).
- Barros L, Falcão S, Baptista P, Freire C, Vilas-Boas M, Ferreira ICFR (2008) Antioxidant activity of *agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry*, 111, 61–66.
- Barros J., Serk H., Granlund I. and Pesquet E. (2015). The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of Botany* 115: 1053–1074.
- Bautista-Banos, S., Hernandez-Lauzardo, A. N., Velazquez-del Valle, M. G., Hernandez-Lopez, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E., et al., (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25, 108–118.
- Bazhal, I.G.; Guly, I.S (1983). Effect of electric field voltage on the diffusion process. *Pishchevaya Promyshlennost* 1983, 1, 29– 30.
- Behall K.M., Scholfield D.J., Hallfrisch J. (1997) Effect of beta-glucan level in oat fiber extracts on blood lipids in men and women. *The Journal of American College of Nutrition*, 16: 46–51.
- Bendicho, S., Barbosa-Cánovas, G.V., Martín, O. (2003) Reduction of Protease Activity in Simulated Milk Ultrafiltrate by Continuous Flow High Intensity Pulsed Electric Field Treatments. *Journal of Food Science* 68, 952-957.
- Beulah GH, Margret AA, Nelson J (2013) Marvelous medicinal mushrooms. *Inter J Pharma Bio Sci* 3(1): 611-615.
- Bobek P., Galbavy S. (2001) Effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-

induced precancerous lesions in rat colon. *British Journal of Biomedical Science*, 58: 164-168.

- Bobek P., Nosalova V., Cerna S. (2001) Effect of pleuran (beta glucan from *Pleurotus ostreatus*) in diet or drinking fluid on colitis rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, 45: 360–363.

- Borchers A. T, Stern J. S, Hackman R. M, Keen C. L, Gershwin M. E. (1999). Minireview: Mushrooms, tumors and immunity. *Proc Soc Exp Biol Med.*; 221:281–93.

- Borches (1999). Chapter 9 *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi): A Medicinal Mushroom. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd edition. By Wachtel-Galor S., Yuen J., Buswell J.A., and Benzie I.F.

- Boudet A.M. (2000) Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiol. Biochem.*, 38:81–96

- Bourquin LD, Titgemeyer EC, Fahey GC (1996) Fermentation of various dietary fiber sources by human fecal bacteria. *Nutr Res* 16:1119–1131.

- Bouzrara H, Vorobiev E. (2000) Beet juice extraction by pressing and pulsed electric fields. *Int Sugar J.* 102:194-200.

- Brito P. S., Canacsinh H., Mendes J. P., Redondo L. M., and Pereira M. T. (2012) Comparison between monopolar and bipolar microsecond range pulsed electric fields in enhancement of apple juice extraction. *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 40, no. 10, pp. 2348–2354.

- Calderón-Miranda, M. L., M. F. González, G. V. Barbosa-Cánovas and B. G. Swansons. (1998). Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: variables e inactivación microbiana. *Braz. J. Technol. Campinas* 1 (1,2): 3-11

- Caprile MD. (2005) Obtención y utilización de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos. *Congreso Mundial ISWA: “Hacia un sistema integral de residuos sólidos urbanos”*. Argentina.

- Cárdenas, G., Anaya, P. Von Plessing, C., Rojas, C. & Sepúlveda, J. (2008). Chitosan composite films. Biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med*; 19: 2397-2405.

- Castro, A. J., Barbosa-Cánovas, G. V. and Swanson, B. G. (1993). Microbial inactivation of foods by pulsed electric fields. *J Food Process Pres.* 17:47-73.

- Castro, A.J., Swanson, B.G., Barbosa-Canovas, G.V. et al., (2001) Pulsed electric field modification of milk alkaline phosphatase activity. In: (eds.) GV Barbosa-Cánovas, QH Zhang, Pulsed electric fields in food processing, Technomic Publishing, Lancaster, pp. 65-82.

- Chalermchat, Y., Malangone, L., Dejmek, P. (2010) Electropermeabilization of apple tissue: Effect of cell size, cell size distribution and cell orientation. *Biosystems Engineering* 105, 357-366.

- Chang, S. T. and Philip G. Miles. (2004). *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. Second Edition. CRC Press, Boca Raton, Fla. 451 p.
- Chaparro (2013). Tesis. Utilización de la cascara de naranja como fuente de fibra, prebiótico y antioxidante en productos cárnicos cocidos.
- Charles S.B. (2005) Dietary fiber, glycemic response, and diabetes. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49: 560–570.
- Chen J. and Seviour R. (2007). Medicinal importance of fungal beta-(1-3), (1-6)-glucans. *Mycological Research* 3: 635-652.
- Chen J, Lai P, Shen H, et al., (2013) Effect of extraction methods on polysaccharide of *Clitocybe maxima* stipe. *Adv J Food Sci Technol* 5:370–373.
- Cheung P.C. (1996). Dietary Fiber Content and Composition of Some Cultivated Edible Mushroom Fruiting Bodies and Mycelia. *J. Agric. Food Chem.* 44, 468-471.
- Cheung P.C. (1997). Dietary Fibre Content and Composition of Some Edible Fungi Determined by Two Methods of Analysis. *J Sci Food Agric* 1997, 73, 255-260.
- Cheung P.C.K. (2008) *Mushrooms as functional foods*. Editorial John Wiley & Sons. Wiley: Hoboken, NJ.
- Cheung P.C.K. (2013). Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness*. 2(3–4): 162–166.
- Chien R.C., Yen M.T, Mau J.L. (2016) Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers* 138 259–264.
- Cho J.H., Lee J.Y., Lee M.J, Oh H.N, Kang D.H and Jhune C.S. (2013) Comparative analysis of useful  $\beta$ -glucan and polyphenol in the fruiting bodies of *Ganoderma* spp. *J. Mushroom Sci. Prod.* 11(3):164-170.
- Coster, H. G. L., and U. Zimmermann (1975). The mechanism of electrical breakdown in the membranes of *Valonia utricularis*. *J. Memb. Biol.* 22:73-90.
- Crestini, C. & Giovannozzi-Sermanni, G. (1996a). Solid state fermentation of *Lentinus edodes*: A new and efficient approach to chitosan production. In R. A. A. Muzzarelli (Ed.), *Chitin enzymology* (pp. 595–600). Italy: Atec.
- Crestini C., Kovac B. and Giovannozzi-Sermanni G. (1996b) Production and Isolation of Chitosan by Submerged and Solid-state Fermentation from *Lentinus edodes* *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 50, Pp. 207-210
- Crisan E.V. and Sands A., (1987) "Nutritional value," in *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*, S. T. Chang and W. A. Hayes, Eds., p. 137-167, Academic Press, New York, NY, USA.
- Dabbour I., Takruri H.R. (2002) Protein quality of four types of edible mushrooms found in Jordan. *Plant Foods for Human Nutrition*, 57: 1–11.

- Danell, E. and Eaker, D., (1992). Amino acid and total protein content of the edible mushroom *Cantharellus cibarius* (Fries). *J. Sci. Food Agric.*, 60, 333-337.
- Delsart C., Cholet C., Ghidossi R., Grimi N., Gontier E., Gény L., Vorobiev E., Mietton-Peuchot M. (2014) Effects of Pulsed Electric Fields on Cabernet Sauvignon Grape Berries and on the Characteristics of Wines. *Food Bioprocess Technol* 7:424–436
- Dhanikula A.B., Panchagnula R., (2004) Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel, *AAPS J.* 6 88–89.
- Diamond, R., Ed. (1999). *The Fungal Cell Wall. Atlas of fungal Infections, Introduction to Medical Mycology.* Merck and Co.
- Di Anibal C., Farenzena S., Susana Rodríguez M.S. and Albertengo L. (2015). Chemical composition and nutritional value of Argentine commercial edible mushrooms *Journal of Consumer Protection and Food Safety. J. Verbr. Lebensm.* 10:155–164.
- Di Mario F, Rapana` P, Tomati U, Galli E. (2008) Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *Int J Biol Macromol.* 43 (1):8–12.
- Diez V.A., Alvarez A. (2001) Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. *Food Chemistry*, 75: 417–422.
- Donsi, F., Ferrari, G., and Pataro, G. (2010). Applications of pulsed electric field treatments for the enhancement of mass transfer from vegetable tissue. *Food Eng. Rev.* 2(2): 109–130.
- Dubost N.J., Ou B., Beelman R.B. (2007) Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 105: 727–735.
- Dundar A., Acay H., Yildiz A. (2008) Yield performances and nutritional contents of three oyster mushroom species cultivated on wheat stalk. *African Journal of Biotechnology*, 7: 3497–3501.
- Duran, A. & Nombela, C. (2004). Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment *Microbiology, Reading*, v. 150, n. 10, 3099–3103.
- Dutta, P. K., Dutta, J., and Tripathi, V. S. (2004). Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63,20–31.
- Elez-Martínez P, Martín-Belloso O. (2007). Effects of high intensity pulsed electric field processing conditions on vitamin C and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup. *Food Chem* 102:201–9.
- Escudero Álvarez E. y González Sánchez P. (2006) Unidad de Dietética y Nutrición. La fibra dietética. Hospital La Fuenfría. Madrid. *Nutr. Hosp.* 21 (Supl. 2) 61-72.
- FAO/OMS World Health Organization. (2003) Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint WHO/ FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series 916, Geneva, 2003.



- Farooq M.U., Chioza A, Ohga S. (2014) Vegetative Development of *Sparassis crispa* in Various Growth Conditions and Effect of Electric Pulse Simulation on Its Fruit Body Production. *Advances in Microbiology*, 4, 267-274.
- Ferguson LR, Robertson AM, Watson ME, Triggs CM, Harris PJ (1995) The effects of a soluble-fibre the adsorption of carcinogens fibres polysaccharide on to insoluble dietary. *Chem Biol Interact* 95:245–255.
- Fernández-López J., Fernández-Gines, J.M., Aleson-Carbonell, L., Sendra E., Sayas-Barbera, E., Pérez-Álvarez, J.A. (2003). Application of functional citrus by-products to meat products. *Trends in food Science and Technology* 15:176-185.
- Fincan, M., Dejmek, P. (2002) In situ visualization of the effect of a pulsed electric field on plant tissue. *Journal of Food Engineering* 55, 223-230.
- Flourey, N., Grosset, N., Leconte, M. et al., (2006) Continuous raw skim milk processing by pulsed electric field at non-lethal temperature: effect on microbial inactivation and functional properties. *Le Lait* 86, 43-57.
- Gacén J. y Gacén E. (1996). Quitina y quitosano. Nuevos materiales textiles. *Boletín Intexter (U.P.C)* 1110 67-71.
- Garde-Cerdán, T., Arias-Gil, M., Marsellés-Fontanet, A. R., Ancín- Azpilicueta, C., and Martín-Belloso, O. (2007). Effects of thermal and non-thermal processing treatments on fatty acids and free aminoacids of grape juice. *Food Control*, 18, 473-479.
- GEPC: European Group of Mushrooms Growers. (2016). Comunicación personal.
- Gil-Ramirez A., Clavijo C., Palanisamy M., Soler-Rivas C., Ruiz-Rodriguez A., Marín F.R., Reglero G., and Pérez M. (2011) Edible Mushroom as Potential Sources of new Hypocholesterolemic Compounds. *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7)*.
- Góngora-Nieto MM, Sepúlveda DR, Pedrow P, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG. (2002) Food processing by pulsed electric fields: Treatment delivery, inactivation level, and regulatory aspects. *LWT-Food Sci Technol.* 35(5):375-88.
- Gonzaga, M. L. C., Ricardo N. M. et al., (2005). Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. *Carbohydrate Polymers* 60: 43-49.
- Gonzales, M., Goycoolea, F., Sánchez, A., & Esqueda, M. (2004). Evaluación Espectroscópica de Quitina y  $\beta$ -Dglucanos del Hongo Comestible *Lentinula edodes* Cultivado sobre Madera de Vid, Manzano y Encino. *Boletín CIAD* 13(6): 3-4.
- Goyal M, Soni G. (2011). Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Pleurotus florida*. *Afr J Microbiol Res.*;5:1131–6.

- Grifoll V., Tello M.L., Roncero-Ramos I., Pérez M. (2014) Poder antioxidante de hongos cultivados en La Rioja. *Actas de Horticultura: XIII Jornadas del Grupo de Horticultura y I Jornadas del Grupo de Alimentación y Salud*, 65: 59-64.
- Grigelmo-Miguel, N., Martín-Belloso, O. (1998). Characterization of dietary fiber from orange juice extraction. *Food Research International*. 31(5), 355-361.
- Guderjan M, Toepfl S, Angersbach A, Knorr D., (2005). Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of plant oils. *Journal of Food Engineering* 67, 281-287.
- Guderjan, M., Elez-Martinez, P., & Knorr, D. (2007). Application of pulsed electric fields at oil yield and content of functional food ingredients at the production of rapeseed oil. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 55-62.
- Guillamón E., García-Lafuente A., Lozano M., D'Arrigo M., Rostagno M.A., Villares A., Martínez J.A. (2010) Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*, 81: 715–723.
- Gunde Cimerman, N. and Cimerman A. (1995). Pleurotus fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase- lovastatin. *Experimental Mycology* 19:1-6.
- Hazama S., Oka M., Yoshino S., Iizuka N., Wadamori K., Yamamoto K., Hirazawa K., Wang F., Ogura Y., Masaki Y., et al., (1995) Clinical effects and immunological analysis of intraabdominal and intrapleural injection of lentinan for malignant ascites and pleural effusion of gastric carcinoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 22: 1595-1597.
- Heinz, V., Álvarez, I., Angersbach, A., and Knorr, D. (2002). Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields – basic concepts for process design. *Trends Food Sci. Tech.*, 12: 103-111.
- Helander, I. M., Nurmiäho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., & Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 235-244.
- Heux L., Brugnerotto J., Desbrières J., Versali M.F., Rinaudo M. (2000) Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromolecules* 1:746–51.
- Hirano, S. (1999). Chitin and Chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International*. 48(8): 732-734.
- Ho, S. Y., G.S., M., Cross, J. D. and Griffiths, M. W. (1995). Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* by high voltage electric pulses. *J Food Sci.* 60(6):1337-1343
- Ho, S.Y.; Mittal, G.S. (1996) Electroporation of cell membranes: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 16, 349–362.
- Howarth N.C., Saltzman E., Roberts S.B. (2001) Dietary fiber and weight regulation. *Nutrition Reviews* 59: 129-139.

- Hozová B., Kuniak L., Kelemenová B. (2004): Application of  $\beta$ -D-glucans isolated from mushrooms *Pleurotus ostreatus* (pleuran) and *Lentinus edodes* (lentinan) for increasing the bioactivity of yoghurts. *Czech J. Food Sci.*, 22: 204–214.
- Huang, S.-Q.; Ning, Z.-X. (2011). Extraction of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and its immune enhancement activity. *Int. J. Biol. Macromol.*47, 336–341.
- Janmey P.A., Kinnunen P.K.j. (2006). Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends in cell biology.* 16:538.546.
- Kuldiloke, J., Eshtiaghi, M.N., Neatpisarnvanit, C. (2008). Application of high electric field pulses for sugar cane processing, in Proceedings of 34th Congress on Science and Technology of Thailand (STT34), Science and Technology for Global Challenges, H\_H0015:1–6. Bangkok, Thailand.
- Jayakumar T., Ramesh E., Geraldine P. (2006) Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 1989-1996.
- Jayakumar T., Thomas P.A., Geraldine P. (2007) Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Experimental Gerontology*, 42: 183-191.
- Je, J. Y. & Kim, S. K. (2006a). Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:6629-6633.
- Je, J. & Kim, S. K. (2006b). Antimicrobial action of novel chitin derivative. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760:104-109.
- Jemai A.B and Vorobiev E. (2002) Effect of moderate electric field pulses on the diffusion coefficient of soluble substances from apple slices. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 73-86.
- Jemai A.B, and Vorobiev E. (2006). Pulsed Electric Field Assisted Pressing of Sugar Beet Slices: towards a Novel Process of Cold Juice Extraction, *Biosystems Engineering*. 93 (1):57–68.
- Jeyamkondan, S., Jayas, D. S., and Holley, R.A. (1999). Pulsed electric field processing of foods: A review. *J. Food Protect.* 62(9): 1088–1096.
- Jo E-K, Heo D-J, Kim J-H, et al., (2013) The effects of subcritical water treatment on antioxidant activity of Golden Oyster mushroom. *Food Bioprocess Technol* 6:2555–2561.
- Jull, A. B., Ni Mhurchu C., Bennett, D. A., Dunshea-Mooij , C. A., Rodgers, A. (2008). Chitosan for overweight or obesity. *Cochrane Database Syst Rev*,16: CD003892.
- Kalac P. (2013) A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *J Sci Food Agric* 2013; 93: 209–218

- Karácsonyi Š., Kuniak L. (1994) Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble  $\beta$ -d-glucan. *Carbohydrate Polymers*, 24: 307–312.
- Khan, M.A., Amin, S.M.R., Uddin, M.N., Tania, M., Alam, N., (2008). Comparative study of the nutritional composition of oyster mushrooms cultivated in Bangladesh. *Bangladesh J. Mushroom* 2, 9–14.
- Khan MA. (2010) Nutritional composition and Hypocholesterolemic effect of mushroom: *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus florida*: LAP Lambert Academic publishing GmbH & Co. KG: Saarbrücken, Germany 1-11.
- Kim, G. Y., Lee M. Y. et al., (2005). Effect of water-soluble proteoglycan isolated from *Agaricus blazei* on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *International Immunopharmacology* 5: 1523-1532.
- Kim, S. & Rajapakse, N. (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers* 62: 357-368.
- Kim M.Y., Seguin P., Ahn J.K., Kim J.J., Chun S.C., Kim E.H., Seo S.H., Kang E.Y., Kim S.L., Park Y.J., Ro H.M., Chung I.M. (2008) Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56: 7265–7270.
- Knorr D. and Angersbach A. (1998) Impact of high-intensity electric field pulses on plant membrane permeabilization. *Trends in Food Science & Technology* 9 185±191
- Kües, U. & Liu, Y. (2000). Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54(2), 141-152.
- Kumar S (1995). Spawn production technology. In: Chadha KL, Sharma SR eds. *Advances in Horticulture vol. 13-Mushroom*. New Delhi: Malhotra Publishing House. pp 521–535.
- Lárez Velásquez C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*, 1(2), 15-21
- Lebovka, N.I., Bazhal, M.I., Vorobiev, E. (2001) Pulsed electric field breakage of cellular tissues: visualisation of percolative properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2, 113-125.
- Leighton, F. y Urquiaga I., (2001) Polifenoles del vino y Salud Humana, Antioxidantes y Calidad de Vida, *Revista antioxidantes y calidad de vida online*, Pontificia Universidad Católica de Chile, Febrero.
- Li, C. T., Mao, X. X., and Xu, B. J. (2012). Pulsed Electric Field Extraction Enhanced Anti-coagulant Effect of Fungal Polysaccharide from Jew's Ear (*Auricularia auricula*). *Phytochem. Analysis*. 24(1): 36–40.
- Liu Y.-T., Sun J., Luo Z.-Y., Rao S.-Q., Su Y.-J., Xu R.-R., Yang Y.-J. (2012) Chemical composition of five wild edible mushrooms collected from Southwest China and their

antihyperglycemic and antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 1238–1244.

- Liu J., Jia L., Kan J., Jin G. (2013) In vitro and in vivo antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food and Chemical Toxicology*, 51: 310–316.

- Loginova K.V., Shynkaryk M.V., Lebovka N.I., Vorobiev E. (2010) Acceleration of soluble matter extraction from chicory with pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering* 96 374–379.

- López, N., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2008a). Application of pulsed electric fields for improving the maceration process during vinification of red wine: Influence of grape variety. *European Food Research and Technology*, 227(4), 1099–1107.

- López, N., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2008b). Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of tempranillo grapes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(4), 477–482.

- López, N., Puértolas, E., Condón, S., Raso, J., & Alvarez, I. (2009). Enhancement of the extraction of betanine from red beetroot by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 90(1), 60-66.

- Ma, J.; Qiao, Z.; Xiang, X. (2011). Optimisation of extraction procedure for black fungus polysaccharides and effect of the polysaccharides on blood lipid and myocardium antioxidant enzymes activities. *Carbohydr. Polym.* 84, 1061–1068.

- Manohar V., Talpur N.A., Eduard B.W., Lieberman S., Preuss H.G. (2002) Effects of a water-soluble extract of Maitake mushroom on circulation glucosa/insulin concentrations in KK mice. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 4: 43–48.

- Mantovani, M., Bellini, M., Angeli, J., Oliveira, R., Silva, A. & Ribeiro, L. (2008).  $\beta$ -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Research*, 658, 154-161.

- Manzi, P., Gambelli, L., Marconi, S., Vivanti, V. and Pizzoferrate, L. (1999). Nutrients in edible mushroom: An inter-species comparative study. *Food Chemistry* 65: 477-482.

- Manzi P., Pizzoferrato L. (2000). Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry* 68: 315-318.

- Manzi P., Aguzzi A., Pizzoferrato L. (2001) Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*, 73: 321–325.

- Manzi, P., Marconi, S., Aguzzi, A. and Pizzoferrato. (2004). Commercial mushroom: nutritional quality effect of cooking. *Food Chemistry* 84:201-206.

- Martín Belloso, O.; Rosell Polo, J.R.; Barbosa Cánovas, G.V. (1997) Campos eléctricos elevados. Una alternativa para la conservación de alimentos. *Automática e Instrumentación*, 272, 59-62.

- Martínez, J. P. & Gozalbo D. (2001). Chitin, *Encyclopedia of life sciences*. Nature publishing group, 178.

- Mattila P., Konko K., Eurola M., Pihlava J.M., Astola J., Vahteristo L., Hietaniemi V., Kumpulainen J., Valtonen M., Piironen V. (2001) Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49: 2343-2348.

- Mattila P., Lampi A.M., Ronkainen R., Toivo J., Piironen V. (2002) Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 76: 293-298.

- Mau J.L., Lin H.C., Ma J.T., Song S.F. (2001) Non-volatile taste components of several speciality mushrooms. *Food Chemistry*, 73: 461-466.

- Mendivil, J. (1996). *Basidiomicetes: setas y hongos de Aragón*.

De <http://www.naturalezadearagon.com/hongos/index.php> (consultada el 20 de Marzo 2015)

- Mizuno M., Nishitani Y. (2013) Immunomodulating compounds in Basidiomycetes. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 52(3): 202-207.

- Moháček-Grošev, V., Bozac, R., Puppels, G. J. (2001). Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. *Spectrochim. Acta A*, v. 57, p. 2815- 2829.

- Mongkontanawat, N. and Wongekalak, L. (2015) Effect of Blanching on B-glucan Content of Native Mushrooms in Thailand. *Journal of Agricultural Technology Vol. 11(8): 2227- 2237*.

- Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C. *Ingestas* (2004). Recomendadas de energía y nutrientes En: *Tablas de composición de alimentos*. Ediciones Pirámide. Madrid. pp: 127-131. ISBN: 84-368-1571-8.

- Muzzarelli R.A., Boudrant J., Meyerc D., Mannod N., DeMarchisd M., Paoletti M.G. (2012). Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin. Review. *Carbohydrate Polymers* 87: 995-1012.

- Nawirska A, Kwasniewska M (2005) Dietary fibre fractions from fruit and vegetable processing waste. *Food Chem* 91:221-225.

- Nicolosi R., Bell S.J., Bistrrian B.R., Greenberg I., Forse R.A., Blackburn G.L. (1999). Plasma lipid changes after supplementation with  $\beta$ -glucan fiber from yeast. *American Journal Clinical Nutrition* 70 (2): 208-212.

- Nitschke J., Altenbach H.F., Malolepszy T., Mölleken H. (2011). A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. *Carbohydrate Research* 346 (2011) 1307–1310.
- Odriozola-Serrano I., Aguiló-Aguayo I., Soliva-Fortuny R. and Martín-Belloso O. (2013). Pulsed electric fields processing effects on quality and health-related constituents of plant-based foods. *Trends in Food Science & Technology* 29:98-107.
- Ohga S., Iida S., Koo C. D., and Cho N. S. (2001). "Effect of electric impulse on fruit body production of *Lentinula edodes* in the sawdust-based substrate," *Journal of the Japanese Society of Mushroom Science and Biotechnology*, vol. 9, no. 1, pp. 7–12.
- Ohga S. (2012) Application of electric pulsed power on fruit body production of edible and medicinal mushrooms. *CNU Journal of Agricultural Science* Vol. 39, No. 4, pp. 591-594, December 2012.
- Palacios I., Lozano M., Moro C., D'Arrigo M., Rostagno M.A., Martínez J.A., García-Lafuente A., Guillamón E., Villares A. (2011) Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128: 674– 678.
- Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R., Rodriguez-León, J.A., Soccol, V.T. (2001). Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Tech.* 77. 203 – 214.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J* 14, 81–84.
- Parniakov O, Lebovka NI, Van Hecke E, Vorobiev E. (2014) Pulsed electric field assisted pressure extraction and solvent extraction from mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food Bioprocess Technol* 7:174–183.
- Patil S.S., Ahmed S.A., Telang S.M., Baig M.M.V. (2010) The nutritional value of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr) Kumm cultivated on different lignocellulosic agrowastes. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 7: 66–76.
- Pedneault K., Angers P., Avis T.J., Gosselin A., Tweddell R.J. (2007) Fatty acid profiles of polar and non-polar lipids of *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopiae* var. 'citrino-pileatus' grown at different temperatures. *Mycological Research*, 111: 1228–1234.
- Pelaez Vital, A.C., Goto, P.A., Hanai, L.N., Gomes da Costa, S.M., Alves de Abreu Filho, B., Nakamura, C.V., Matumoto-Pinto, P.T. (2015) Microbiological, functional and rheological properties of low fat yogurt supplemented with *Pleurotus ostreatus* aqueous extract, *LWT – Food Science and Technology* 64: 1028-1035.
- Perez, O., Pilosof, A.M.R. (2004) Pulsed electric field effects on the molecular structure and gelation of  $\beta$ -lactoglobulin concentrate and egg white. *Food Research International* 37, 102-110.

- Pothakamury U.R., Vega H., Zhang Q., Barbosa-Canovas G.V, and Swanson B.G. (1996) Effect of Growth Stage and Processing Temperature on the Inactivation of *E. coli* by Pulsed Electric Fields. *Journal of Food Protection*, 59: 11, 1167-1171.
- Pizzo, P.; Albertengo, L.; Rodríguez, M.S. (2012) Obtencion de quitosano a partir del aislamiento de quitina fúngica. Tesis Doctoral. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/427>.
- Pochanavanich P. y Suntornsuk W. (2002) Fungal chitosan production and its characterization. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 17–21.
- Praporscic, I., Lebovka, N., Vorobiev, E. et al., (2007) Pulsed electric field enhanced expression and juice quality of white grapes. *Separation and Purification Technology* 52, 520-526.
- Puértolas, E., López, N., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2010). Potential applications of PEF to improve red wine quality. *Trends in Food Science and Technology*, 21(5), 247– 255.
- Qin, B. L., Zhang, Q., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G. and Pedrow, P. D. (1994) Inactivation of microorganisms by pulsed electric fields with different voltage waveforms. *IEEE Trans Dielec Insul.* 1(6):1047-1057
- Rabea E.I., Badawy E.T.M., Stevens C.V., Smagghe G., Steurbaut W. (2003) Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action, *Biomacromolecules*, 4 1457–1465.
- Rahi D.K. and Malik D. (2016) Diversity of Mushrooms and Their Metabolites of Nutraceutical and Therapeutic Significance. *Journal of Mycology*, Article ID 7654123, 18 pages. doi:10.1155/2016/7654123
- Rai R. D. (2003) Chapter 21 Production of Edible Fungi. BOOK: *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*. Edit by Dilip K. Arora, CRC Press.
- Rajarathnam S., Shashirekha M.N. and Rashmi S. (2003). Biochemical changes associated with mushroom browning in *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach and *Pleurotus florida* (Block & Tsao): commercial implications. *J Sci Food Agric* 83:1531–1537.
- Ramírez-Cadavid D.A., Galindo-Muñoz A.R, Zapata-Ocampo P.A., Rojas-Vahos D.F., Fernández-Ossa C., Atehortúa-Garcés L. (2010) Efecto de los Campos Eléctricos sobre la Producción de Biomasa Micelial del Hongo Medicinal *Ganoderma lucidum*. *Actual Biol* 32 (92): 5-17.
- Rani B., Kumar V., Singh J., Bisht S., Teotia P., Sharma S., Kela R. (2014) Bioremediation of dyes by fungi isolated from contaminated dye effluent sites for bio-usability. *Brazilian Journal of Microbiology* 45, 3, 1055-1063.



- Raso, J., & Heinz, V. (Eds.). (2006). Pulsed electric fields technology for the food industry. Fundamentals and applications. New York: Springer.

- Rastogi, N. K., Eshtiaghi, M. N., and Knorr, D. (1999). Accelerated mass transfer during osmotic dehydration of high intensity electrical field pulse pretreated carrots. *Journal of Food Science* 64: 1020-1023.

- Reis, C., Ribeiro, A., Veiga, F., Neufeld, R. & Damg , C. (2008). Polyelectrolyte biomaterial interactions provide nanoparticulate carrier for oral insulin delivery. *Drug Deliv*, 15: 127-39.

- Reis FS, Barros L, Martins A, Ferreira ICFR. (2012a) Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. *Food and Chem Toxicol*; 50(2):191-7.

- Reis F.S., Martins A., Barros L., Ferreira I.C.F.R. (2012b) Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between in vivo and in vitro samples. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 1201–1207.

- Reshetnikov S.V., Wasser S.P., Tan K.K. (2001) Higher basidiomycetes as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides (review). *International Journal of Medicinal Mushroom*, 3: 361–394.

- Riera, E.; Blanco, A.; Garcia, J.; Bedito, J.; Mulet, A.; Gallego-Juarez, J.A.; Blasco, M. (2010). High-power ultrasonic system for the enhancement of mass transfer in supercritical CO<sub>2</sub> extraction processes. *Ultrasonics* 50, 306–309.

- Roncero-Ramos I., Mendiola-Lanao M., Pérez-Clavijo M., and Delgado-Andrade C. (2017). Effect of different cooking methods on nutritional value and antioxidant activity of cultivated mushrooms. *International Journal Of Food Sciences And Nutrition* Vol. 68, Iss. 3 Pages 287-297.

- Rop O., Mlcek J., and Jurikova T. (2009). Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews*. Vol. 67(11):624–631

- Rosell -Soto E., Parniakov O., Deng Q., Patras A., Koubaa M., Grimi N., Boussetta N., Tiwari B.K., Vorobiev E., Lebovka N and Barba F.J. (2015) Application of Non-conventional Extraction Methods: Toward a Sustainable and Green Production of Valuable Compounds from Mushrooms. *Food Eng Rev* DOI 10.1007/s12393-015-9131-1

- Ruthes AC, Smiderle FR, Iacomini M (2016) Mushroom heteropolysaccharides: a review on their sources, structure and biological effects. *Carbohydr Polymers* 136: 358-375.

- Saldaña G, Puértolas E, López N, García D, Álvarez I, Raso J, (2009). Comparing the PEF resistance and occurrence of sublethal injury on different strains of *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in media of pH 4 and 7. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 160-165.

- Sale, A. J. H., and Hamilton, W. A. (1967). Effects of high electric fields on microorganisms I. Killing of bacteria and yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 148: 781–788.
- Santos, Neves, J. C., Pereira, M. I., Carbonero, E. R., Grachel, A. H., Gorin, P. A., Sasaki, G. L. & Lacomini, M. (2008). A gel forming betaglucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida*. *Carbohydr Res.* 343.(9): 1456-1462.
- Sarkis J.R., Boussetta N., Blouet C., Tessaro I.C, Marczak I.D.F, Vorobiev E. (2015) Effect of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on polyphenol and protein extraction from sesame cake. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 29 170–177.
- Schilling, S., Alber, T., Toepfl, S., Neidhart, S., Knorr, D., Schieber, A., and Carle R. (2007). Effects of pulsed electric field treatment of apple mash on juice yield and quality attributes of apple juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 127e134.
- Schoenbach, K. H., Peterkin, F. E., Alden, R. W., and Beebe, S. J. (1997). The effect of pulsed electric fields on biological cells: Experiments and applications. *IEEE Trans. Plasma Sci.*25(2): 284–292.
- Seo H-K, Lee S-C (2010) Antioxidant activity of subcritical water extracts from chaga mushroom (*Inonotus obliquus*). *Sep Sci Technol* 45:198–203.
- Soler-Rivas C., Reglero G. (2012). El champiñón como alimento funcional. *Acta de las V Jornadas Técnicas del Champiñón y otros Hongos Cultivados en Castilla la Mancha.* 7-20.
- Soliva-Fortuny R., Balasa A., Knorr D. and Martín-Belloso O. (2009). Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: a review *Trends in Food Science & Technology* 20 544-556.
- Souilem F., Fernandes A., Calhelha R.C., Barreira J.C.M, Barros L., Skhiri F., Martins A., Ferreira C.F.R. (2017) Wild mushrooms and their mycelia as sources of bioactive compounds: Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties. *Food Chemistry* 230 40–48.
- Spolar M. R., Akachi T., et al., (1995). Eritadenine-induced alteration of hepatic phospholipid metabolism in relation to its hypocholesterolemic action in rats. *Nutritional Biochemistry* 6: 80-87.
- Stamets P. Chilton J.S. (1983). *The mushrooms cultivator: a practical guide to growing mushrooms at home.* Agarikon Press Olimpia.
- Stamets, P., 1993, *Growing gourmet and medicinal mushrooms.* Ten Speed Press, Berkeley, California. s. str. in southern South America: mating tests en "Mycol. Res.", Vol. Nº 106 (11), p. 1323-1330. ISBN 1-58008-175-4.
- Statements, P. (1983). *The mushroom cultivator: A Practical Guide to Growing Mushrooms at home.* Agarikon Press. EUA.

- Theuwissen E., Mensink R.P. (2008) Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease: a review. *Physiological Behaviour*, 94: 285–292.
- Tian, Y.; Zeng, H.; Xu, Z.; Zheng, B.; Lin, Y.; Gan, C.; Lo, Y.M. (2012). Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Carbohydr. Polym.* 88, 522–529.
- Toepfl S, Heinz V, Knorr D, (2005). Overview of Pulsed Electric Field Processing for Food. En DW Sun (Ed.), *Emerging Technologies for Food Processing* (pp. 69-97). Academic Press: Londres.
- Toepfl S., Mathys A., Heinz V., and Knorr D. (2006) Review: Potential of High Hydrostatic Pressure and Pulsed Electric Fields for Energy Efficient and Environmentally Friendly Food Processing *Food Reviews International* Vol. 22 , Iss. 4
- Tsong, T.Y. (1990) Electrical modulation of membrane proteins: Enforced conformational oscillations and biological energy and signal transductions. *Annu. Rev. Biophys. & Chem* 19, 83-106.
- Tsong, T.Y. (1996). Electrically stimulated membrane breakdown. In: (eds.) PT Lynch, MR Davey, *Electrical Manipulation of Cells*, Chapman & Hall, New York, pp. 15-36.
- Tsukamoto S., Yamamoto K., Kudoh H., Ohga S. and Akiyama H. (2005) “Development of an automatic electrical stimulator to mushroom sawdust pots”. 15<sup>th</sup> IEEE Pulse Power Conf., pp.1437-1440.
- Upadhyay, R. C., & Sing, M. (2010). Production of edible mushrooms. *Industrial Application X*. In K. Esser (Ed.), *The Mycota* (2nd ed., pp. 79–100). Berlin: Springer-Verlag.
- USDA National Nutrient Database for Standard Reference (2016). (U.S.D.A., <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods>).
- Usha S. and Suguna V. (2014). Antioxidant Activity in Terms of Total Phenol and Reducing Power of Two Strains of *Hypsizygus ulmarius* CO2 and IIHR Hu1. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 27(1), 59: 325-327
- Vallverdú-Queralt A., Oms-Oliu G., Odriozola-Serrano I., Lamuela-Raventós R.M, Martín-Belloso O., Elez-Martínez P. (2013) Metabolite profiling of phenolic and carotenoid contents in tomatoes after moderate-intensity pulsed electric field treatments. *Food Chemistry* 136:199–205
- Vaz J. A., Barros L., Martins A., Santos-Buelga C., Vasconcelos M.H., Vasconcelos I.C.F.R. (2011) Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. *Food Chemistry*, 126: 610–616.
- Vega-Mercado, H., Pothakamury, U. R., Chang, F.-J., Barbosa-Cánovas, G. V. and Swanson, B. G. (1996). Inactivation of *Escherichia coli* by combining pH, ionic strength and pulsed electric fields hurdles. *Food Res Int.* 29(2):117-121.

- Vega-Mercado H., Martin-Belloso O., Qin B.L, Chang F.J., Góngora-Nieto M., Barbosa-Cánovas G.V and Swanson B.G. (1997) Non-thermal food preservation: Pulsed electric fields. *Trends in Food Science & Technology* May Vol. 81 151-157.
- Vetter, J. (2007). Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. *Food Chemistry*, 102(1), 6–9.
- Vidovic S, Mujic I, Zekovic Z, et al., (2011) Extraction of fatty acids from *Boletus edulis* by subcritical and supercritical carbon dioxide. *J Am Oil Chem Soc* 88:1189–1196.
- Vorobiev E, Lebovka NI, (2006). Extraction of Intracellular Components by Pulsed Electric Fields. En J Raso, V Heinz (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications* (pp. 153-193). Springer: Nueva York.
- Wasser (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:258–274.
- Wasser, S. P. (2014). Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences and challenges. *Biomedical Journal*, 3, 345–356.
- Weaver J. C. (2000). “Electroporation of Cells and Tissues” *IEEE Trans. Plasma Sci*, Vol. 28: 1.
- Wessels, J.G.H. (1993). Fruiting in the higher fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 34, 147-202.
- Wouters PC, Álvarez I, Raso J, (2001). Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends in Food Science and Technology* 12, 112-121.
- Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F. A. & Sams, C. E. (2004). Chitin and chitosan: Value-added products from mushroom waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7905–7910.
- Xie BX, Li AP (2006). The intake of dietary fiber, in: *Dietary Fiber*. Science Publishing Press, Beijing, China, pp. 25-26.
- Xu C, Tian Z, Zhang C, et al., (2014) Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Eng Sci* 12:17–20. 29.
- Xue D., Farid M. M. (2015) Pulsed electric field extraction of valuable compounds from white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 29 178–186.
- Zhang Q, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG. (1995) Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization. *J Food Engineer*. 25:261-81.

- Zhang M., Cui S.W., Cheung P.C.K., Wang Q. (2007) Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology*, 18: 4–19.

- Zhang, Z.-H., Zeng, X.-A., Brennan, C., Brennan, M., Han, Z., and Xiong, X.-Y. (2015). Effects of Pulsed Electric Fields (PEF) on Vitamin C and Its Antioxidant Properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 16:24159–24173.

- Zhao, W, Yu, Z., Liu, J., Yu, Y., Yin, Y., Lin, S., & Chen, F. (2011). Optimized extraction of polysaccharides from corn silk by pulsed electric field and response surface quadratic design. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(12), 2201–2209.

- Zhen R., Jie S. et al (2005). Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. *International immunopharmacology* 5:811-820.

- Zimmermann U, Pilwat G, Riemann F, (1974). Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophysics Journal* 14, 881-899.

## 10 ANEXOS

---

### ANEXO 1:

#### Posters en Congresos

2015 Innova-CIBIA: 7º Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos (INNOVA). y 10º Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos (CIBIA). Uruguay, 7-9 Octubre

- Mendiola Lanao Mónica, Grifoll García Vanessa, Roncero Ramos Irene, Pérez Clavijo Margarita, Martín Belloso Olga. "Composición nutricional, contenido en  $\beta$ -glucanos y fibra dietética de setas cultivadas en La Rioja (España)"

2016 ISMS Congress. International Society for Mushroom Science. Amsterdam 29 Mayo-2 Junio

-Mónica Mendiola-Lanao, Irene Roncero-Ramos, Vanessa Grifoll-García, Margarita Pérez-Clavijo, Cristina Delgado-Andrade and Olga Martín-Belloso "Proximate Composition,  $\beta$ -Glucan Content, Dietary Fibre and Antioxidant Activity in Mushrooms Cultivated in La Rioja, Spain"

- Mónica Mendiola Lanao, Vanessa Grifoll García, Irene Roncero Ramos, Margarita Pérez Clavijo, Cristina Delgado Andrade, Olga Martín Belloso. "Effect of Pulsed Electric Fields on Proximate Composition and Bioactive Compounds in Mushrooms Cultivated in La Rioja, Spain"

- Margarita Pérez-Clavijo, Irene Roncero-Ramos, Cristina Delgado-Andrade, Mónica Mendiola-Lanao and Vanessa Grifoll-García. "Effect of different cooking methods on nutritional value and antioxidant activity in cultivated mushrooms"

#### Publicaciones y trabajos enviados

International Journal of Medicinal Mushrooms

- Mónica Mendiola-Lanao, Vanessa Grifoll-García, Margarita Pérez-Clavijo, Olga Martín-Belloso. "Antioxidant activity, dietary fiber and  $\beta$ -glucan content of selected edible mushrooms from La Rioja, Spain".

## ANTIOXIDANT ACTIVITY, DIETARY FIBER AND $\beta$ -GLUCAN CONTENT OF SELECTED EDIBLE MUSHROOMS FROM LA RIOJA, SPAIN

Mónica Mendiola-Lanao<sup>1</sup>, Vanessa Grifoll-García<sup>1</sup>, Margarita Pérez-Clavijo<sup>1</sup>, Olga Martín-Belloso<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Tecnológico de Investigación del Champiñón de La Rioja (CTICH). Ctra. de Calahorra, Km. 4, 26560 Autol (La Rioja), España.

<sup>2</sup>Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad de Lleida. Agrotecnio Center. Rovira Roure 191, 25198 Lleida, España.

---

**Abstract:** Fruiting bodies of thirteen mushrooms cultivated in La Rioja, Spain were characterized and compared in terms of antioxidant activity, dietary fiber and glucans content. In addition, the proximate composition was determined by AOAC<sup>1</sup> methods. The antioxidant activity was evaluated through the total phenolic content using the Folin-Ciocalteu method, DPPH scavenging activity assay, ABTS radical scavenging activity and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP). The dietary fiber and its fractions were determined by the AOAC 991.43<sup>2</sup> method and glucans content by a Megazyme specific enzymatic kit. Mushrooms, in general, showed a high antioxidant activity, being, *Agrocybe aegerita*, the specie with the highest antioxidant activities values, 253,50 $\mu$ g EQ gálico/100 mg in total phenolics and 2,40, 4,65 and 2,77 $\mu$ mol EQ Trolox TE/100mg in DPPH, ABTS and FRAP respectively. The total dietary fiber content in the studied mushrooms ranged from 25,47 to 69,08g/100g (dry weight) and the  $\beta$ -glucan content from 7,71 to 40,64g/100g (dry weight). Both dietary fiber and  $\beta$ -glucan concentrations significantly varied among mushroom species. This study demonstrate that mushrooms cultivated in La Rioja, the first Spanish grower area, are good components of the human diet due to their high antioxidant properties and being source of dietary fiber, glucans, proteins and minerals with a low caloric value.

---

Keywords: edible mushrooms · antioxidant activity · dietary fiber ·  $\beta$ -glucan · proximate composition

## 1. Introduction

Mushrooms are defined as fungi that have distinctive and visible fruiting bodies. Edible mushrooms are becoming more and more popular in human diet for their nutritional<sup>3</sup> and organoleptic<sup>4</sup> properties. Mushrooms are a source of many different nutraceuticals such as unsaturated fatty acids, phenolic compounds, tocopherols, ascorbic acid and carotenoids that have been found to be excellent antioxidants. They contain low amounts of fat and high amounts of protein as well as dietary fiber<sup>5</sup> and  $\beta$ -glucans<sup>6</sup>.

At present, the interest in natural antioxidants has increased considerably. The antioxidant activity of several plant materials has widely been reported<sup>7-10</sup>. Antioxidant activity is associated to many biological functions, such as antimutagenicity, anticarcinogenicity, and antiaging, among others<sup>11</sup>. The ability of some phenolic compounds to act as antioxidant has been demonstrated in the literature and they have also been reported to be the major naturally occurring antioxidant compounds found in edible mushrooms. The antioxidant activity of phenolic compounds is correlated to the capture of free radicals and binding of metal ions, which are precursors in the formation of free radicals<sup>12</sup>. The antioxidant compounds are electron donors and can reduce the oxidized intermediates of the lipid peroxidation process, so that they can act as primary and secondary antioxidants<sup>13</sup>. Moreover, the reducing power of a compound is related to its electron transfer ability and may also serve as a significant indicator of its potential antioxidant activity<sup>14</sup>. High antioxidant activities in mushrooms can suppress active oxygen species, which are related to aging and diseases<sup>15</sup>.

Considering their high fiber content and unique composition, edible fungi are sources of dietary fiber in human nutrition<sup>16</sup>. In fact, consumption of edible mushrooms can easily provide up to 25% of the recommended dietary intake of dietary fiber. The main physiological effect of Insoluble Dietary Fiber (IDF) is to increase fecal bulk and reduce gastrointestinal transit time<sup>17</sup>. By contrast, Soluble Dietary Fiber (SDF) has a better retention ability and fermentable capacity, and possesses more physiological functions than IDF, such as reducing the risk of cardiovascular disease, lowering blood serum cholesterol and promoting gut microflora<sup>18-20</sup>. The cell walls of fungi are the main source of biologically active polysaccharides, in which chitin fibers are interlinked, creating a network within a glucan matrix<sup>21,22</sup>. Fungal polysaccharides has attracted much attention, because of their  $\beta$ -glucans content, which have importance as nutraceutical and texturing agents<sup>23,24</sup>. Moreover,  $\beta$ -glucans decrease blood cholesterol levels<sup>25</sup>, or diabetes<sup>26</sup> and demonstrate significant immunomodulative properties, antitumor<sup>27</sup>, antiviral<sup>28</sup> and hepato-protective effects<sup>29</sup>.



The main objective of the present work was to evaluate and compare the antioxidant capacity, the dietary fiber and  $\beta$ -glucan content as well as the proximate composition of the most popular edible mushrooms species cultivated in La Rioja, the first growing area in Spain.

## **2. Material and methods:**

### 2.1 Material

The mushrooms species (table 1) were cultivated in the facilities of The Technological Research Mushroom Center (CTICH) in Autol, La Rioja (Spain), where they were harvested and immediately lyophilized (Alpha 1-2 LDplus Freeze Dryer, Martin Christ, Osterode (Germany)), reduced to a fine dried powder, and stored at 4°C, protected from light, until further analysis.

### 2.2 Proximate composition determination

Chemical composition including moisture, ash, carbohydrates, lipids and crude protein were determined according to the Association of Official Analytical Chemists Methods procedures<sup>1</sup>. Moisture was determined by drying samples overnight at 105°C in an oven until constant weight.

The crude protein content was determined using Kjeldahl method<sup>30</sup> with Kjeltec digestion apparatus (2020 Digestion Unit, Tecator, Sweden). A conversion factor nitrogen-to-protein of 4,38 was used for being appropriate for estimating mushroom protein<sup>31,32</sup>.

The crude fat was determined by extracting a known weight of powdered sample with petroleum ether as solvent, using a Soxhlet; the ash content was determined by incineration at 550°C (muffle: 10PR400PAD`P, Horbesal, Caldes de Montbui, Barcelona, Spain). The carbohydrate content was calculated by difference: Carbohydrate (%) = 100-(protein + fat+ ash). Energy was calculated according to the following equation: Energy (kcal) = 4x (g protein+ g carbohydrate) + 9x (g fat). All results are presented as percentage of dry weight except moisture (percentage of fresh weight).

### 2.3 Analysis of total phenols and antioxidant activity.

#### 2.3.1 Sample extraction

Samples were extracted based on the procedures described by Pérez-Jiménez and Saura-Calixto<sup>33</sup>. Briefly, 0,25g of sample were placed in a tube and 2,5ml of acidic methanol/water (50:50 v/v, pH 2) were added. The tube was thoroughly shaken at room temperature for 1h and centrifuged at 2500g for 10min, and the supernatant was recovered. It was added 2,5ml of acetone/water (70:30, v/v) to the residue, and

the shaking and centrifugation steps were repeated. The methanolic and aqueous-acetone extracts were then combined and the volume made up to 5ml.

### 2.3.2 Determination of total phenols

Total phenol content was determined following the Folin–Ciocalteu colorimetric method as described by Saura-Calixto and Goñi<sup>34</sup> with some modifications. In 96-well multiwell plates were mixed 10µL of each extract and 10µL of Folin–Ciocalteu reagent and let stand for 3min. 200µL of sodium carbonate solution (75g/L) were added, the volume was made up to 250µL with Milli-Q water, mixed and allowed to stand in the dark for 60min. The absorbance was measured at 750nm using a Victor X3 multilabel plate reader (Waltham, Massachusetts, USA) against a standard curve of gallic acid (0–200mg/L). The total phenols content was expressed as µg gallic acid equivalent per 100 mg of dried mushroom (µg GAE/100mg).

### 2.3.3 Determination of free radical scavenging activity by DPPH method.

The antiradical activity was estimated following the procedure reported by Rufián-Henares and Morales<sup>35</sup>. Briefly, 50µL of the sample were mixed with 250µL of DPPH solution (74mg/L in methanol freshly prepared). After incubation for 60 min, the absorbance was measured at 520nm in a Victor X3 multilabel plate reader, (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), maintaining the temperature in the measurement chamber at 30°C. Aqueous solutions of Trolox were used for calibration (0,01–0,1mg/mL). Results were expressed as µM equivalents of Trolox per 100 mg of dried mushroom (µg TE/100 mg).

2.3.4 Determination of free radical scavenging activity by ABTS method. The ABTS assay was conducted as described by Rufián-Henares and Delgado-Andrade<sup>36</sup> with slight modifications. ABTS+. was prepared 12-16h before use by dissolving ABTS 7mM with 2,45mM potassium persulphate, and then diluted in ethanol: water 50:50 to an absorbance of  $0,7 \pm 0,02$ . 20µL of the samples. 280µL of ABTS solution were incubated for 20min in the dark and the absorbance was read at 730nm in the same plate reader. Aqueous solutions of Trolox were used for calibration (0,01–0,1mg/mL). Results were expressed as µM equivalents of Trolox per 100mg of dried mushroom (µg TE/100mg).

2.3.5 Determination of ferric reducing antioxidant power (FRAP). The ferric reducing ability of the extract of each sample was estimated following the procedure described by Rufián-Henares and Delgado-Andrade<sup>36</sup>. 280µL of FRAP reagent freshly prepared and heated at 37°C, was mixed with 20µL of sample. The FRAP reagent contained 2,5mL of a 10 mM TPTZ solution in 40mM HCl plus 2,5mL of 20mM FeCl<sub>3</sub> and 25mL of 0,3M acetate buffer, pH 3,6. The samples were incubated at 37°C for 30min in the dark and the absorbance was read at 595nm in the same plate reader. Aqueous solutions of Trolox were used for calibration (0,01–0,1mg/mL). Results were expressed as µM equivalents of Trolox per 100mg of dried mushroom (µg TE/100 mg).

## 2.4 Dietary fiber content

Dietary fiber (insoluble and soluble fractions) was determined according to the AOAC Method 991.43<sup>2</sup>, which is an enzymatic-gravimetric procedure<sup>37</sup>. In brief, triplicate samples of dried lyophilized mushrooms undergo sequential enzymatic digestion by heat stable  $\alpha$ -amylase, protease and amyloglucosidase to remove starch and protein. For insoluble (IDF) and soluble dietary fiber (SDF), enzyme digestate was filtered and residue (IDF) was washed with warm water, dried and weighed. For SDF, combined filtrate and washed were precipitated with alcohol, filtered, dried and weighed. IDF and SDF residues values were calculated by subtracting protein, ash and blank values. Total dietary fiber was calculated by the sum of SDF and IDF and the results were expressed in % dry matter.

## 2.5 $\beta$ -glucan content

The  $\beta$ -glucan content of the freeze-dried mushrooms was determined using a Mushroom and Yeast Beta-Glucan Assay kit K-YBGL 09/14 (Megazyme International, Wicklow, Ireland) according to the manufacturer's protocol. The enzyme kit contains exo-1,3- $\beta$ -glucanase,  $\beta$ -glucosidase, amyloglucosidase and invertase; glucose determination reagent (glucose oxidase peroxidase, and 4- aminoantipyrine), and glucose standard solution. Measurement of total glucan content was conducted by hydrolyzing the samples with 37% hydrochloric acid (v/v) for 45min at 30°C followed by 2 additional hours at 100°C. Subsequent to neutralization with 2M potassium hydroxide, glucose hydrolysis was performed using a mixture of exo-1,3- $\beta$ -glucanase and  $\beta$ -glucosidase in sodium acetate buffer (pH 5,0) for 1 hour at 40°C. The  $\alpha$ -glucan content was determined with KOH (2M) in an ice water bath for 20min and following enzymatic hydrolysis with amyloglucosidase and invertase for 30min at 40°C. The absorbance of the resulting color complex was measured at 510 nm using a spectrophotometer (Genesys 10 UV scanning 335906-02, Thermo Electron Corporation, Wisconsin, USA). The  $\beta$ -glucan content was calculated by subtracting the  $\alpha$ -glucan content from the total glucan content. Glucan content was expressed as percentage (w/w) of mushroom dry weight.

## 2.6. Statistical analysis

All determinations were carried out in triplicate and all data are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). The experimental data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's HSD test. The level of statistical significance was set at  $p < 0,05$ . Pearson's correlation coefficient ( $r$ ) was used to calculate the relationship between the total phenols contents and the antioxidant activity values (DPPH, FRAP and ABTS assays) of the mushrooms. The difference was considered statistically significant at the level of  $p < 0,01$ . Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for data analyses.

### 3. Results and discussion

#### Proximate composition

The proximate composition of the studied edible mushrooms is shown in Table 2.

Mushrooms presented a high moisture content that ranges between 78,34g/100g in GL and 92,72g/100g in AB. It depends on the mushroom species and other parameters related to harvest conditions like humidity, substrate, flush, growth and storage conditions<sup>38</sup>. GL, the least humid one, showed 78% water, which means 10% less in moisture content than other edible mushrooms due to his woody structure<sup>39</sup>. Our results agree with those from others authors such as Deepalakshmi and Mirunalini<sup>40</sup> in PO, Khan and Amin<sup>41</sup> in *Pleurotus spp.*, or Carneiro and Ferreira<sup>42</sup> in LE. Related to the ash content, a high value in PO (10,73g/100g) was observed. The lowest ash content was found in GL, (2,2g/100g), which were similar to results reported by Mau and Chao<sup>43</sup> and Cheung<sup>17</sup> (1,77 and 1,7g / 100g respectively).

In this study, the low fat content in the mushrooms ranged from 1,67 g/100 g in ABp to 6,34g/100 g in PO according to Rahi and Malik<sup>44</sup>, with a range from 1,1 to 8,3g/100. However, PO presented a higher fat value (6,34g/100g) than mushrooms studied by other authors, such as Cheung<sup>25</sup>, in 2013, who found a range between 1,6 and 2,2%, and Prasad and Rathore<sup>45</sup>, with a fat content of 1,4%. This discrepancies may be due to the difference in the substrate or strain used in PO cultivation<sup>46</sup>. Moreover, PO contains fat having good quantity of unsaturated fatty acids, at least, 72% of the total fatty acids were found to be unsaturated in mushrooms, thus making mushrooms a health food as they are essential in our diet, whereas saturated fatty acids may be harmful to our health<sup>47</sup>.

HU, ABp and PC showed the highest level of protein in our study ranging between 12,25g/100g in LE and 36,65g/100g in HU. Mattila and Suonpää<sup>48</sup>, reported that mushrooms are quite high in protein (19–35%). In the same way, Rahi and Malik<sup>44</sup>, explained that the protein content of edible mushrooms, in general, is about twice that of asparagus and cabbage and 4 times and 12 times those of oranges and apples, respectively. On dry weight basis, mushrooms normally contain 19-35% protein, as compared to 7,3% in rice, 13,2% in wheat, 39,1% in soybean, and 25,2% in milk. Therefore, considering the content of crude protein, mushrooms rank below most animal meat but well above most other foods, including milk<sup>49</sup>. Mushrooms also contain relatively large amounts of carbohydrate ranging from 51 to 88% (dry weight) for the major cultivated species<sup>50</sup>. In this study has been observed a range between 48,25 and 78,53g/100g. Carbohydrates, were the most abundant macronutrients and the highest levels were found in LE (78,53g/100g), like occurred in the study of Reis and Barros<sup>51</sup>. Related to mushrooms within the same variety, significant differences were appreciated in the proximal composition. PO and PE, being the same genus but different species, showed significant differences in all the parameters studied. PC was similar to PO in fat and carbohydrates but significantly different from PE. Furthermore,

HTg and HTw, being the same specie but different variety showed the same moisture, fat and carbohydrate values. The same occurred with AB and ABp that did not show differences except in ash and fat. The variability of chemical composition among mushrooms might be related to several factors that occur during growth and storage such as environmental temperature or relative humidity<sup>52</sup>. Furthermore, for cultivated mushrooms, the type and amount of compost and fertilizer used can also influence the results<sup>53</sup>. Mushroom quality is also influenced by other parameters such as the stage of development and pre and post-harvest conditions. All these interfering factors justify the variability in composition data published by different authors<sup>5</sup>, in addition to the intraspecific genetic variability of mushrooms from different geographic origins and producers.

Owing to the very high moisture content, mushrooms are basically a low calorie foods (from 366 to 412kcal/100g in ABp and GA respectively) and this fits well in this era of healthy eating by reducing the intake of calories<sup>54</sup>.

#### Antioxidant activity:

The results of antioxidant activity, expressed in dry weight, are showed in Table 3. HT mushrooms, which only differ in variety and color, grey (HTg) and white (HTw) strains, had the lowest values in total phenolics (86,60 and 63,57 $\mu$ g EQ gálico/100 mg respectively) as well as in antioxidant activity, being DPPH 0,53 and 0,28 $\mu$ mol EQ Trolox TE/100mg respectively, in ABTS (0,38 $\mu$ mol EQ Trolox TE/100mg both mushrooms) and FRAP (0.50 and 0,52 $\mu$ mol EQ Trolox TE/100mg respectively). However, HU, being the same genus, showed the highest values in total phenol content, (286,93 $\mu$ g EQ gálico/100 mg). Babu and Rao<sup>55</sup>, studied the antioxidant capacity of HU and they found that the highest content of total phenols might account for the highest antioxidant activities in terms of DPPH, radical scavenging ability, and FRAP, the ability to reduce ferric ions.

However, in our study, HU had the highest values in total phenols, without significant differences with PC, but not the highest ones in antioxidant activity measured by ABTS, DPPH and FRAP methods. The values were similar to other studies like those of Premkumari and Shivashankar<sup>57</sup> or Usha and Suguna<sup>14</sup>. Besides, HU antioxidant activity are much higher than those reported by Babu and Rao<sup>55</sup>. These discrepancies between studies may be because of the difference in the extraction procedures employed; in our study, methanolic and aqueous-acetone extracts were obtained by Babu and Rao<sup>55</sup> extracted with ethanol and diluted in methanol.

AA, ABp and AB presented the highest values in DPPH (2.40, 2.38 and 2.09 $\mu$ g TE /100 mg), ABTS (4,65, 3,88 and 1,26 $\mu$ mol TE / 100 mg) and FRAP (2,77, 2,38 and 1,709 $\mu$ mol TE / 100 mg); showing AB significant differences with ABp mushrooms although they are the same species. According to our results, Dubost and Ou<sup>56</sup> obtained the highest values of antioxidant activity in *Agaricus* species, especially in ABp. Although DPPH and ABTS measured the scavenging activity of free radicals with

different radicals, we have found similar tendency, with a maintenance in the highest and smallest values obtained by both methods. In addition, FRAP method, which measured the capacity to avoid electron transfer, lead to the same tendency in the thirteen mushroom studied.

AB and PO, the mushrooms most consumed worldwide, have been thoroughly studied. Rajarathnam and Shashirekha<sup>58</sup> investigated the phenolic compounds present in AB and PO fresh mushrooms and found the phenolic content about three times higher in AB (0,4mg/g) than in PO (1,2mg/g), according to other studies<sup>51,59</sup>. However, in this study, it has been observed that the phenolic content in both mushrooms was similar without significant differences (177µg EQ gálico/100 mg in AB and 175µg EQ gálico/100 mg in PO), maybe due to the difference in the PO strain which lead to an improvement in the regular total phenols quantity<sup>60-62</sup>.

Other highly consumed and globally produced mushrooms are PE and LE. Our results agree with those formed in Chinese and Thailand mushrooms<sup>15,63</sup>, which showed that the highest content of total phenols in mushrooms might account for the greatest antioxidant activity, reducing power and scavenging abilities, being these values higher in PO than in PE and LE.

Statistically significant relationships were also observed between total phenolics and antioxidant activity of plant materials like flaxseed products ( $R^2=0,963$ ;  $p < 0,001$ ) and cereal products ( $R^2=0,905$ ;  $p < 0,001$ )<sup>11</sup>. In general, a correlation between higher antioxidant activity and larger amount of total phenolics was also found in mushrooms, and these results indicated that there was a positive and significant ( $p < 0,01$ ) relationship between them. We found a positive correlation between total phenolics and DPPH ( $R^2=0,529$ ), between total phenolics and ABTS ( $R^2=0,386$ ) and between total phenolics and FRAP ( $R^2= 0,692$ ). It has been confirmed the relation between these parameters in the studied mushrooms, being higher in FRAP, which avoids the electron transfer, than in scavenging activity of free radicals (DPPH and ABTS), although all of them with significance level of  $p < 0,01$ .

Our results agree with Cheung<sup>63</sup>, Dubost<sup>56</sup> or Kettawan<sup>64</sup> reports, in which a high polyphenol content increased the antioxidant activity with a positive correlation between the total phenolic and DPPH, ABTS and FRAP content in the mushroom. Therefore, total phenols might be responsible for the antioxidant properties shown.

#### Dietary fiber content

There is large variation in the DF content of mushrooms among different species (Table 4).

In all mushrooms, the IDF contents (from 24,26 to 68,40g/100g in ABp and GL respectively) were significantly higher than those of SDF (0,68g/100g in GL to 7,44g/100g in LE). TDF is constituted mainly by IDF, which help to increase fecal bulk

and reduce gastrointestinal transit time (Howarth et al., 2001), while the level of SDF is usually less than 10% dry matter<sup>25</sup>. In addition, some researchers reported that the quality of DF is determined by its proportion of SDF, which provides a better retention ability and fermentable capacity<sup>65</sup>. Therefore, the higher is the SDF content, with more physiological functions than IDF, the better is the DF quality, being LE, PN and PO mushrooms those with the highest SDF content.

The highest TDF level (69,08g/100g) was observed in GL, and the lowest TDF level (25,47g/100g) in AB. Cheung<sup>25</sup> showed similar results in HE, HT (both, grey and white varieties) and PN. In addition, according to Synytsya<sup>22</sup> the TDF content of four strains of PO and PE widely ranged between 34,5 and 63,1g/100 g in pilei and 38,9g/100 g and 64,8g/100 g in stipes. Di Anibal<sup>66</sup> and Papaspyridi<sup>67</sup> obtained similar dietary fiber results than ours in AB, ABp, PO and LE.

The dietary fiber contents showed evident specificity as to the strains and species. There are not significant differences neither between AB and ABp, nor HU and HT grey and white varieties. However, the genus *Pleurotus* showed differences in PE with PO and PC, but not between PO y PC, with a higher amount of dietary fiber than *Hypsizygus* or AB mushrooms.

According to Rahi and Malik<sup>44</sup>, mushrooms contain 10–50% dietary fiber, except GL with 69% of TDF and 68% of IDT, which is usually consumed in form of tea extract, capsule or tablet as a dietary supplement due to GL is too tough and woody to be edible<sup>68</sup>.

### Glucan content

The fruit bodies contained small amounts of  $\alpha$ -glucans from 0,52g/100g in GL to 5,61g/100g in PN. They are usually low in commonly cultivated mushrooms, less than approximately 10%<sup>22,69</sup>. Despite its low quantity,  $\alpha$ -glucans in mushroom cell walls increase insulin sensitivity, thus exerting an anti-diabetic effect<sup>70</sup>. The contents of  $\beta$ -glucans were from 7,71 in AB and 7,96g/100 g in ABp without significant differences, to 40,64g/100g in PE.

The glucan contents, (Table 5), significantly differed between the species of *Pleurotus*, but not in the species and varieties of *Agaricus*, with the smallest values; and HT grey and white strains (27,94 and 26,01g/100g respectively), just as in dietary fiber. The highest amount of  $\beta$ -glucans has been found in PE, followed by LE (37,45g/100g) and PN (37,35g/100g) without significant differences between them.

The  $\beta$ -glucan content of several mushroom have been studied using dry mushroom powder in their  $\beta$ -glucan extraction procedure like Papaspyridi<sup>67</sup>, with values of 1% in  $\alpha$ -glucans and 29,9% in  $\beta$ -glucans in the fruiting body of *P. ostreatus*. Other results indicated that the  $\beta$ -glucan content in LE, PE and AB are 20, 28 and 11mg/100mg respectively<sup>71,72</sup>.

McCleary and Draga<sup>69</sup> and Sari<sup>27</sup>, screened several mushroom species with the Megazyme<sup>73</sup> assay agreeing with our results in AB, ABp, GL, LE, PC, PE and PO.

The experimental data are comparable to those reported in bibliography bearing in mind that the specific and characteristic composition of each mushroom may be associated with the environmental factors of their growing and harvest conditions<sup>59</sup>. It has been demonstrated that the strain types, growth conditions or the degree of fruiting body maturity may change the results. For example, Synytsya<sup>22</sup>, showed a wide amount of  $\beta$ -glucan content in different strains of PE and PO mushrooms. In addition, Sharma<sup>46</sup>, obtained different  $\beta$ -glucan results in the same strains of PO and PE with different agricultural waste substrates.

#### 4. Conclusions

In conclusion, the 13 varieties of mushroom cultivated in La Rioja proved to have low fat, high fiber and  $\beta$ -glucan content and antioxidant properties in terms of total polyphenol content, scavenging activity (DPPH and ABTS), and ferric reducing antioxidant power (FRAP). The results indicate that HU, PC, AA, ABp and AB are promising mushrooms with excellent antioxidant potential and can be used as source of natural antioxidants.

Genus like *Pleurotus*, *Agaricus* or *Hypsizygus* showed statistical differences in their proximate composition and morphological and antioxidant characteristics in spite of being the same species or cultivars varieties.

This study suggests that mushrooms show favorable dietetic properties thanks to their low caloric value, low fat content, and high levels of proteins, minerals, and the main representative polysaccharides,  $\beta$ -glucans together with a great antioxidant activity. The presence of these polysaccharides further upholds the interest in exploring these mushrooms for applications in health-related fields.

Acknowledgements: This research was financed by the Department of Industry, Innovation and Employment of La Rioja and the Economic Development Agency of La Rioja (ADER).



TABLES

**Table 1.** Scientific and common names of selected mushrooms cultivated in La Rioja.

Scientific name	Common name	Abbreviation
<i>Agrocybe aegerita</i>	Chestnut Mushroom, poplar mushroom	AA
<i>Agaricus bisporus</i>	White mushroom	AB
<i>Agaricus brunnescens</i>	Portobello	ABp
<i>Ganoderma lucidum</i>	Reishi, Lingzhi	GL
<i>Hericium erinaceus</i>	Lion's Mane Mushroom, pom-pom	HE
<i>Hypsizygus tessulatus grey</i>	Shimeji	HTg
<i>Hypsizygus tessulatus white</i>	Shimeji	HTw
<i>Hypsizygus ulmarius</i>	Elm oyster	HU
<i>Lentinula edodes</i>	Shiitake	LE
<i>P. cornucopiae</i> (var. <i>citrinopileatus</i> )	Golden oyster mushroom	PC
<i>Pleurotus eryngii</i>	King Oyster Mushroom	PE
<i>Pholiota nameko</i>	Nameko	PN
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Oyster mushroom	PO

**Table 2.** Proximate composition of selected mushroom species cultivated in La Rioja, Spain. <sup>a)</sup>

	Moisture (g/100g)	Ash <sup>b)</sup> (g/100g)	Fat b) (g/100g)	Protein b) (g/100g)	Carbohydrates <sup>b)</sup> (g/100g)	Energy <sup>b)</sup> (kcal/100g)
AA	90,45±0,13 <sup>gh</sup>	7,36±0,15 <sup>c</sup>	3,42±0,41 <sup>abc</sup>	19,16±0,34 <sup>d</sup>	70,73±1,60 <sup>defg</sup>	387,18±1,41 <sup>bcd</sup>
AB	92,97±0,03 <sup>j</sup>	10,12±0,02 <sup>e</sup>	3,82±0,13 <sup>abc</sup>	18,82±0,03 <sup>cd</sup>	67,23±0,05 <sup>cde</sup>	378,54±0,76 <sup>bc</sup>
ABp	88,71±1,26 <sup>de</sup>	10,40±0,01 <sup>ef</sup>	1,67±0,11 <sup>a</sup>	27,82±0,28 <sup>f</sup>	60,12±0,21 <sup>b</sup>	366,75±0,53 <sup>a</sup>
GL	78,34±0,07 <sup>a</sup>	2,20±0,07 <sup>a</sup>	4,24±0,15 <sup>bcd</sup>	16,19±0,42 <sup>bc</sup>	77,37±0,33 <sup>gh</sup>	412,40±0,96 <sup>e</sup>
HE	87,14±0,13 <sup>bc</sup>	7,75±0,14 <sup>c</sup>	3,56±0,43 <sup>abc</sup>	15,27±0,02 <sup>b</sup>	73,23±0,21 <sup>efgh</sup>	386,30±2,57 <sup>bcd</sup>
HTg	90,33±0,05 <sup>g</sup>	7,54±0,24 <sup>c</sup>	4,18±0,67 <sup>bcd</sup>	19,34±0,13 <sup>d</sup>	69,09±1,67 <sup>def</sup>	389,98±2,43 <sup>cd</sup>
HTw	89,69±0,08 <sup>fg</sup>	8,99±0,19 <sup>d</sup>	2,80±0,28 <sup>abc</sup>	22,31±0,05 <sup>e</sup>	65,96±0,08 <sup>bcd</sup>	377,51±2,60 <sup>ab</sup>
HU	89,11±0,09 <sup>ef</sup>	10,17±0,09 <sup>ef</sup>	5,08±0,38 <sup>cd</sup>	36,65±0,10 <sup>g</sup>	48,25±0,31 <sup>a</sup>	384,70±1,28 <sup>bc</sup>
LE	90,03±0,09 <sup>g</sup>	6,36±0,04 <sup>b</sup>	2,79±0,24 <sup>abc</sup>	12,25±0,06 <sup>a</sup>	78,53±0,21 <sup>h</sup>	388,63±1,20 <sup>bcd</sup>
PO	91,42±0,10 <sup>j</sup>	10,73±0,06 <sup>f</sup>	6,34±0,81 <sup>d</sup>	23,01±0,11 <sup>e</sup>	60,38±0,88 <sup>bc</sup>	388,60±3,76 <sup>bcd</sup>
PE	86,83±0,09 <sup>b</sup>	5,98±0,04 <sup>b</sup>	1,86±0,72 <sup>ab</sup>	17,79±0,00 <sup>bcd</sup>	74,40±0,65 <sup>fgh</sup>	385,38±3,84 <sup>bcd</sup>
PC	88,05±0,33 <sup>cd</sup>	8,48±0,02 <sup>d</sup>	6,07±0,03 <sup>d</sup>	26,61±0,14 <sup>f</sup>	58,84±0,24 <sup>bc</sup>	396,41±0,29 <sup>d</sup>
PN	91,27±0,14 <sup>hi</sup>	6,43±0,12 <sup>b</sup>	2,03±0,67 <sup>ab</sup>	15,57±0,15 <sup>b</sup>	75,55±0,24 <sup>fgh</sup>	383,98±4,41 <sup>bc</sup>

<sup>a)</sup> The abbreviations of mushrooms and their scientific name are shown in Table 1.

<sup>b)</sup> Results expresses in dry weight.

**Table 3.** Antioxidant activity ( $\mu\text{mol TE}/100 \text{ mg dry weight}$ ) and total phenolics ( $\mu\text{g GAE}/100 \text{ mg dry weight}$ ) in mushrooms cultivated in La Rioja <sup>a)</sup>

Mushrooms	Total Phenolics	DPPH	ABTS	FRAP
	$\mu\text{g EQ g\acute{a}lico}/100 \text{ mg}$	$\mu\text{mol EQ Trolox TE}/100\text{mg}$	$\mu\text{mol EQ Trolox TE}/100\text{mg}$	$\mu\text{mol EQ Trolox TE}/100\text{mg}$
<b>AA</b>	253,50 $\pm$ 3,65 <sup>f</sup>	2,40 $\pm$ 0,01 <sup>i</sup>	4,65 $\pm$ 0,13 <sup>f</sup>	2,77 $\pm$ 0,04 <sup>f</sup>
<b>AB</b>	177,18 $\pm$ 1,24 <sup>e</sup>	2,09 $\pm$ 0,02 <sup>h</sup>	1,26 $\pm$ 0,04 <sup>bc</sup>	1,71 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>
<b>Abp</b>	252,48 $\pm$ 3,66 <sup>f</sup>	2,38 $\pm$ 0,002 <sup>i</sup>	3,88 $\pm$ 0,04 <sup>e</sup>	2,38 $\pm$ 0,03 <sup>e</sup>
<b>GL</b>	141,72 $\pm$ 1,76 <sup>d</sup>	1,90 $\pm$ 0,03 <sup>g</sup>	1,47 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>	0,97 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>
<b>HE</b>	169,57 $\pm$ 5,73 <sup>e</sup>	1,77 $\pm$ 0,12 <sup>f</sup>	2,46 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>	2,45 $\pm$ 0,06 <sup>e</sup>
<b>HTg</b>	86,59 $\pm$ 2,11 <sup>b</sup>	0,53 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	0,38 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,50 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
<b>HTw</b>	63,57 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup>	0,28 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,38 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,52 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
<b>HU</b>	286,93 $\pm$ 3,97 <sup>g</sup>	1,83 $\pm$ 0,02 <sup>f</sup>	0,52 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,97 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
<b>LE</b>	96,78 $\pm$ 1,89 <sup>b</sup>	0,97 $\pm$ 0,01 <sup>e</sup>	1,18 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,73 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
<b>PO</b>	175,53 $\pm$ 5,31 <sup>e</sup>	0,75 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>	2,69 $\pm$ 0,04 <sup>d</sup>	1,58 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>
<b>PE</b>	115,50 $\pm$ 2,78 <sup>c</sup>	0,64 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	1,17 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,62 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>
<b>PC</b>	274,72 $\pm$ 5,18 <sup>g</sup>	0,70 $\pm$ 0,01 <sup>cd</sup>	0,54 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	2,41 $\pm$ 0,03 <sup>e</sup>
<b>PN</b>	98,28 $\pm$ 1,49 <sup>b</sup>	0,66 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	0,41 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,58 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>

<sup>a)</sup> Different letters within a column indicate significant differences between samples of mushrooms ( $P < 0,05$ ). Total phenolic: Folin-Ciocalteu assay ( $\mu\text{g}$  equivalent gallic acid GAE/100mg); DPPH: scavenging activity assay, ABTS: radical scavenging activity assay and FRAP: Ferric reducing antioxidant power assay. TE: Trolox.

**Table 4.** Dietary fiber and fractions in cultivated mushrooms cultivated in La Rioja (% dry matter). <sup>a)</sup>

Mushrooms	IDF	SDF	TDF
<b><i>Agrocybe aegerita (AA)</i></b>	35,65 $\pm$ 0,16 <sup>e</sup>	5,00 $\pm$ 0,14 <sup>c</sup>	40,66 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>
<b><i>Agaricus bisporus (AB)</i></b>	24,75 $\pm$ 0,24 <sup>ab</sup>	0,72 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	25,47 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
<b><i>Agaricus brunnescens (portobello) (ABp)</i></b>	24,26 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>	4,68 $\pm$ 0,18 <sup>bc</sup>	28,93 $\pm$ 0,81 <sup>a</sup>
<b><i>Ganoderma lucidum (GL)</i></b>	68,40 $\pm$ 0,62 <sup>g</sup>	0,68 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	69,08 $\pm$ 0,35 <sup>e</sup>
<b><i>Hericium erinaceus (HE)</i></b>	34,67 $\pm$ 0,23 <sup>e</sup>	5,56 $\pm$ 0,20 <sup>cd</sup>	40,23 $\pm$ 0,09 <sup>c</sup>
<b><i>Hypsizygus tessulaatus grey (HTg)</i></b>	28,27 $\pm$ 0,24 <sup>abc</sup>	4,94 $\pm$ 0,08 <sup>bc</sup>	33,21 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>
<b><i>Hypsizygus tessulatus white (HTw)</i></b>	28,81 $\pm$ 0,18 <sup>bc</sup>	5,28 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>	34,09 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>
<b><i>Hypsizygus ulmarius (HU)</i></b>	30,08 $\pm$ 0,63 <sup>cd</sup>	4,08 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	34,16 $\pm$ 0,72 <sup>b</sup>
<b><i>Lentinula edodes (LE)</i></b>	39,80 $\pm$ 1,60 <sup>f</sup>	7,44 $\pm$ 0,36 <sup>f</sup>	47,24 $\pm$ 1,33 <sup>d</sup>
<b><i>Pleurotus ostreatus (PO)</i></b>	33,69 $\pm$ 0,75 <sup>de</sup>	6,75 $\pm$ 0,10 <sup>ef</sup>	40,44 $\pm$ 0,84 <sup>c</sup>
<b><i>Pleurotus eryngii (PE)</i></b>	27,19 $\pm$ 0,48 <sup>abc</sup>	6,36 $\pm$ 0,16 <sup>de</sup>	33,55 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>
<b><i>Pleurotus citrinopileatus (PC)</i></b>	34,58 $\pm$ 0,35 <sup>e</sup>	5,51 $\pm$ 0,38 <sup>cd</sup>	40,09 $\pm$ 0,20 <sup>c</sup>
<b><i>Pholiota nameko (PN)</i></b>	37,25 $\pm$ 2,40 <sup>ef</sup>	7,05 $\pm$ 0,09 <sup>ef</sup>	44,30 $\pm$ 2,44 <sup>cd</sup>

a) Different letters within a column indicate significant differences between mushrooms (P < 0,05). IDF: Insoluble Dietary Fiber; SDF: Soluble Dietary Fiber; TDF: Total Dietary Fiber

a) **Table 5.** Composition of glucans mushrooms cultivated in La Rioja (% dry matter).

Mushrooms	Total Glucans	$\alpha$ -glucans	$\beta$ -glucans
<i>Agrocybe aegerita</i> (AA)	32,82±1,13 <sup>f</sup>	2,43±0,06 <sup>f</sup>	<b>30,39±1,19<sup>e</sup></b>
<i>Agaricus bisporus</i> (AB)	12,39±0,54 <sup>a</sup>	4,68±0,08 <sup>h</sup>	<b>7,71±0,47<sup>a</sup></b>
<i>Agaricus brunnescens</i> (portobello) (ABp)	11,04±0,22 <sup>a</sup>	3,08±0,05 <sup>g</sup>	<b>7,96±0,19<sup>a</sup></b>
<i>Ganoderma lucidum</i> (GL)	24,40±0,28 <sup>d</sup>	0,52±0,04 <sup>a</sup>	<b>23,89±0,25<sup>c</sup></b>
<i>Hericium erinaceus</i> (HE)	16,90±0,13 <sup>b</sup>	1,84±0,07 <sup>de</sup>	<b>15,06±0,19<sup>b</sup></b>
<i>Hypsizygus tessulaatus grey</i> (HTg)	28,94±0,82 <sup>e</sup>	1,01±0,003 <sup>b</sup>	<b>27,94±0,82<sup>de</sup></b>
<i>Hypsizygus tessulatus white</i> (HTw)	28,07±0,45 <sup>e</sup>	2,07±0,02 <sup>e</sup>	<b>26,01±0,45<sup>cd</sup></b>
<i>Hypsizygus ulmarius</i> (HU)	16,58±0,19 <sup>b</sup>	3,28±0,02 <sup>g</sup>	<b>13,30±0,18<sup>b</sup></b>
<i>Lentinula edodes</i> (LE)	38,82±0,60 <sup>g</sup>	1,36±0,01 <sup>c</sup>	<b>37,45±0,60<sup>f</sup></b>
<i>Pleurotus ostreatus</i> (PO)	26,72±0,82 <sup>de</sup>	1,61±0,04 <sup>d</sup>	<b>25,11±0,78<sup>cd</sup></b>
<i>Pleurotus eryngii</i> (PE)	45,77±0,35 <sup>h</sup>	5,13±0,04 <sup>i</sup>	<b>40,64±0,39<sup>g</sup></b>
<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (PC)	20,46±0,26 <sup>c</sup>	4,90±0,06 <sup>hi</sup>	<b>15,56±0,28<sup>b</sup></b>
<i>Pholiota nameko</i> (PN)	42,96±0,44 <sup>h</sup>	5,61±0,05 <sup>j</sup>	<b>37,35±0,44<sup>f</sup></b>

a) Different letters within a column indicate significant differences between samples of mushrooms (P < 0,05).

## REFERENCES

1. AOAC (2000) Official methods of analysis (16<sup>th</sup> edn) In: Arlington VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.
2. AOAC (2007) Method 991.43. Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fibre in Foods. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC.
3. Barros L, Baptista P, Correia DM, Casal S, Oliveira B, and Ferreira I.C.F.R. Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry*. 2007. vol. 105, no. 1, pp. 140–145.
4. Mau J. The umami taste of edible and medicinal mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2005;7:119-124.
5. Manzi P, Gambelli L, Marconi S, Vivanti V and Pizzoferrato L. Nutrients in edible mushroom: An inter-species comparative study. *Food Chemistry*. 1999;65:477-482.
6. Manzi P, and Pizzoferrato L. Beta glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*. 2000;68:315–318.
7. Al-Saikhan MS, Howard LR, Miller JC Jr. Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum*, L.). *J. Food Sci*. 1995;60 (2):341-343.
8. Yen GC, Duh PD. Antioxidant activity of methanolic extracts of peanut hulls from various cultivars. *J. Am. Oil Chem. Soc*. 1995;72 (9):1065-1067.
9. Oomah, B D.; Mazza, G. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. *J. Agric. Food Chem*. 1996; 44 (7):1746- 1750.
10. Cao G.; Sofic E, Prior R. L. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem*. 1996;44:3426- 3431.
11. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, and Oomah BD. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J. Agric. Food Chem*. 1998;46:4113-4117.
12. Dimitrijevic M, Jovanovic VS., Cvetkovic J, Mihajilov-Krstev T, Stojanovic G, and Mitic V. Screening of antioxidant, antimicrobial and antiradical activities of twelve selected Serbian wild mushrooms. *Anal. Methods*. 2015;7:4181-4191.
13. Yen GC. and Chen HY.. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem*. 1995;43:27-32.
14. Usha S. and Suguna V. Antioxidant Activity in Terms of Total Phenol and Reducing Power of Two Strains of *Hypsizygus ulmarius* CO2 and IIHR Hu1. (2014). *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 2014;27(1), 59:325-327.
15. Yang JH, Lin HC, and Mau JL. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry* 2002;77:229–235.

16. Cheung PC. Dietary Fibre Content and Composition of Some Edible Fungi Determined by Two Methods of Analysis. *J Sci Food Agric.* 1997;73:255-260.
17. Howarth NC, Saltzman E, Roberts SB. Dietary fiber and weight regulation. *Nutrition Reviews* 2001;59:129-139.
18. Ferguson LR, Robertson AM, Watson ME, Triggs CM, Harris PJ. The effects of a soluble-fibre the adsorption of carcinogens fibres polysaccharide on to insoluble dietary. *Chem Biol Interact.* 1995;95:245–255.
19. Bourquin LD, Titgemeyer EC, Fahey GC. Fermentation of various dietary fiber sources by human fecal bacteria. *Nutr Res.* 1996;16:1119–1131.
20. Nawirska A, Kwasniewska M. Dietary fibre fractions from fruit and vegetable processing waste. *Food Chem.* 2005; 91:221–225.
21. Rop O, Mlcek J, and Jurikova T.. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews.* 2009;67(11):624–631.
22. Synytsya A, Míčková K, Jablonský I, Sluková M, Čopíková J. Mushrooms of genus *Pleurotus* as a source of dietary fibres and glucans for food supplements. *Czech Journal of Food Science.* 2008;26:441–446.
23. Zhu F, Du B, Bian Z. and Xu B. () Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities. *Journal of Food Composition and Analysis* 2015;41:165-173.
24. Wu JY. Polysaccharide-Protein Complexes from Edible Fungi and Applications. *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology.* 2015; 927-937.
25. Cheung PCK. Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness.* 2013; 2(3–4):162–166.
26. Kiho T, Morimoto, H, Sakushima M, Usui S, and Ukai, S. Polysaccharides in fungi. XXXV. Anti diabetic activity of an acidic polysaccharide from the fruiting bodies of *Tremella aurantia*. *Biol. Pharm. Bull.* 1995;18:1627-1629.
27. Sari M, Prange A, Lelley J I., Hambitzer R. Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. *Food Chemistry.* 2017;216:45-51.
28. Zhang M, Cui SW, Cheung PCK, Wang Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology.* 2007;18:4-19.
29. Wasser SP. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences and challenges. *Biomedical Journal.* 2014;3:345–356.
30. Crisan, EV. & Sands A. Nutritional Value. In *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*, ed. S. T. Chang & W. A. Hayes. Academic Press, New York, 1978;137-167.

31. Bano Z, & Rajarathnam S. Pleurotus mushrooms. Part II, nutritional value, post-harvest physiology, preservation and role as human food. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.1988; 27(2):87–158.
32. Roncero-Ramos I, Mendiola-Lanao M, Pérez-Clavijo M, and Delgado-Andrade C. Effect of different cooking methods on nutritional value and antioxidant activity of cultivated mushrooms. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2017;68:287-297.
33. Pérez-Jiménez P and Saura-Calixto F. Literature Data May Underestimate the Actual Antioxidant Capacity of Cereals. *Journal of Agriculture and Food Chemistry; (J. Agric. Food Chem)*. 2005;53:5036-5040.
34. Saura-Calixto F. and Goñi I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*. 2006;94:442-47.
35. Rufián-Henares JA., & Morales FJ. Effect of in vitro enzymatic digestion on antioxidant activity of coffee melanoidins and fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55:10016-10021.
36. Rufián-Henares JA., Delgado-Andrade C. Effect of digestive process on Maillard reaction indexes and antioxidant properties of breakfast cereals. *Food Research International*. 2009;42:394-400.
37. Prosky L, Asp NG, Schweizer TG, Dr Vries JW, Furday I. Determination of insoluble and soluble fiber in food and food products: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem*. 1992;75:360-366.
38. Guillamón E, García- Lafuente A, Lozano M, D´ Arrigo M, Rostagno MA, Villares A, Martínez JA. Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*. 2010;81:715–723.
39. Stamets P, *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Ten Speed Press, Berkeley, California, 1993.
40. Deepalakshmi K, Mirunalini SJ. Pleurotus ostreatus: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *Biochem Tech*. 2014;5(2):718-726.
41. Khan MA, Amin SMR, Uddin MN, Tania M, Alam N. Comparative study of the nutritional composition of oyster mushrooms cultivated in Bangladesh. *Bangladesh J Mushroom*. 2008;2:9-14.
42. Carneiro AA., Ferreira IC, Dueñas M, Barros L, da Silva R, Gomes E, Santos-Buelga C. Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. *Food Chem*. 2013;138(4):2168-2173.
43. Mau JL, Chao GR, & Wu KT. Antioxidant properties of methanolic extract from several ear mushrooms. *Journal Agricultural of Food Chemistry*. 2001;49:5461–5467.
44. Rahi DK and Malik D. *Diversity of Mushrooms and Their Metabolites of Nutraceutical and Therapeutic Significance*. Review. Hindawi Publishing Corporation

Journal of Mycology. 2016. Article ID 7654123, 18 pages.  
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/7654123>.

45. Prasad S, Rathore H, Sharma S, Yadav AS. Medicinal Mushrooms as a Source of Novel Functional Food. (Int J Food Sci Nutr Diet.) International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics (IJFS) 2015; 04(5):221-225.
46. Sharma AK, Shrivastav A. and. Jana AM. Study on cultivation of Pleurotus spp. On different agricultural waste substrate and its nutraceuticals analysis. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2016;5(10):1041-1054.
47. Mattila P, Lampi AM, Ronkainen R, Toivo J, Piironen V. Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. Food Chemistry. 2002;76:293-298.
48. Mattila P, Suonpää K, and Piironen V. "Functional properties of edible mushrooms," Nutrition. 2000; vol. 16, no. 7-8:694–696.
49. Chang ST. and. Miles P. G. "The nutritional attributes and medicinal value of edible mushrooms," in Edible Mushrooms and Their Cultivation. 1993:27–39, CRC Press.
50. Kalac P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. J Sci Food Agric 2013;93:209–218.
51. Reis FS, Barros L, Martins A, Ferreira ICFR. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. Food and Chem Toxicol. 2012;50(2):191-7.
52. Ouzouni, PK, Petridis D, Koller WD, Riganakos KA. Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece," Food Chemistry. 2009;vol. 115, 4:1575–1580.
53. Park YK, Ikegaki M, Alencar SM, Aguiar AL. Determinação da concentração de  $\beta$ -glucano em cogumelo *Agaricus blazei* Murill por método enzimático. Cienc. Tecnol. Aliment. 2003;23:312-316.
54. Rai RD. Chapter 21 Production of Edible Fungi. BOOK: Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications.2003. Edit by Dilip K. Arora, CRC Press.
55. Babu DR, Rao GN. Antioxidant properties and electrochemical behavior of cultivated commercial Indian edible mushrooms. Journal of food science and technology *J Food Sci Technol*. 2013;50 (2):301-308.
56. Dubost NJ., Ou B, Beelman RB. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*. 2007;105:727–735.
57. Premkumari B and Shivashankar M. Study on invitro free radical scavenging activity of *Hypsizygus ulmarius* mushroom. *J. Chem. Pharm. Res*. 2014;6(6):501-507.

58. Rajarathnam S, Shashirekha MN, and Rashmi S. Biochemical changes associated with mushroom browning in *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach and *Pleurotus florida* (Block & Tsao): commercial implications. *J Sci Food Agric* 2003;83:1531–1537.
59. Palacios I, Lozano M, Moro C, D'Arrigo M, Rostagno MA, Martínez JA, García-Lafuente A, Guillamón E, Villares A. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*. 2011;128:674–678.
60. Tajalli F, Malekzadeh K, Soltanian H, Janpoor J. Antioxidant capacity of several Iranian, wild and cultivated strains of the button mushroom. *Braz. J. Microbiol.* 2015; 46(3):769-776.
61. Ghahremani-Majd H, Dashti F. Chemical composition and antioxidant properties of cultivated button mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Hort Environ Biotechnol.* 2015; 56(3):376–382.
62. Rezaeian S-H., Saadatmand S. NejadSattari T. and Mirshamsi A. Antioxidant potency of Iranian newly cultivated wild mushrooms of *Agaricus* and *Pleurotus* species. *Biomed. Res.* 2015;26:534- 542.
63. Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry* 2003;81:249–255.
64. Kettawan A, Chanlekha K, Kongkachuichai R, and Charoensiri R. Effects of Cooking on Antioxidant Activities and Polyphenol Content of Edible Mushrooms Commonly Consumed in Thailand. *Pakistan Journal of Nutrition (Pak. J. Nutr.)*. 2011;10 (11):1094-1103.
65. Xie BX, Li AP. Dietary fibre. Science Press, Beijing, 2006.
66. Di Anibal C, Farenzena S, Susana Rodríguez MS. and Albertengo L. Chemical composition and nutritional value of Argentine commercial edible mushrooms *Journal of Consumer Protection and Food Safety. J. Verbr. Lebensm.* 2015;10:155–164.
67. Papaspyridi LM., Katapodis P, Gonou-Zagou Z, Kapsanaki-Gotsi E. and Christakopoulos P. Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. *Biochemical Engineering Journal* 2010;50:131–138.
68. Yuen JWM & Gohel MDI. Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: a review of scientific evidence. *Nutrition and Cancer*. 2005;53(1):11-17.
69. McCleary B V., & Draga A. Measurement of b-glucan in mushrooms and mycelial products. *Journal of AOAC International*. 2016; 99:364–373.
70. Zhang P, Cheung PC. Evaluation of sulfated *Lentinus edodes* alpha-(1→3)-D-glucan as a potential antitumor agent. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002;66:1052-6.
71. Gil-Ramirez A, Clavijo C, Palanisamy M, Soler-Rivas C, Ruiz-Rodriguez A, Marín FR, Reglero G, Pérez M. Edible mushrooms as potential sources of new hypocholesterolemic compounds. In: *Proceedings of the 7th International Conference*



on Mushroom Biology and Mushroom Products; Oct 4- 7; Arcachon, France. 2011;110-9.

72. Bak WC, Park JH, Park YA and Ka K.H. Determination of Glucan Contents in the Fruiting Bodies and Mycelia of *Lentinula edodes* Cultivars. *Mycobiology*. 2014;42(3):301–304.

73. Megazyme International Ireland Ltd. Mushroom and yeast beta-glucan: assay procedure. Wicklow: Megazyme International Ireland Ltd.2002.

74. Cheung PCK. Mushrooms as functional foods. Editorial John Wiley & Sons. Wiley: Hoboken, NJ. 2008.

## ANEXO 2: TABLAS DE RESULTADOS

### CAPÍTULO I: COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LOS HONGOS CULTIVADOS EN LA RIOJA

Tabla A. Nombre científico, común y abreviatura de las setas producidas en La Rioja y caracterizadas para la realización de la Tesis Doctoral.

Nombre científico	Nombre común	Abreviatura
<i>Agrocybe aegerita</i>	Seta de chopo	AA
<i>Agaricus bisporus</i>	Champiñón	AB
<i>Agaricus brunnescens</i>	Portobello	ABp
<i>Ganoderma lucidum</i>	Reishi, seta de la inmortalidad	GL
<i>Hericium Erinaceus</i>	Melena de león, seta pompón	HE
<i>Hypsizigus Tessulatus</i> blanca	Seta de haya (Shimeji)	HTb
<i>Hypsizigus Tessulatus</i> gris	Seta de haya (Shimeji)	HTg
<i>Hypsizigus Ulmarius</i>	Seta de olmo	HU
<i>Lentinula Edodes</i>	Shiitake	LE
<i>P. cornucopiae</i> (var. <i>citrinopileatus</i> )	Seta de ostra amarilla	PC
<i>Pleurotus eryngii</i>	Seta de cardo	PE
<i>Pholiota Nameko</i>	Nameko	PN
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Seta de ostra	PO

Tabla B. Composición nutricional de setas cultivadas en La Rioja. <sup>a)</sup>

	Humedad (g/100g)	Cenizas (g/100g)	Grasa (g/100g)	Proteína (g/100g)	Carbohidratos (g/100g)	Energía (kcal/100g)
AA	90,45±0,13 <sup>gh</sup>	7,36±0,15 <sup>c</sup>	3,42±0,41 <sup>abc</sup>	19,16±0,34 <sup>d</sup>	70,73±1,60 <sup>defg</sup>	387,18±1,41 <sup>bcd</sup>
AB	92,97±0,03 <sup>j</sup>	10,12±0,02 <sup>e</sup>	3,82±0,13 <sup>abc</sup>	18,82±0,03 <sup>cd</sup>	67,23±0,05 <sup>cde</sup>	378,54±0,76 <sup>bc</sup>
ABp	88,71±1,26 <sup>de</sup>	10,40±0,01 <sup>ef</sup>	1,67±0,11 <sup>a</sup>	27,82±0,28 <sup>f</sup>	60,12±0,21 <sup>b</sup>	366,75±0,53 <sup>a</sup>
GL	78,34±0,07 <sup>a</sup>	2,20±0,07 <sup>a</sup>	4,24±0,15 <sup>bcd</sup>	16,19±0,42 <sup>bc</sup>	77,37±0,33 <sup>gh</sup>	412,40±0,96 <sup>e</sup>
HE	87,14±0,13 <sup>bc</sup>	7,75±0,14 <sup>c</sup>	3,56±0,43 <sup>abc</sup>	15,27±0,02 <sup>b</sup>	73,23±0,21 <sup>efgh</sup>	386,30±2,57 <sup>bcd</sup>
HTb	89,69±0,08 <sup>fg</sup>	8,99±0,19 <sup>d</sup>	2,80±0,28 <sup>abc</sup>	22,31±0,05 <sup>e</sup>	65,96±0,08 <sup>bcd</sup>	377,51±2,60 <sup>ab</sup>
HTg	90,33±0,05 <sup>g</sup>	7,54±0,24 <sup>c</sup>	4,18±0,67 <sup>bcd</sup>	19,34±0,13 <sup>d</sup>	69,09±1,67 <sup>def</sup>	389,98±2,43 <sup>cd</sup>
HU	89,11±0,09 <sup>ef</sup>	10,17±0,09 <sup>ef</sup>	5,08±0,38 <sup>cd</sup>	36,65±0,10 <sup>g</sup>	48,25±0,31 <sup>a</sup>	384,70±1,28 <sup>bc</sup>
LE	90,03±0,09 <sup>g</sup>	6,36±0,04 <sup>b</sup>	2,79±0,24 <sup>abc</sup>	12,25±0,06 <sup>a</sup>	78,53±0,21 <sup>h</sup>	388,63±1,20 <sup>bcd</sup>
PO	91,42±0,10 <sup>i</sup>	10,73±0,06 <sup>f</sup>	6,34±0,81 <sup>d</sup>	23,01±0,11 <sup>e</sup>	60,38±0,88 <sup>bc</sup>	388,60±3,76 <sup>bcd</sup>
PE	86,83±0,09 <sup>b</sup>	5,98±0,04 <sup>b</sup>	1,86±0,72 <sup>ab</sup>	17,79±0,00 <sup>bcd</sup>	74,40±0,65 <sup>fgh</sup>	385,38±3,84 <sup>bcd</sup>
PC	88,05±0,33 <sup>cd</sup>	8,48±0,02 <sup>d</sup>	6,07±0,03 <sup>d</sup>	26,61±0,14 <sup>f</sup>	58,84±0,24 <sup>bc</sup>	396,41±0,29 <sup>d</sup>
PN	91,27±0,14 <sup>hi</sup>	6,43±0,12 <sup>b</sup>	2,03±0,67 <sup>ab</sup>	15,57±0,15 <sup>b</sup>	75,55±0,24 <sup>fgh</sup>	383,98±4,41 <sup>bc</sup>

Nota: Los datos se presentan en porcentaje (g/ 100g) en peso seco excepto la humedad (porcentaje en peso fresco) y Energía (kcal/ 100 g peso seco)

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

Tabla C. Fibra Dietética en setas cultivadas en La Rioja (g/100g peso seco). <sup>a)</sup>

Setas	FDI	FDS	FDT
<i>Agrocybe aegerita</i> (AA)	35,65±0,16 <sup>e</sup>	5,00±0,14 <sup>c</sup>	40,66±0,07 <sup>c</sup>
<i>Agaricus bisporus</i> (AB)	24,75±0,24 <sup>ab</sup>	0,72±0,24 <sup>a</sup>	25,47±0,04 <sup>a</sup>
<i>Agaricus brunnescens</i> (portobello) (ABp)	24,26±0,70 <sup>a</sup>	4,68±0,18 <sup>bc</sup>	28,93±0,81 <sup>a</sup>
<i>Ganoderma lucidum</i> (GL)	68,40±0,62 <sup>g</sup>	0,68±0,30 <sup>a</sup>	69,08±0,35 <sup>e</sup>
<i>Hericium erinaceus</i> (HE)	34,67±0,23 <sup>e</sup>	5,56±0,20 <sup>cd</sup>	40,23±0,09 <sup>c</sup>
<i>Hypsizygus tessulatus blanca</i> (HTb)	28,81±0,18 <sup>bc</sup>	5,28±0,06 <sup>c</sup>	34,09±0,19 <sup>b</sup>
<i>Hypsizygus tessulaatus gris</i> (HTg)	28,27±0,24 <sup>abc</sup>	4,94±0,08 <sup>bc</sup>	33,21±0,22 <sup>b</sup>
<i>Hypsizygus ulmarius</i> (HU)	30,08±0,63 <sup>cd</sup>	4,08±0,09 <sup>b</sup>	34,16±0,72 <sup>b</sup>
<i>Lentinula edodes</i> (LE)	39,80±1,60 <sup>f</sup>	7,44±0,36 <sup>f</sup>	47,24±1,33 <sup>d</sup>
<i>Pleurotus ostreatus</i> (PO)	33,69±0,75 <sup>de</sup>	6,75±0,10 <sup>ef</sup>	40,44±0,84 <sup>c</sup>
<i>Pleurotus eryngii</i> (PE)	27,19±0,48 <sup>abc</sup>	6,36±0,16 <sup>de</sup>	33,55±0,52 <sup>b</sup>
<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (PC)	34,58±0,35 <sup>e</sup>	5,51±0,38 <sup>cd</sup>	40,09±0,20 <sup>c</sup>
<i>Pholiota nameko</i> (PN)	37,25±2,40 <sup>ef</sup>	7,05±0,09 <sup>ef</sup>	44,30±2,44 <sup>cd</sup>

b) Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

FDI: Fibra Dietética Insoluble; FDS: Fibra Dietética Soluble; FDT: Fibra Dietética Total

Tabla D. Contenido en glucanos en setas cultivadas en La Rioja (g/100 g peso seco). <sup>a)</sup>

Hongos	Glucanos Totales	$\alpha$ -glucanos	$\beta$ -glucanos
<i>Agrocybe aegerita</i> (AA)	32,82±1,13 <sup>f</sup>	2,43±0,06 <sup>f</sup>	<b>30,39±1,19<sup>e</sup></b>
<i>Agaricus bisporus</i> (AB)	12,39±0,54 <sup>a</sup>	4,68±0,08 <sup>h</sup>	<b>7,71±0,47<sup>a</sup></b>
<i>Agaricus brunnescens</i> (portobello) (ABp)	11,04±0,22 <sup>a</sup>	3,08±0,05 <sup>g</sup>	<b>7,96±0,19<sup>a</sup></b>
<i>Ganoderma lucidum</i> (GL)	24,40±0,28 <sup>d</sup>	0,52±0,04 <sup>a</sup>	<b>23,89±0,25<sup>c</sup></b>
<i>Hericium erinaceus</i> (HE)	16,90±0,13 <sup>b</sup>	1,84±0,07 <sup>de</sup>	<b>15,06±0,19<sup>b</sup></b>
<i>Hypsizygus tessulatus blanca</i> (HTb)	28,07±0,45 <sup>e</sup>	2,07±0,02 <sup>e</sup>	<b>26,01±0,45<sup>cd</sup></b>
<i>Hypsizygus tessulaatus gris</i> (HTg)	28,94±0,82 <sup>e</sup>	1,01±0,003 <sup>b</sup>	<b>27,94±0,82<sup>de</sup></b>
<i>Hypsizygus ulmarius</i> (HU)	16,58±0,19 <sup>b</sup>	3,28±0,02 <sup>g</sup>	<b>13,30±0,18<sup>b</sup></b>
<i>Lentinula edodes</i> (LE)	38,82±0,60 <sup>g</sup>	1,36±0,01 <sup>c</sup>	<b>37,45±0,60<sup>f</sup></b>
<i>Pleurotus ostreatus</i> (PO)	26,72±0,82 <sup>de</sup>	1,61±0,04 <sup>d</sup>	<b>25,11±0,78<sup>cd</sup></b>
<i>Pleurotus eryngii</i> (PE)	45,77±0,35 <sup>h</sup>	5,13±0,04 <sup>i</sup>	<b>40,64±0,39<sup>g</sup></b>
<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (PC)	20,46±0,26 <sup>c</sup>	4,90±0,06 <sup>hi</sup>	<b>15,56±0,28<sup>b</sup></b>
<i>Pholiota nameko</i> (PN)	42,96±0,44 <sup>h</sup>	5,61±0,05 <sup>j</sup>	<b>37,35±0,44<sup>f</sup></b>

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

Tabla E. Cantidad de quitosano en las setas cultivadas en La Rioja (mg quitosano/g liofilizado).

<i>Agrocybe aegerita</i> (AA)	7,53±2,15 <sup>a</sup>
<i>Agaricus bisporus</i> (AB)	nd
<i>Agaricus brunnescens</i> (portobello) (ABp)	10,62±3,70 <sup>a</sup>
<i>Ganoderma lucidum</i> (GL)	11,81±6,43 <sup>a</sup>
<i>Hericium erinaceus</i> (HE)	4,24±1,50 <sup>a</sup>
<i>Hypsizygus tessulatus blanca</i> (HTb)	6,15±3,85 <sup>a</sup>
<i>Hypsizygus tessulatus gris</i> (HTg)	nd
<i>Hypsizygus ulmarius</i> (HU)	3,94±3,72 <sup>a</sup>
<i>Lentinula edodes</i> (LE)	2,13±1,40 <sup>a</sup>
<i>Pleurotus ostreatus</i> (PO)	4,92±3,60 <sup>a</sup>
<i>Pleurotus eryngii</i> (PE)	4,48±2,40 <sup>a</sup>
<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (PC)	5,15±1,21 <sup>a</sup>
<i>Pholiota nameko</i> (PN)	14,73±2,85 <sup>a</sup>

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).  
Nd: no detectado.

Tabla F. Actividad antioxidante ( $\mu\text{mol TE}/100 \text{ mg peso seco}$ ) y fenoles totales ( $\mu\text{g GAE}/100 \text{ mg peso seco}$ ) en setas cultivadas en La Rioja <sup>a)</sup>

Setas	Fenoles Totales	DPPH	ABTS	FRAP
	$\mu\text{g EQ gálico}/100 \text{ mg}$	$\mu\text{mol EQ Trolox TE}/100\text{mg}$	$\mu\text{mol EQ Trolox TE}/100\text{mg}$	$\mu\text{mol EQ Trolox TE}/100\text{mg}$
<b>AA</b>	253,50 $\pm$ 3,65 <sup>f</sup>	2,40 $\pm$ 0,01 <sup>i</sup>	4,65 $\pm$ 0,13 <sup>f</sup>	2,77 $\pm$ 0,04 <sup>f</sup>
<b>AB</b>	177,18 $\pm$ 1,24 <sup>e</sup>	2,09 $\pm$ 0,02 <sup>h</sup>	1,26 $\pm$ 0,04 <sup>bc</sup>	1,71 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>
<b>Abp</b>	252,48 $\pm$ 3,66 <sup>f</sup>	2,38 $\pm$ 0,002 <sup>i</sup>	3,88 $\pm$ 0,04 <sup>e</sup>	2,38 $\pm$ 0,03 <sup>e</sup>
<b>GL</b>	141,72 $\pm$ 1,76 <sup>d</sup>	1,90 $\pm$ 0,03 <sup>g</sup>	1,47 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>	0,97 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>
<b>HE</b>	169,57 $\pm$ 5,73 <sup>e</sup>	1,77 $\pm$ 0,12 <sup>f</sup>	2,46 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>	2,45 $\pm$ 0,06 <sup>e</sup>
<b>HTb</b>	63,57 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup>	0,28 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,38 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,52 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
<b>HTg</b>	86,59 $\pm$ 2,11 <sup>b</sup>	0,53 $\pm$ 0,004 <sup>b</sup>	0,38 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,50 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
<b>HU</b>	286,93 $\pm$ 3,97 <sup>g</sup>	1,83 $\pm$ 0,02 <sup>f</sup>	0,52 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,97 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
<b>LE</b>	96,78 $\pm$ 1,89 <sup>b</sup>	0,97 $\pm$ 0,01 <sup>e</sup>	1,18 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,73 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
<b>PO</b>	175,53 $\pm$ 5,31 <sup>e</sup>	0,75 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>	2,69 $\pm$ 0,04 <sup>d</sup>	1,58 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>
<b>PE</b>	115,50 $\pm$ 2,78 <sup>c</sup>	0,64 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	1,17 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,62 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>
<b>PC</b>	274,72 $\pm$ 5,18 <sup>g</sup>	0,70 $\pm$ 0,01 <sup>cd</sup>	0,54 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	2,41 $\pm$ 0,03 <sup>e</sup>
<b>PN</b>	98,28 $\pm$ 1,49 <sup>b</sup>	0,66 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	0,41 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,58 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas ( $P < 0.05$ ).

Contenido de Fenoles Totales: Ensayo de Folin-Ciocalteu ( $\mu\text{g}$  equivalente ácido gálico GAE/100mg); ensayo DPPH: scavenging activity, ABTS: radical scavenging activity and FRAP: Ferric reducing antioxidant power. ( $\mu\text{mol}$  equivalente Trolox TE/100mg).

Tabla G. Composición nutricional de hongos cultivados tratados con pulsos eléctricos de moderada intensidad. <sup>a)</sup>

	Humedad	Cenizas	Grasas	Proteína	Carbohidratos	Energía
AB CONTROL	91,89±0,20 <sup>c</sup>	10,12±0,02 <sup>b</sup>	2,34±0,02 <sup>a</sup>	24,64±0,17 <sup>c</sup>	62,90±0,32 <sup>a</sup>	371,13±0,14 <sup>a</sup>
AB 1,2-5		10,35±0,05 <sup>bc</sup>	2,70±0,17 <sup>abc</sup>	22,76±0,16 <sup>b</sup>	64,37±0,24 <sup>ab</sup>	372,17±0,57 <sup>a</sup>
AB 1,2-18		10,01±0,06 <sup>b</sup>	2,80±0,00 <sup>bcd</sup>	22,64±0,25 <sup>b</sup>	64,37±0,15 <sup>ab</sup>	374,10±0,26 <sup>a</sup>
AB 1,2-30		10,26±0,08 <sup>b</sup>	2,98±0,02 <sup>cd</sup>	22,88±0,11 <sup>b</sup>	63,85±0,30 <sup>a</sup>	373,74±0,60 <sup>a</sup>
AB 2-5		10,20±0,11 <sup>b</sup>	2,58±0,04 <sup>ab</sup>	21,29±0,22 <sup>a</sup>	65,77±0,19 <sup>b</sup>	371,77±0,27 <sup>a</sup>
AB 2-18		10,78±0,18 <sup>c</sup>	3,00±0,02 <sup>cd</sup>	20,45±0,23 <sup>a</sup>	65,92±0,18 <sup>b</sup>	372,30±1,08 <sup>a</sup>
AB 2-30		7,72±0,03 <sup>a</sup>	3,11±0,05 <sup>d</sup>	20,35±0,34 <sup>a</sup>	69,03±0,48 <sup>c</sup>	384,80±0,38 <sup>b</sup>
GL CONTROL	78,34±0,07 <sup>a</sup>	2,96±0,18 <sup>ab</sup>	3,12±0,01 <sup>b</sup>	14,60±0,13 <sup>a</sup>	79,32±0,29 <sup>ab</sup>	385,52±0,19 <sup>cd</sup>
GL 1,2-5		2,74±0,14 <sup>ab</sup>	3,41±0,01 <sup>c</sup>	15,15±0,31 <sup>ab</sup>	78,78±0,26 <sup>ab</sup>	378,76±0,16 <sup>a</sup>
GL 1,2-30		2,45±0,08 <sup>a</sup>	2,79±0,02 <sup>a</sup>	14,97±0,12 <sup>ab</sup>	79,85±0,06 <sup>b</sup>	382,74±1,00 <sup>bc</sup>
GL 2-5		3,05±0,08 <sup>b</sup>	3,07±0,09 <sup>b</sup>	15,39±0,20 <sup>ab</sup>	78,31±0,27 <sup>a</sup>	379,11±1,43 <sup>ab</sup>
GL 2-30		2,87±0,11 <sup>ab</sup>	2,88±0,02 <sup>ab</sup>	15,62±0,11 <sup>b</sup>	78,67±0,03 <sup>ab</sup>	380,53±0,02 <sup>ab</sup>
LE CONTROL	92,40±0,18 <sup>c</sup>	7,36±0,01 <sup>a</sup>	2,06±0,01 <sup>a</sup>	16,82±0,36 <sup>a</sup>	73,43±0,22 <sup>d</sup>	381,25±0,45 <sup>ab</sup>
LE 1,2-5		9,28±0,13 <sup>d</sup>	2,43±0,00 <sup>bc</sup>	19,07±0,15 <sup>b</sup>	69,43±0,25 <sup>a</sup>	388,45±0,17 <sup>d</sup>
LE 1,2-18		7,42±0,05 <sup>a</sup>	2,58±0,03 <sup>bcd</sup>	17,72±0,20 <sup>ab</sup>	72,36±0,38 <sup>cd</sup>	384,07±0,33 <sup>b</sup>
LE 1,2-30		7,86±0,10 <sup>b</sup>	2,60±0,02 <sup>cd</sup>	19,02±0,33 <sup>b</sup>	70,30±0,16 <sup>ab</sup>	385,96±1,47 <sup>b</sup>
LE 2-5		8,39±0,02 <sup>c</sup>	2,41±0,05 <sup>b</sup>	16,83±0,84 <sup>a</sup>	71,53±0,07 <sup>bc</sup>	382,37±1,03 <sup>ab</sup>
LE 2-18		9,24±0,15 <sup>d</sup>	2,69±0,04 <sup>d</sup>	17,23±0,04 <sup>ab</sup>	71,03±0,03 <sup>bc</sup>	377,75±0,67 <sup>a</sup>
LE 2-30		8,13±0,08 <sup>bc</sup>	2,17±0,03 <sup>a</sup>	17,27±0,19 <sup>ab</sup>	72,27±0,40 <sup>cd</sup>	384,36±1,04 <sup>b</sup>
PE CONTROL	90,06±0,06 <sup>b</sup>	5,98±0,04 <sup>a</sup>	1,60±0,02 <sup>b</sup>	12,30±0,04 <sup>a</sup>	80,15±0,11 <sup>b</sup>	382,48±0,81 <sup>ab</sup>
PE 1,2-5		5,89±0,18 <sup>a</sup>	1,92±0,05 <sup>c</sup>	14,88±0,06 <sup>b</sup>	77,23±0,26 <sup>a</sup>	383,75±0,97 <sup>b</sup>
PE 1,2-18		6,71±0,15 <sup>bc</sup>	1,88±0,01 <sup>c</sup>	14,88±0,01 <sup>b</sup>	76,50±0,26 <sup>a</sup>	380,85±0,00 <sup>c</sup>
PE 1,2-30		7,23±0,10 <sup>c</sup>	1,34±0,00 <sup>a</sup>	15,62±0,10 <sup>b</sup>	75,70±0,16 <sup>a</sup>	375,23±0,81 <sup>a</sup>
PE 2-5		6,25±0,13 <sup>ab</sup>	1,92±0,04 <sup>c</sup>	14,35±0,80 <sup>b</sup>	76,74±0,58 <sup>a</sup>	383,42±0,17 <sup>d</sup>
PE 2-18		6,41±0,24 <sup>ab</sup>	1,45±0,02 <sup>ab</sup>	15,81±0,33 <sup>b</sup>	76,32±0,59 <sup>a</sup>	381,92±0,04 <sup>cd</sup>
PE 2-30		5,88±0,13 <sup>a</sup>	1,45±0,02 <sup>ab</sup>	15,42±0,07 <sup>b</sup>	77,23±0,31 <sup>a</sup>	378,45±0,12 <sup>b</sup>
PO CONTROL	93,52±0,09 <sup>d</sup>	6,73±0,05 <sup>a</sup>	2,46±0,00 <sup>a</sup>	12,55±0,24 <sup>ab</sup>	78,35±0,37 <sup>c</sup>	377,10±0,31 <sup>ab</sup>
PO 1,2-5		8,58±0,07 <sup>cd</sup>	2,67±0,04 <sup>a</sup>	12,80±0,20 <sup>ab</sup>	75,83±0,37 <sup>a</sup>	378,08±0,18 <sup>b</sup>
PO 1,2-18		7,93±0,14 <sup>bcd</sup>	2,80±0,10 <sup>a</sup>	13,10±0,10 <sup>bc</sup>	76,19±0,05 <sup>ab</sup>	403,29±0,84 <sup>a</sup>
PO 1,2-30		8,66±0,28 <sup>cd</sup>	2,63±0,03 <sup>a</sup>	13,11±0,11 <sup>bc</sup>	75,68±0,30 <sup>a</sup>	405,73±0,75 <sup>a</sup>
PO 2-5		8,87±0,4 <sup>d</sup>	3,21±0,06 <sup>b</sup>	12,72±0,06 <sup>ab</sup>	75,18±0,03 <sup>a</sup>	403,88±0,26 <sup>a</sup>
PO 2-18		7,81±0,15 <sup>bc</sup>	2,60±0,04 <sup>a</sup>	13,55±0,18 <sup>c</sup>	76,07±0,03 <sup>ab</sup>	403,01±0,94 <sup>a</sup>
PO 2-30		7,36±0,38 <sup>ab</sup>	3,28±0,10 <sup>b</sup>	12,29±0,03 <sup>a</sup>	77,42±0,23 <sup>bc</sup>	402,81±0,81 <sup>a</sup>

Nota: Los datos se presentan en porcentaje (g/ 100g) en peso seco excepto la humedad (porcentaje en peso fresco) y Energía (kcal/ 100 g peso seco)

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

Tabla H. Contenido en fibra dietética de hongos cultivados tratados con pulsos eléctricos de moderada intensidad de Campo. (g/100g peso seco)

	FDI	FDS	FDT	FDI / FDS
AB CT	23,13±0,52 <sup>a</sup>	4,53±0,49 <sup>ab</sup>	27,66±0,89 <sup>a</sup>	5,11
AB 1,2-5	26,30±0,31 <sup>ab</sup>	4,09±0,51 <sup>a</sup>	30,67±1,39 <sup>ab</sup>	6,43
AB 2-30	27,72±0,39 <sup>b</sup>	5,06±0,18 <sup>abcd</sup>	32,77±0,24 <sup>b</sup>	5,48
GL CT	77,59±0,25 <sup>g</sup>	4,72±0,31 <sup>abc</sup>	82,32±0,17 <sup>f</sup>	16,43
GL 1,2-5	82,99±0,07 <sup>h</sup>	3,56±0,08 <sup>a</sup>	86,54±0,13 <sup>fg</sup>	23,34
GL 2-30	84,22±1,33 <sup>h</sup>	3,42±0,16 <sup>a</sup>	87,64±1,20 <sup>g</sup>	24,61
LE CT	39,80±1,60 <sup>d</sup>	7,44±0,36 <sup>de</sup>	47,27±1,33 <sup>d</sup>	5,35
LE 1,2-5	38,79±0,66 <sup>d</sup>	8,53±0,34 <sup>e</sup>	47,32±0,45 <sup>d</sup>	4,55
LE 2-30	40,75±0,43 <sup>de</sup>	8,60±0,12 <sup>e</sup>	49,35±0,31 <sup>de</sup>	4,74
PE CT	27,19±0,48 <sup>b</sup>	6,36±0,16 <sup>bcd</sup>	33,55±0,52 <sup>b</sup>	4,27
PE 1,2-5	27,73±0,34 <sup>b</sup>	4,81±0,09 <sup>abc</sup>	32,54±0,33 <sup>b</sup>	5,77
PE 2-30	28,69±0,41 <sup>b</sup>	4,75±0,44 <sup>abc</sup>	33,44±0,08 <sup>b</sup>	6,03
PO CT	33,69±0,75 <sup>c</sup>	6,75±0,10 <sup>bcd</sup>	40,44±0,84 <sup>c</sup>	4,99
PO 1,2-5	44,84±1,27 <sup>f</sup>	6,92±0,99 <sup>bcd</sup>	51,76±0,32 <sup>e</sup>	6,48
PO 2-30	44,09±0,30 <sup>ef</sup>	7,05±0,09 <sup>cde</sup>	51,14±0,39 <sup>de</sup>	6,25

a) Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).  
FDI: Fibra Dietética Insoluble; FDS: Fibra Dietética Soluble; FDT: Fibra Dietética Total

Tabla I. Contenido en glucanos de hongos cultivados tratados con pulsos eléctricos de moderada intensidad de Campo.

	Glucanos Totales	$\alpha$ -glucanos	$\beta$ -glucanos
AB CONTROL	15,97±0,69 <sup>b</sup>	3,06±0,11 <sup>b</sup>	12,91±0,81 <sup>a</sup>
AB 1,2-5	14,45±0,14 <sup>a</sup>	2,23±0,13 <sup>a</sup>	12,22±0,06 <sup>a</sup>
AB 1,2-18	14,48±0,15 <sup>a</sup>	3,02±0,10 <sup>b</sup>	11,47±0,21 <sup>a</sup>
AB 1,2-30	14,60±0,08 <sup>ab</sup>	2,71±0,22 <sup>ab</sup>	11,90±0,23 <sup>a</sup>
AB 2-5	14,61±0,21 <sup>ab</sup>	2,85±0,24 <sup>ab</sup>	11,76±0,35 <sup>a</sup>
AB 2-18	14,58±0,13 <sup>ab</sup>	2,90±0,04 <sup>ab</sup>	11,67±0,09 <sup>a</sup>
AB 2-30	13,91±0,24 <sup>a</sup>	2,36±0,07 <sup>ab</sup>	11,55±0,26 <sup>a</sup>
PO CONTROL	49,15±0,52 <sup>b</sup>	8,29±0,06 <sup>e</sup>	40,86±0,56 <sup>d</sup>
PO 1,2-5	38,27±0,97 <sup>a</sup>	2,64±0,13 <sup>a</sup>	35,63±0,87 <sup>bc</sup>
PO 1,2-18	38,98±0,58 <sup>a</sup>	2,88±0,04 <sup>a</sup>	36,10±0,61 <sup>c</sup>
PO 1,2-30	36,26±0,52 <sup>a</sup>	4,00±0,04 <sup>c</sup>	32,26±0,55 <sup>ab</sup>
PO 2-5	36,59±1,07 <sup>a</sup>	3,39±0,04 <sup>b</sup>	33,20±1,07 <sup>abc</sup>
PO 2-18	35,43±0,73 <sup>a</sup>	3,99±0,02 <sup>c</sup>	31,44±0,75 <sup>a</sup>
PO 2-30	35,74±0,65 <sup>a</sup>	4,85±0,04 <sup>d</sup>	30,89±0,67 <sup>a</sup>
PE CONTROL	54,25±0,43 <sup>b</sup>	10,33±0,44 <sup>c</sup>	43,92±0,84 <sup>a</sup>
PE 1,2-5	48,18±0,61 <sup>a</sup>	1,21±0,05 <sup>ab</sup>	46,96±0,66 <sup>ab</sup>
PE 1,2-18	48,25±0,43 <sup>a</sup>	1,12±0,01 <sup>ab</sup>	47,13±0,44 <sup>ab</sup>
PE 1,2-30	48,04±0,51 <sup>a</sup>	1,75±0,03 <sup>b</sup>	46,30±0,48 <sup>ab</sup>
PE 2-5	48,24±0,64 <sup>a</sup>	0,79±0,06 <sup>a</sup>	47,45±0,59 <sup>b</sup>
PE 2-18	46,80±0,66 <sup>a</sup>	1,03±0,03 <sup>ab</sup>	45,77±0,65 <sup>ab</sup>
PE 2-30	47,24±0,94 <sup>a</sup>	0,96±0,01 <sup>ab</sup>	46,27±0,93 <sup>ab</sup>
LE CONTROL	34,81±1,13 <sup>c</sup>	2,20±0,00 <sup>d</sup>	32,61±1,13 <sup>c</sup>
LE 1,2-5	29,43±0,50 <sup>ab</sup>	0,75±0,03 <sup>a</sup>	28,68±0,54 <sup>ab</sup>
LE 1,2-18	31,56±1,41 <sup>bc</sup>	0,80±0,00 <sup>ab</sup>	30,76±1,41 <sup>bc</sup>
LE 1,2-30	29,14±0,51 <sup>ab</sup>	0,72±0,03 <sup>a</sup>	28,42±0,54 <sup>ab</sup>
LE 2-5	28,24±0,12 <sup>ab</sup>	0,92±0,04 <sup>b</sup>	27,32±0,16 <sup>ab</sup>
LE 2-18	27,43±0,22 <sup>a</sup>	1,14±0,05 <sup>c</sup>	26,29±0,25 <sup>a</sup>
LE 2-30	29,27±0,50 <sup>ab</sup>	1,27±0,01 <sup>c</sup>	28,01±0,50 <sup>ab</sup>
GL CONTROL	24,40±0,28 <sup>a</sup>	0,52±0,04 <sup>ab</sup>	23,89±0,25 <sup>a</sup>
GL 1,2-5	26,96±0,14 <sup>bc</sup>	0,57±0,04 <sup>b</sup>	26,39±0,16 <sup>bc</sup>
GL 1,2-30	28,04±0,27 <sup>c</sup>	0,41±0,01 <sup>a</sup>	27,63±0,26 <sup>c</sup>
GL 2-5	26,46±0,45 <sup>b</sup>	0,52±0,02 <sup>ab</sup>	25,94±0,45 <sup>b</sup>
GL 2-30	26,30±0,42 <sup>b</sup>	0,58±0,04 <sup>b</sup>	25,72±0,45 <sup>b</sup>

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).



Tabla J. Fenoles Totales y capacidad antioxidantes de hongos tratados con pulsos eléctricos de moderada intensidad.

	Tratamientos	Fenoles Totales	DPPH	ABTS	FRAP
Hongos	kV/cm - pulsos	µg EQ gálico/100mg	µmol EQ trolox/100mg		
<i>Agaricus bisporus</i>	CONTROL	182,0 ± 2,3 <sup>bc</sup>	0,75 ± 0,01 <sup>e</sup>	2,33 ± 0,02 <sup>b</sup>	2,36 ± 0,03 <sup>d</sup>
	1.2 - 5	198,8 ± 6,0 <sup>c</sup>	0,62 ± 0,01 <sup>d</sup>	2,40 ± 0,06 <sup>bc</sup>	2,47 ± 0,03 <sup>e</sup>
	1.2 - 18	187,7 ± 6,8 <sup>c</sup>	0,47 ± 0,00 <sup>c</sup>	3,01 ± 0,15 <sup>d</sup>	2,73 ± 0,03 <sup>g</sup>
	1.2 - 30	186,9 ± 3,1 <sup>c</sup>	0,41 ± 0,00 <sup>b</sup>	2,70 ± 0,06 <sup>cd</sup>	2,59 ± 0,01 <sup>f</sup>
	2 - 5	159,2 ± 3,6 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,00 <sup>c</sup>	2,45 ± 0,09 <sup>bc</sup>	2,24 ± 0,02 <sup>c</sup>
	2 - 18	147,1 ± 2,4 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,01 <sup>c</sup>	3,02 ± 0,07 <sup>d</sup>	1,99 ± 0,03 <sup>b</sup>
	2 - 30	163,8 ± 4,2 <sup>ab</sup>	0,34 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,76 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,78 ± 0,03 <sup>a</sup>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	CONTROL	82,3 ± 1,2 <sup>d</sup>	0,47 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,48 ± 0,01 <sup>a</sup>
	1.2 - 5	74,1 ± 1,9 <sup>bc</sup>	0,57 ± 0,02 <sup>bc</sup>	0,52 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,02 <sup>c</sup>
	1.2 - 18	71,4 ± 1,4 <sup>ab</sup>	0,61 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,22 ± 0,03 <sup>d</sup>	1,01 ± 0,01 <sup>e</sup>
	1.2 - 30	76,0 ± 0,8 <sup>bc</sup>	0,57 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,30 ± 0,02 <sup>de</sup>	0,85 ± 0,01 <sup>c</sup>
	2 - 5	76,7 ± 1,8 <sup>bcd</sup>	0,61 ± 0,01 <sup>bc</sup>	1,32 ± 0,02 <sup>e</sup>	0,95 ± 0,01 <sup>d</sup>
	2 - 18	78,2 ± 1,1 <sup>cd</sup>	0,65 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,67 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,99 ± 0,02 <sup>de</sup>
	2 - 30	66,0 ± 1,1 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,70 ± 0,01 <sup>b</sup>
<i>Pleurotus eryngii</i>	CONTROL	76,6 ± 0,9 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,54 ± 0,01 <sup>a</sup>
	1.2 - 5	84,1 ± 1,3 <sup>b</sup>	0,56 ± 0,00 <sup>bc</sup>	0,53 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,56 ± 0,01 <sup>a</sup>
	1.2 - 18	88,9 ± 1,8 <sup>bc</sup>	0,64 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,98 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,66 ± 0,01 <sup>b</sup>
	1.2 - 30	96,1 ± 1,7 <sup>d</sup>	0,67 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,92 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,67 ± 0,01 <sup>b</sup>
	2 - 5	104,6 ± 1,6 <sup>e</sup>	0,67 ± 0,01 <sup>d</sup>	1,18 ± 0,03 <sup>d</sup>	0,67 ± 0,01 <sup>b</sup>
	2 - 18	95,1 ± 1,9 <sup>cd</sup>	0,58 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,93 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,64 ± 0,01 <sup>b</sup>
	2 - 30	83,3 ± 1,2 <sup>b</sup>	0,54 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,52 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,55 ± 0,01 <sup>a</sup>
<i>Lentinula edodes</i>	CONTROL	104,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	1,01 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,38 ± 0,02 <sup>a</sup>
	1.2 - 5	117,9 ± 0,4 <sup>bc</sup>	1,38 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,52 ± 0,03 <sup>b</sup>
	1.2 - 18	117,4 ± 1,2 <sup>bc</sup>	2,20 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,54 ± 0,00 <sup>cd</sup>	1,63 ± 0,02 <sup>c</sup>
	1.2 - 30	125,3 ± 1,4 <sup>cd</sup>	2,16 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,53 ± 0,00 <sup>c</sup>	1,69 ± 0,02 <sup>cd</sup>
	2 - 5	116,2 ± 1,1 <sup>b</sup>	2,17 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,55 ± 0,01 <sup>d</sup>	1,62 ± 0,02 <sup>bc</sup>

	2 - 18	133,3 ± 1,9 <sup>d</sup>	2,20 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,54 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,75 ± 0,04 <sup>d</sup>
	2 - 30	121,3 ± 2,5 <sup>bc</sup>	1,41 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,48 ± 0,06 <sup>b</sup>	1,52 ± 0,03 <sup>b</sup>
	CONTROL	110,1 ± 3,4 <sup>c</sup>	0,59 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,17 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,96 ± 0,03 <sup>bc</sup>
<b><i>Ganoderma lucidum</i></b>	1.2 - 5	102,1 ± 1,3 <sup>bc</sup>	0,43 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,85 ± 0,01 <sup>ab</sup>
	1.2 - 30	74,2 ± 0,7 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,02 <sup>c</sup>	1,13 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,86 ± 0,03 <sup>ab</sup>
	2 - 5	83,0 ± 3,6 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,03 <sup>d</sup>	1,32 ± 0,04 <sup>d</sup>	0,99 ± 0,04 <sup>c</sup>
	2 - 30	96,5 ± 1,1 <sup>b</sup>	0,39 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,01 <sup>a</sup>

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

Contenido de Fenoles Totales: Ensayo de Folin-Ciocalteu (µg equivalente ácido gálico GAE/100mg); ensayo DPPH: scavenging activity, ABTS: radical scavenging activity and FRAP: Ferric reducing antioxidant power. (µmol equivalente Trolox TE/100mg).

CAPÍTULO III: Aplicación de Pulsos Eléctricos de Intensidad de Campo Moderada en paquetes de *Lentinula edodes* (shiitake) y caracterización de sus compuestos bioactivos.

Tabla K. Producción de *Lentinula edodes* (g/paquete) y porcentaje respecto al control. <sup>a) b)</sup>

PRODUCCIÓN LE	g/paquete	% respecto al CT
<b>CONTROL</b>	508,10±73,72 <sup>a</sup>	100
<b>0,3-2p</b>	451,80±70,55 <sup>a</sup>	88,92
<b>0,3-5p</b>	452,90±58,54 <sup>a</sup>	89,14
<b>0,7-2p</b>	423,20±70,98 <sup>a</sup>	83,29
<b>0,7-5p</b>	423,60±49,16 <sup>a</sup>	83,37
<b>1-2p</b>	447,50±79,52 <sup>a</sup>	88,07
<b>1-5p</b>	459,14±13,40 <sup>a</sup>	90,36
<b>0,3-10s</b>	379,40±42,80 <sup>a</sup>	74,67
<b>0,7-10s</b>	353,33±25,40 <sup>a</sup>	69,54
<b>1-10s</b>	402,00±34,53 <sup>a</sup>	79,12

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

<sup>b)</sup> Las codificaciones de los tratamientos se encuentran en la tabla asdfa de Materiales y Métodos.

Tabla L. Composición centesimal de *Lentinula edodes* (g/100g) obtenidas en los paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. <sup>a) b)</sup>

	Humedad	Cenizas	Grasas	Proteína	Carbohidratos	Energía (kcal)
<b>CONTROL</b>	89,88±0,24 <sup>ab</sup>	5,74±0,15 <sup>ab</sup>	2,17±0,01 <sup>de</sup>	17,34±0,03 <sup>b</sup>	75,48±0,83 <sup>bcd</sup>	384,27±3,39 <sup>a</sup>
<b>0,3-2p</b>	90,89±0,46 <sup>ab</sup>	5,99±0,07 <sup>b</sup>	2,19±0,02 <sup>e</sup>	19,07±0,08 <sup>d</sup>	73,48±0,65 <sup>a</sup>	383,34±3,80 <sup>a</sup>
<b>0,3-5p</b>	89,33±0,25 <sup>a</sup>	5,63±0,15 <sup>ab</sup>	2,09±0,01 <sup>bcd</sup>	18,18±0,07 <sup>c</sup>	74,80±0,60 <sup>b</sup>	384,44±3,84 <sup>a</sup>
<b>0,7-2p</b>	90,69±0,21 <sup>ab</sup>	5,52±0,08 <sup>ab</sup>	2,10±0,02 <sup>bcd</sup>	17,01±0,05 <sup>b</sup>	76,06±0,74 <sup>cd</sup>	384,93±3,24 <sup>a</sup>
<b>0,7-5p</b>	89,29±0,44 <sup>a</sup>	5,37±0,03 <sup>a</sup>	2,04±0,01 <sup>abcde</sup>	16,82±0,12 <sup>b</sup>	76,46±0,54 <sup>de</sup>	385,33±3,53 <sup>a</sup>
<b>1-2p</b>	90,99±0,34 <sup>ab</sup>	5,51±0,04 <sup>ab</sup>	2,12±0,03 <sup>cde</sup>	17,22±0,09 <sup>b</sup>	75,86±0,63 <sup>cd</sup>	385,02±3,68 <sup>a</sup>
<b>1-5p</b>	91,84±0,26 <sup>b</sup>	5,52±0,08 <sup>ab</sup>	1,99±0,03 <sup>abc</sup>	17,11±0,09 <sup>b</sup>	76,05±0,63 <sup>cd</sup>	384,52±3,59 <sup>a</sup>
<b>0,3-10s</b>	89,40±0,77 <sup>a</sup>	5,45±0,05 <sup>a</sup>	1,89±0,03 <sup>a</sup>	17,18±0,09 <sup>b</sup>	76,11±0,56 <sup>cd</sup>	384,51±3,34 <sup>a</sup>
<b>0,7-10s</b>	90,31±0,20 <sup>ab</sup>	5,31±0,09 <sup>a</sup>	1,93±0,02 <sup>ab</sup>	18,13±0,04 <sup>c</sup>	75,28±0,64 <sup>bc</sup>	385,19±3,37 <sup>a</sup>
<b>1-10s</b>	89,40±0,72 <sup>a</sup>	5,31±0,16 <sup>a</sup>	1,99±0,05 <sup>abcd</sup>	16,15±0,25 <sup>a</sup>	77,22±1,00 <sup>e</sup>	385,41±3,04 <sup>a</sup>

Nota: Los datos se presentan en porcentaje (g/ 100g) en peso seco excepto la humedad (porcentaje en peso fresco) y Energía (kcal/ 100 g peso seco)

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

<sup>b)</sup> Las codificaciones de los tratamientos se encuentran en la tabla asdfa de Materiales y Métodos.

Tabla M. Contenido de Fibra Dietética Insoluble (FDI), Soluble (FDS) y Total (FDT) (g/100g) de *Lentinula edodes* obtenidas en los paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. <sup>a) b)</sup>

LE	FDI	FDS	FDT
CONTROL	45,60±0,46 <sup>ab</sup>	5,50±0,19 <sup>e</sup>	51,09±0,38 <sup>bc</sup>
<b>0,3-2p</b>	43,89±0,99 <sup>a</sup>	5,48±0,10 <sup>e</sup>	49,37±0,71 <sup>ab</sup>
<b>0,3-5p</b>	44,65±0,29 <sup>a</sup>	3,28±0,28 <sup>a</sup>	47,93±3,87 <sup>a</sup>
<b>0,7-2p</b>	49,39±0,04 <sup>cde</sup>	3,87±0,05 <sup>abc</sup>	53,26±0,02 <sup>cd</sup>
<b>0,7-5p</b>	50,99±0,90 <sup>e</sup>	4,46±0,09 <sup>bcd</sup>	55,45±0,85 <sup>e</sup>
<b>1-2p</b>	48,33±0,25 <sup>cd</sup>	4,50±0,13 <sup>cd</sup>	52,84±0,26 <sup>cd</sup>
<b>1-5p</b>	50,02±0,31 <sup>de</sup>	3,78±0,11 <sup>ab</sup>	53,80±0,38 <sup>de</sup>
<b>0,3-10s</b>	49,50±0,35 <sup>cde</sup>	4,30±0,15 <sup>bcd</sup>	53,81±0,32 <sup>de</sup>
<b>0,7-10s</b>	43,69±0,31 <sup>a</sup>	4,06±0,04 <sup>bcd</sup>	47,75±0,26 <sup>a</sup>
<b>1-10s</b>	47,56±0,42 <sup>bc</sup>	4,76±0,19 <sup>d</sup>	52,32±0,29 <sup>cd</sup>

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

<sup>b)</sup> Las codificaciones de los tratamientos se encuentran en la tabla asdfa de Materiales y Métodos.

Tabla N. Contenido en Glucanos Totales,  $\alpha$ -glucanos y  $\beta$ -glucanos de *Lentinula edodes* obtenidas en los paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. <sup>a) b)</sup>

LE	Totales	$\alpha$ -glucanos	$\beta$ -glucanos
CONTROL	33,26±0,35 <sup>bcd</sup>	1,25±0,06 <sup>bc</sup>	32,01±0,37 <sup>bcd</sup>
<b>0,3-2p</b>	30,18±0,03 <sup>a</sup>	0,98±0,03 <sup>a</sup>	29,20±0,04 <sup>a</sup>
<b>0,3-5p</b>	31,26±0,83 <sup>ab</sup>	0,99±0,02 <sup>a</sup>	30,27±0,83 <sup>ab</sup>
<b>0,7-2p</b>	35,45±0,23 <sup>de</sup>	1,62±0,02 <sup>d</sup>	33,83±0,21 <sup>def</sup>
<b>0,7-5p</b>	35,33±0,16 <sup>de</sup>	1,57±0,02 <sup>d</sup>	33,76±0,18 <sup>def</sup>
<b>1-2p</b>	32,20±0,29 <sup>abc</sup>	1,33±0,01 <sup>c</sup>	30,87±0,29 <sup>abc</sup>
<b>1-5p</b>	34,60±0,65 <sup>cde</sup>	1,44±0,05 <sup>cd</sup>	33,17±0,60 <sup>cde</sup>
<b>0,3-10s</b>	36,71±0,77 <sup>e</sup>	1,54±0,05 <sup>d</sup>	35,78±0,51 <sup>f</sup>
<b>0,7-10s</b>	32,43±0,73 <sup>abc</sup>	1,07±0,07 <sup>ab</sup>	31,37±0,66 <sup>abc</sup>
<b>1-10s</b>	36,75±0,47 <sup>e</sup>	2,15±0,04 <sup>e</sup>	34,61±0,50 <sup>ef</sup>

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

<sup>b)</sup> Las codificaciones de los tratamientos se encuentran en la tabla asdfa de Materiales y Métodos.

Tabla O. Fenoles Totales y capacidad antioxidantes de *Lentinula edodes* producida a partir de paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. <sup>a) b)</sup>

LE	Fenoles Totales	DPPH	ABTS	FRAP
<b>CONTROL</b>	198,63±7,89 <sup>a</sup>	0,48±0,06 <sup>ab</sup>	2,25±0,06 <sup>a</sup>	0,71±0,00 <sup>a</sup>
<b>0,3-2p</b>	230,47±10,26 <sup>a</sup>	0,65±0,03 <sup>bc</sup>	2,98±0,1 <sup>3bc</sup>	0,84±0,03 <sup>abcd</sup>
<b>0,3-5p</b>	225,21±10,79 <sup>a</sup>	0,45±0,04 <sup>ab</sup>	2,98±0,14 <sup>bcd</sup>	0,65±0,03 <sup>a</sup>
<b>0,7-2p</b>	198,37±5,00 <sup>a</sup>	0,65±0,07 <sup>bc</sup>	2,98±0,08 <sup>bcd</sup>	0,79±0,07 <sup>abc</sup>
<b>0,7-5p</b>	197,05±15,79 <sup>a</sup>	0,23±0,05 <sup>a</sup>	2,91±0,04 <sup>bc</sup>	0,79±0,01 <sup>ab</sup>
<b>1-2p</b>	358,63±5,79 <sup>b</sup>	0,46±0,06 <sup>ab</sup>	4,03±0,06 <sup>e</sup>	1,27±0,00 <sup>d</sup>
<b>1-5p</b>	303,11±20,79 <sup>b</sup>	0,79±0,06 <sup>cd</sup>	3,38±0,03 <sup>cd</sup>	1,19±0,02 <sup>bcd</sup>
<b>0,3-10s</b>	171,79±9,47 <sup>a</sup>	1,11±0,04 <sup>e</sup>	2,71±0,05 <sup>ab</sup>	1,00±0,16 <sup>abcd</sup>
<b>0,7-10s</b>	351,79±9,47 <sup>b</sup>	1,02±0,03 <sup>de</sup>	3,46±0,07 <sup>d</sup>	1,25±0,18 <sup>cd</sup>
<b>1-10s</b>	190,47±2,89 <sup>a</sup>	0,59±0,06 <sup>bc</sup>	2,94±0,11 <sup>bc</sup>	0,75±0,00 <sup>ab</sup>

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas ( $P < 0.05$ ).

<sup>b)</sup> Las codificaciones de los tratamientos se encuentran en la tabla asdfa de Materiales y Métodos.

Contenido de Fenoles Totales: Ensayo de Folin-Ciocalteu ( $\mu\text{g}$  equivalente ácido gálico GAE/100mg); ensayo DPPH: scavenging activity, ABTS: radical scavenging activity and FRAP: Ferric reducing antioxidant power. ( $\mu\text{mol}$  equivalente Trolox TE/100mg).

CAPÍTULO IV: Aplicación de Pulsos eléctricos de Moderada Intensidad de Campo en paquetes de *Pleurotus eryngii* y caracterización de sus compuestos bioactivos.

Tabla P. Producción de *Pleurotus eryngii* en paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. <sup>a)</sup>

PE	g/paquete	%respecto al control
CONTROL	360,30±16,37 <sup>ab</sup>	100
<b>0,3-2p</b>	410,70±14,65 <sup>bcd</sup>	113,99
<b>0,3-5p</b>	326,44±18,09 <sup>a</sup>	90,60
<b>0,7-2p</b>	392,00±14,21 <sup>abcd</sup>	108,80
<b>0,7-5p</b>	468,75±13,87 <sup>e</sup>	130,10
<b>1-2p</b>	377,60±12,20 <sup>abc</sup>	104,80
<b>1-5p</b>	387,67±11,15 <sup>abc</sup>	107,60
<b>0,3-10s</b>	464,38±11,40 <sup>de</sup>	128,89
<b>0,7-10s</b>	438,10±16,32 <sup>cde</sup>	121,59
<b>1-10s</b>	320,13±25,90 <sup>a</sup>	88,85

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

<sup>b)</sup> Las codificaciones de los tratamientos se encuentran en la tabla asdfa de Materiales y Métodos.

Tabla Q. Composición centesimal de *Pleurotus eryngii* producida de paquetes tratados con con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. <sup>a) b)</sup>

PE	Humedad	Cenizas	Grasas	Proteína	Carbohidratos	Energía
<b>CONTROL</b>	88,06±0,14 <sup>a</sup>	5,55±0,10 <sup>abc</sup>	1,57±0,01 <sup>b</sup>	11,18±0,03 <sup>c</sup>	81,70±0,13 <sup>cd</sup>	385,68±0,38 <sup>abcd</sup>
<b>0,3-2p</b>	88,56±0,19 <sup>abc</sup>	5,28±0,07 <sup>ab</sup>	1,40±0,03 <sup>a</sup>	11,35±0,06 <sup>cd</sup>	81,97±0,08 <sup>de</sup>	385,85±0,20 <sup>abcd</sup>
<b>0,3-5p</b>	88,15±0,10 <sup>ab</sup>	5,77±0,14 <sup>bcd</sup>	1,62±0,04 <sup>bc</sup>	11,64±0,02 <sup>e</sup>	80,97±0,15 <sup>b</sup>	385,01±0,62 <sup>abc</sup>
<b>0,7-2p</b>	87,88±0,06 <sup>a</sup>	5,14±0,18 <sup>a</sup>	1,62±0,02 <sup>bc</sup>	10,21±0,02 <sup>a</sup>	83,03±0,19 <sup>f</sup>	387,55±0,70 <sup>d</sup>
<b>0,7-5p</b>	88,80±0,12 <sup>abc</sup>	5,40±0,10 <sup>abc</sup>	1,42±0,01 <sup>a</sup>	11,76±0,03 <sup>e</sup>	81,43±0,07 <sup>bc</sup>	385,49±0,38 <sup>abc</sup>
<b>1-2p</b>	88,57±0,31 <sup>abc</sup>	5,38±0,07 <sup>abc</sup>	1,67±0,02 <sup>bc</sup>	10,72±0,03 <sup>b</sup>	82,23±0,04 <sup>e</sup>	386,83±0,36 <sup>cd</sup>
<b>1-5p</b>	89,12±0,36 <sup>bc</sup>	5,52±0,06 <sup>abc</sup>	1,71±0,00 <sup>cd</sup>	11,42±0,08 <sup>d</sup>	81,35±0,09 <sup>bc</sup>	386,47±0,25 <sup>cd</sup>
<b>0,3-10s</b>	88,30±0,03 <sup>abc</sup>	5,44±0,07 <sup>abc</sup>	1,63±0,01 <sup>bc</sup>	11,24±0,01 <sup>cd</sup>	81,69±0,07 <sup>cd</sup>	386,37±0,31 <sup>bcd</sup>
<b>0,7-10s</b>	89,27±0,29 <sup>c</sup>	6,18±0,09 <sup>d</sup>	1,80±0,02 <sup>d</sup>	12,35±0,03 <sup>f</sup>	79,67±0,08 <sup>a</sup>	384,29±0,32 <sup>a</sup>
<b>1-10s</b>	88,88±0,12 <sup>abc</sup>	5,85±0,02 <sup>cd</sup>	1,57±0,01 <sup>b</sup>	11,27±0,06 <sup>cd</sup>	81,31±0,03 <sup>bc</sup>	384,43±0,07 <sup>ab</sup>

Nota: Los datos se presentan en porcentaje (g/ 100g) en peso seco excepto la humedad (porcentaje en peso fresco) y Energía (kcal/ 100 g peso seco)

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

<sup>b)</sup> Las codificaciones de los tratamientos se encuentran en la tabla asdfa de Materiales y Métodos.

Tabla R. Contenido en Fibra Dietética Insoluble (FDI), Soluble (FDS) y Total (FDT), (g/100g) de *Pleurotus eryngii* producida a partir de paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. <sup>a) b)</sup>

PE	FDI	FDS	FDT
CONTROL	31,30±0,15 <sup>cd</sup>	3,89±0,08 <sup>ab</sup>	35,19±0,40 <sup>cde</sup>
<b>0,3-2p</b>	33,25±0,40 <sup>f</sup>	3,55±0,11 <sup>a</sup>	36,80±0,43 <sup>f</sup>
<b>0,3-5p</b>	28,47±0,11 <sup>a</sup>	3,84±0,11 <sup>ab</sup>	32,31±0,05 <sup>a</sup>
<b>0,7-2p</b>	32,20±0,08 <sup>ef</sup>	4,11±0,06 <sup>ab</sup>	36,31±0,11 <sup>ef</sup>
<b>0,7-5p</b>	32,10±0,07 <sup>de</sup>	3,51±0,08 <sup>a</sup>	35,62±0,11 <sup>def</sup>
<b>1-2p</b>	31,36±0,21 <sup>cde</sup>	4,30±0,08 <sup>bc</sup>	35,66±0,21 <sup>def</sup>
<b>1-5p</b>	30,14±0,16 <sup>b</sup>	4,39±0,21 <sup>bc</sup>	34,53±0,20 <sup>bcd</sup>
<b>0,3-10s</b>	30,40±0,16 <sup>bc</sup>	3,72±0,07 <sup>ab</sup>	34,13±0,10 <sup>bc</sup>
<b>0,7-10s</b>	28,58±0,17 <sup>a</sup>	5,00±0,31 <sup>c</sup>	33,58±0,48 <sup>b</sup>
<b>1-10s</b>	28,90±0,13 <sup>a</sup>	4,83±0,10 <sup>c</sup>	33,73±0,22 <sup>b</sup>

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

<sup>b)</sup> Las codificaciones de los tratamientos se encuentran en la tabla asdfa de Materiales y Métodos.

Tabla S. Contenido en Glucanos Totales,  $\alpha$ -glucanos y  $\beta$ -glucanos, (g/100g) de *Pleurotus eryngii* producida a partir de paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. <sup>a) b)</sup>

	Glucanos Totales	$\alpha$ -glucanos	$\beta$ -glucanos
<b>CONTROL</b>	56,80±0,52 <sup>a</sup>	15,30±0,04 <sup>h</sup>	41,50±0,48 <sup>a</sup>
<b>0,3-2p</b>	55,13±0,43 <sup>a</sup>	12,06±0,12 <sup>ef</sup>	43,07±0,48 <sup>ab</sup>
<b>0,3-5p</b>	54,08±0,16 <sup>a</sup>	13,76±0,21 <sup>g</sup>	40,33±0,10 <sup>a</sup>
<b>0,7-2p</b>	56,11±0,42 <sup>a</sup>	12,07±0,05 <sup>ef</sup>	44,04±0,45 <sup>abcd</sup>
<b>0,7-5p</b>	53,45±0,36 <sup>a</sup>	7,17±0,10 <sup>b</sup>	46,27±0,39 <sup>bcd</sup>
<b>1-2p</b>	56,44±1,01 <sup>a</sup>	8,71±0,05 <sup>c</sup>	47,73±1,00 <sup>cd</sup>
<b>1-5p</b>	55,31±1,41 <sup>a</sup>	11,59±0,07 <sup>e</sup>	43,72±1,47 <sup>abc</sup>
<b>0,3-10s</b>	54,21±0,30 <sup>a</sup>	6,18±0,14 <sup>a</sup>	48,03±0,36 <sup>d</sup>
<b>0,7-10s</b>	54,52±1,39 <sup>a</sup>	10,16±0,05 <sup>d</sup>	44,36±1,41 <sup>abcd</sup>
<b>1-10s</b>	56,72±1,09 <sup>a</sup>	12,15±0,01 <sup>f</sup>	44,57±1,10 <sup>abcd</sup>

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

<sup>b)</sup> Las codificaciones de los tratamientos se encuentran en la tabla asdfa de Materiales y Métodos.

Tabla T. Fenoles Totales y actividad antioxidante determinada por los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP de *Pleurotus eryngii* producida a partir de paquetes tratados con Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo. <sup>a) b)</sup>

PE	Fenoles Totales	DPPH±	ABTS	FRAP
<b>CONTROL</b>	92,05±7,11 <sup>ab</sup>	0,51±0,02 <sup>a</sup>	2,61±0,00 <sup>a</sup>	0,68±0,01 <sup>bc</sup>
<b>0,3-2p</b>	83,11±2,89 <sup>ab</sup>	0,55±0,00 <sup>a</sup>	2,84±0,01 <sup>ab</sup>	0,50±0,08 <sup>a</sup>
<b>0,3-5p</b>	137,58±9,24 <sup>ab</sup>	0,64±0,01 <sup>a</sup>	3,22±0,24 <sup>abcd</sup>	0,67±0,00 <sup>bc</sup>
<b>0,7-2p</b>	82,05±0,79 <sup>a</sup>	0,58±0,12 <sup>a</sup>	2,99±0,16 <sup>abc</sup>	0,66±0,00 <sup>abc</sup>
<b>0,7-5p</b>	124,95±21,05 <sup>ab</sup>	0,56±0,00 <sup>a</sup>	3,36±0,22 <sup>abcd</sup>	0,77±0,00 <sup>c</sup>
<b>1-2p</b>	97,05±11,05 <sup>ab</sup>	0,65±0,02 <sup>a</sup>	3,60±0,12 <sup>abcd</sup>	0,55±0,04 <sup>ab</sup>
<b>1-5p</b>	164,95±8,95 <sup>b</sup>	0,53±0,11 <sup>a</sup>	3,86±0,06 <sup>cd</sup>	0,76±0,00 <sup>c</sup>
<b>0,3-10s</b>	104,16±16,05 <sup>ab</sup>	0,57±0,03 <sup>a</sup>	3,39±0,37 <sup>abcd</sup>	0,72±0,03 <sup>c</sup>
<b>0,7-10s</b>	119,16±13,68 <sup>ab</sup>	0,64±0,01 <sup>a</sup>	4,16±0,07 <sup>d</sup>	0,80±0,01 <sup>c</sup>
<b>1-10s</b>	88,89±1,84 <sup>ab</sup>	0,46±0,03 <sup>a</sup>	3,68±0,21 <sup>bcd</sup>	0,69±0,01 <sup>bc</sup>

<sup>a)</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre setas (P < 0.05).

<sup>b)</sup> Las codificaciones de los tratamientos se encuentran en la tabla asdfa de Materiales y Métodos.

Contenido de Fenoles Totales: Ensayo de Folin-Ciocalteu (µg equivalente ácido gálico GAE/100mg); ensayo DPPH: scavenging activity, ABTS: radical scavenging activity and FRAP: Ferric reducing antioxidant power. (µmol equivalente Trolox TE/100mg).