



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

“Desarrollo de un alimento funcional formulado a partir de *Lentinula edodes* y *Lactobacillus spp.*”

TESIS

**Que para obtener el grado de
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA**

Presenta

LILIA SÁNCHEZ MINUTTI

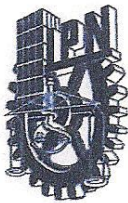
Directoras de tesis:

Dra. Silvia Luna Suárez

Dra. Mónica Rosales Pérez

Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala.

Noviembre 2011.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla de L. siendo las 8 horas del día 31 del mes de Octubre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de _____ para examinar la tesis titulada:

Desarrollo de un alimento funcional formulado a partir de *Lentinula edodes* y *Lactobacillus spp.*

Presentada por el alumno:

Sánchez Minutti Lilia
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	1	8	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Biotecnología Aplicada

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

Dra. Silvia Luna Suárez

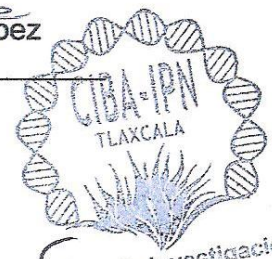
Co-Director(a) de tesis

Dra. Mónica Rosales Pérez

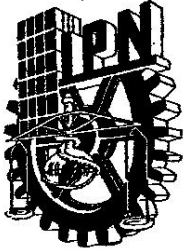
Dr. Victor Eric López y López

Dr. Fernando López Valdez

M. C. Lilia Tapia López



Presidente del Colegio de Profesores
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada




INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala el día 23 del mes Noviembre del año 2011, el (la) que suscribe Lilia Sánchez Minutti alumno (a) del Programa de Maestría en Biotecnología Aplicada con número de registro B091180, adscrito a CIBA-TLAX, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Silvia Luna Suarez y Dra. Mónica Rosales Pérez y cede los derechos del trabajo intitulado Desarrollo de un alimento funcional formulado a partir de *Lentinula edodes* y *Lactobacillus spp.* al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección minutti85@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Lilia Sánchez Minutti

Nombre y firma

AGRADECIMIENTOS.

A mis directores de tesis, la Dra. Silvia Luna Suárez y la Dra. Mónica Rosales Pérez por su gran enseñanza y por ayudarme a seguir adelante con mis metas.

A mis Asesores y Profesores, por sus aportes y orientaciones que me transmitieron a lo largo de mis estudios.

Al Instituto Politécnico Nacional, a PIFI y CONACYT por el apoyo con las becas otorgadas que me permitieron realizar mis estudios.

Índice general

	Pág.
Índice de tablas	i
Índice de figuras	ii
Abreviaturas, símbolos y unidades	iii
Resumen	iv
Abstrac	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Alimentos funcionales.....	2
2.2 Probióticos	2
2.2.1 <i>Lactobacillus</i> spp.	4
2.2.2 Caracterización de cepas con potencial probiótico.....	5
2.2.2.1 Antagonismo de los probióticos contra bacterias patógenas.....	5
2.2.2.2. Resistencia de los probióticos a pH ácidos.....	6
2.2.2.3 Resistencia de los probióticos a sales biliares.....	6
2.3 <i>Lentinula edodes</i>	7
2.3.1 Efecto hipocolesterolémico.....	8
2.3.2 Efecto anticarcinogéno.....	9
3. JUSTIFICACIÓN.....	11
4. OBJETIVOS.....	12
4.1 General	12
4.2 Particulares	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
5.1 Material biológico.....	13
5.2 Conservación de las cepas.	13
5.3 Morfológica de <i>Lactobacillus</i> spp.	13
5.4 Evaluación del potencial probiotico de <i>Lactobacillus</i> spp.	15
5.4.1 Antagonismo de las cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. contra bacterias patógenas.....	15
5.4.2. Resistencia de <i>Lactobacillus</i> spp. a pH ácido.....	15
5.4.3 Resistencia de <i>Lactobacillus</i> spp. a sales biliares.....	15

5.5 Establecimiento de las condiciones de crecimiento de <i>Lactobacillus</i> spp.....	16
5.5.1 Primera selección del medio de crecimiento	16
5.5.2 Segunda selección del medio de crecimiento.....	16
5.6 Acondicionamiento de <i>Lactobacillus</i> spp. para su integración al alimento	17
5.7 Acondicionamiento de <i>Lentinula edodes</i> para su integración en el alimento.....	17
5.7.1 Extracción de los compuestos antioxidantes y polifenoles totales.....	19
5.7.2 Determinación de la actividad antioxidante.....	19
5.7.3 Determinación de los polifenoles totales.....	19
5.7.4 Determinación de eritadenina	19
5.8 Determinación de las proporciones en que serán integrados <i>Lentinula edodes</i> y <i>Lactobacillus</i> sp. A5 en el alimento	20
5.9 Formulación de alimento	21
5.9.1 Primera evaluación de las fórmulas alimenticias.....	20
5.9.2 Segunda evaluación de las fórmulas alimenticias.....	20
5.9.3 Tercera evaluación de las fórmulas alimenticias.....	23
5.10 Evaluación del potencial funcional de las fórmulas alimenticias seleccionadas.....	23
5.10.1 Antagonismo de los alimentos contra bacterias patógenas.....	23
5.10.2 Viabilidad de <i>Lactobacillus</i> sp. en los alimentos.....	23
5.10.3 Determinación de la actividad antioxidante y polifenoles en los alimentos.....	24
5.10.4 Cuantificación de eritadenina en los alimentos.....	24
5.11 Análisis estadístico.....	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
6.1 Morfología microscópica y colonial de <i>Lactobacillus</i> spp.	25
6.2 Evaluación del potencial probiótico de las cepas de <i>Lactobacillus</i> spp.	25
6.2.1 Antagonismo de <i>Lactobacillus</i> spp. contra bacterias patógenas.....	26
6.2.2 Resistencia de <i>Lactobacillus</i> spp. a pH ácidos.....	27
6.2.3 Resistencia de <i>Lactobacillus</i> spp. a sales biliares.....	31
6.3 Establecimiento de las condiciones de crecimiento de <i>Lactobacillus</i> sp A5	36
6.3.1 Primera selección de los medios de crecimiento.....	36
6.3.2 Segunda selección de los medios de crecimiento.....	40
6.4 Acondicionamiento del hongo para su integración en el alimento	44
6.4.1 Determinación de la actividad antioxidante de los hongos tratados.....	45

6.4.2	Determinación de polifenoles totales en los hongos tratados.....	52
6.4.3	Relación entre la actividad antioxidante y polifenoles totales.....	58
6.4.4	Determinación de eritadenina en los hongos tratados.....	60
6.5	Determinación de las proporciones en que serán integrados <i>Lentinula edodes</i> y <i>Lactobacillus</i> sp. A5 en los alimento	65
6.6	Formulación del alimento	66
6.6.1	Primera evaluación sensorial de los alimentos.....	66
6.6.2	Segunda evaluación sensorial de los alimentos.....	67
6.6.3	Tercera evaluación sensorial de los alimentos.....	76
6.7	Evaluación del potencial funcional los alimentos.....	77
6.7.1	Antagonismo de los alimentos contra bacterias patógenas.....	77
6.7.2	Viabilidad de <i>Lactobacillus</i> sp. en los alimentos.....	81
6.7.3	Actividad antioxidante y polifenoles totales de los alimentos.....	84
6.7.4	Determinación de eritadenina en los alimentos.....	87
7.	CONCLUSIONES.....	89
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	90

Índice de tablas.

	Pág.
Tabla 1. Tratamientos de cocción y secado al hongo <i>Lentinula edodes</i>	18
Tabla 2. Fórmulas alimenticias de la primera evaluación.....	21
Tabla 3. Fórmulas alimenticias de la segunda evaluación.....	22
Tabla 4. Fórmulas alimenticias de la tercera evaluación.....	22
Tabla 5. Antagonismo de <i>Lactobacillus</i> spp. contra bacterias patógenas.....	26
Tabla 6. Características probióticas de las cepas de <i>Lactobacillus</i> spp.....	35
Tabla 7. Composición química de los medios de crecimiento de <i>Lactobacillus</i> sp. A5.....	38
Tabla 8. Composición química de los medios de crecimiento de <i>Lactobacillus</i> sp. A5.....	41
Tabla 9. Parámetros cinéticos de la cepa A5 en los medios de cultivo M2, M2a, M2b y M2c.....	43
Tabla 10. Porcentaje de captura del radical DPPH de los hongos tratados.	46
Tabla 11. Porcentaje de captura del radical DPPH de los mejores tratamientos aplicados al hongo.....	51
Tabla 12. Polifenoles totales en los hongos tratados.....	53
Tabla 13. Polifenoles totales de los mejores tratamientos aplicados a <i>Lentinula edodes</i>	56
Tabla 14. Correlación entre polifenoles totales y porcentaje de captura del radical DPPH en los hongos tratados.....	58
Tabla 15. Cuantificación de eritadenina de los tratamientos realizados al hongo <i>Lentinula edodes</i>	62
Tabla 16. Eritadenina de los mejores tratamientos aplicados a <i>Lentinula edodes</i>	64
Tabla 17. Concentración de <i>Lentinula edodes</i> y <i>Lactobacillus</i> sp. A5 agregadas a los alimentos.....	65
Tabla 18. Primera evaluación sensorial.....	67
Tabla 19. Segunda evaluación del sabor.....	69
Tabla 20. Segunda evaluación de todos los atributos sensoriales.....	72
Tabla 21. Puntaje de los criterios de selección de las fórmulas alimenticias.....	74
Tabla 22. Fórmulas alimenticias con mayor aceptación.....	75
Tabla 23. Tercera evaluación sensorial.....	76
Tabla 24. Antagonismo de las fórmulas 31´ y 65´ contra bacterias patógenas.	78
Tabla 25. Actividad antioxidante de las fórmulas 31´ y 65´.	85
Tabla 26. Polifenoles totales en las fórmulas 31´ y 65´.....	86
Tabla 27. Determinación de eritadenina en las fórmulas 31´ y 65´.....	88

Índice de figuras.

	Pág.
Figura 1. Diagrama general de trabajo	14
Figura 2. Morfología de <i>Lactobacillus</i> spp.....	25
Figura 3. Resistencia de <i>Lactobacillus</i> spp. en medio MRS a pH ácido.....	28
Figura 4. Supervivencia de <i>Lactobacillus</i> spp. a las 24 h de incubación a pH ácidos	30
Figura 5. Resistencia de <i>Lactobacillus</i> spp a sales biliares.....	32
Figura 6. Resistencia de <i>Lactobacillus</i> spp. a 24 h de incubación en sales biliares.....	34
Figura 7. Crecimiento de <i>Lactobacillus</i> sp. A5 en los medios M2, M3 y M5.....	37
Figura 8. Crecimiento de <i>Lactobacillus</i> sp. A5 con diferentes % de sacarosa.	41
Figura 9. Curva de calibración para la eritadenina.....	60
Figura 10. Viabilidad de la cepa A5 en las fórmulas 31´ y 65´.....	82
Figura 11. Curva de calibración para el cálculo del IC ₅₀ en las fórmulas 31´ y 65´	84

Abreviaturas, símbolos y unidades

°C	Grados centígrados
%	Porcentaje
mg	Miligramos
g	Gramos
ml	Mililitro
L	Litros
g/L	Gramos por litro
mm	Milímetros
pH	Potencial de hidrogeno
UFC/ml	Unidades formadoras de colonias por mililitro
rpm	Revoluciones por minuto
h	Horas
min	Minutos
MRS	Medio Man Rogosa y Sharphe
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
ATP	Trifosfato de adenosina
μ	Velocidad específica de crecimiento
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
GAE	Ácido gálico

Resumen.

Se elaboraron alimentos con potencial funcional, utilizando a *Lentinula edodes* y *Lactobacillus* sp. como ingredientes bioactivos. Para ello se realizó la caracterización de las cepas de *Lactobacillus* sp. A1, A2, A5 y B1 con potencial probiótico utilizando las técnicas de antagonismo contra bacterias patógenas, resistencia a sales biliares y resistencia a pH ácido. Se evaluaron tres medios de crecimiento para los lactobacilos los cuales fueron denominados como M2 (suero de leche 90 % y sacarosa 10 %), M3 (suero de leche 60 % y leche de soya 40 %) and M3 (leche de soya 75 %, sacarosa 10 % y agua 15%), en el medio M2 se varió el porcentaje de sacarosa añadida y se determinó el crecimiento de la cepa A5, estos medios fueron denominados como M2a (5 % de sacarosa), M2b (2.5 % de sacarosa) y M2c (0 % de sacarosa). Por otra parte, se determinó la captura del radical DPPH, polifenoles totales y concentración de eritadenina en el hongo *Lentinula edodes* sometido a tratamientos de cocción y secado. Los alimentos elaborados con *Lentinula edodes* y *Lactobacillus* sp. fueron evaluados sensorialmente utilizando una prueba hedónica, además de determinar antagonismo, viabilidad, concentración de antioxidantes, polifenoles totales y eritadenina. Se encontró que las cepas de *Lactobacillus* sp. A1, A2, A5 y B1 presentaron potencial probiótico; la cepa A5 fue la que presentó mejores características probióticas por lo cual fue utilizada para la elaboración de los alimentos con potencial funcional, el medio M2a fue el seleccionado para el crecimiento para la cepa A5, la cual fue integrada junto con el medio de crecimiento en los alimentos al 20 %, con un inóculo inicial de 2×10^7 UFC/ml de la cepa A5 inoculada en el medio M2a incubada a 37 °C/16 h. Por otro lado, *Lentinula edodes* fue secado a 4 °C con un asado por 2 min e integrado al 9 y 4.5 % en los alimentos. Las fórmulas alimenticias 31' y 65' correspondientes a un queso y un chamoy, respectivamente, fueron las mejor evaluadas por los panelistas y presentaron actividad antagónica contra *E. coli*, *S. aureus* y *S. typhimurium*. La cepa de *Lactobacillus* sp. A5 en las fórmulas 31' y 65' se mantuvo viable en los 14 días de almacenamiento. Se encontró un efecto por el agregado del hongo y las bacteria en los alimentos sobre su actividad antioxidante (104.0 y 30.3 mg/ml en el queso y chamoy, respectivamente), polifenoles totales (3.0 ± 0.2 y 5.9 ± 0.2 mg GAE/g muestra seca, respectivamente) y eritadenina (53.5 ± 2.8 y 39.5 ± 5.7 , respectivamente). Las fórmulas 31' y 65' elaboradas en este trabajo presentaron todos los elementos necesarios para poder ser consideradas alimentos con potencial funcional.

Abstrac.

Foods with functional potencial we prepared using *Lentinula edodes* and *Lactobacillus* sp. as bioactive ingredients. *Lactobacillus* sp. A1, A2, A5 and B1 strains with probiotic potential we characterized using the techniques of antagonism against pathogenic bacteria, resistance to bile salts and acid pH resistance. The media evaluated for lactobacilli were made and called M2 (whey 90 % and sucralose 5 %), M3 (whey 60 % and soy milk 40 %) and M3 (soy milk 75 %, sucralose 10 % and water 15 %); the media M2 was changed the percentage of added sucrose and determined the growth of strain A5, these were called as M2a (5 % sucralose), M2b (2.7 % sucralose) and M2c (0 % sucralose). Furthermore, was determined the reducing power with the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, total polyphenols and eritadenine in *Lentinula edodes* after to boiling and drying treatments. The foods add with *Lentinula edodes* and *Lactobacillus* sp. were evaluated using a hedonic sensory test, subsequently, the antagonist capacity, viability, reducing power, totals polyphenols and eritadenina were determined. These assays demonstrated the probiotic potential of four strains of *Lactobacillus* sp. (A1, A2, A5 and B1). The A5 was the best and was used to prepare foods with functional potential. The media M2a was selected for growth for the A5 strain and integrated at 20 % in food, initial inoculum was of 2×10^7 CFU/ ml of A5 strain A5 inoculated in the medium M2a at 37 ° C/16 h. On the other hand, *Lentinula edodes* was dried at 4 ° C with subsequent roast for 2 min and integrated 9 and 4.5% food. The food formulas 31 'and 65' of cheese and chamoy, respectively, were the best evaluated by the panelists and presented antagonistic activity against *E. coli*, *S. aureus* and *S. typhimurium*. The A5 strain of *Lactobacillus* sp. in the food formulas (31', 65') remained viable to 14 days of storage. We found a additional effect over reducing power (104.0 and 30.3 mg/ml in cheese and chamoy, respectively) total polyphenols (3.0 ± 0.2 and 5.9 ± 0.2 mg GAE/ g dry sample , respectively) and eritadenine (53.5 ± 2.8 and 39.5 ± 5.7 , respectively) of food formulas added mushroom and bacteria. The food formulas 31 'and 65' made in this work showed all the necessary elements to be considered potential functional foods.

1. INTRODUCCIÓN.

El concepto de alimentación ha evolucionado, en un pasado se enfocaba a proveer nutrientes al organismo, se adquirían alimentos por los beneficios de sus componentes que ayudaban al crecimiento y desarrollo. El concepto actual de alimentación es más variado e incluye la prevención de enfermedades, además de promover una calidad de vida mejor ante circunstancias patológicas.

Debido a la preocupación por los consumidores de una mejor alimentación, la industria alimentaria ha creado productos que reúnan los requisitos del concepto actual de alimentación, surgiendo los alimentos funcionales. La Academia Nacional de Ciencia de los Alimentos y Nutrición, define a los alimentos funcionales como cualquier modificación en un alimento o ingredientes del alimento que puedan brindar un efecto en la salud, más allá de los nutrientes que contiene (Hasler, 2002).

Los alimentos funcionales ejercen su actividad en múltiples sistemas, especialmente el gastrointestinal, cardiovascular e inmunológico (Silveira y col., 2003) teniendo como complemento una dieta balanceada. Modificar un alimento para convertirlo en funcional implica incrementar, eliminar o concentrar algún ingrediente o compuesto, tales ingredientes pueden ser obtenidos de fuentes bacterianas, animales, plantas u hongos. Una clasificación de los alimentos funcionales con base a su valor nutritivo es la siguiente: alimentos con alto contenido nutricional (por ejemplo, el yogurt), bajo contenido nutricional (por ejemplo, los condimentos), alimentos saludables no convencionales (por ejemplo, el shiitake), alimentos condicionados (por ejemplo, el cacao) y alimentos controvertidos (por ejemplo, el vino y cerveza).

Dentro de los alimentos funcionales que son elaborados por la adición de un compuesto están los integrados con probióticos, éstos son microorganismos que sobreviven al paso gastrointestinal y colonizan el intestino ejerciendo beneficios en su consumidor, son ampliamente utilizados en la industria para la elaboración de leches y vegetales fermentados, en la elaboración del pan y yogurt. Algunas especies de *Lactobacillus* spp. son consideradas como probióticas y entre algunas de sus funciones pueden colonizar el tracto gastrointestinal, por lo cual son relacionadas con el aumento de la inmunidad contra infecciones intestinales, con la prevención de enfermedades diarreicas, cáncer de colon, hipocolesterolemia, enfermedades gastrointestinales y estabilización la barrera de mucosa en el intestino (Kailasapathy y Chin, 2000).

Por otro lado, *Lentinula edodes* (shiitake) puede ser utilizado como un ingrediente en los alimentos debido a sus propiedades terapéuticas, este hongo es usado ampliamente en la medicina china y su incorporación en la alimentación produce efectos benéficos como el inmunomodulador, hipocolesterolémico, hepatoprotector, antibacteriano, antiparasitario, actividad antiviral y anticarcinogénico (Wasser, 2005). Es un alimento considerado como no convencional en México por el consumo no generalizado en la población en comparación con otros hongos comestibles.

En los últimos años el consumo de hongos ha aumentado junto con la preocupación pública de dieta y salud (Ghorai y col., 2009), la incorporación de ingredientes o compuestos con actividad fisiológica en los alimentos está tomando mayor fuerza y el estilo de vida de la población es un factor determinante. En el presente trabajo se elaboró un alimento con potencial funcional que representa una opción para disminuir factores de riesgo que puedan desencadenar en algunas patologías.

2. ANTECEDENTES.

En los años 70 las principales causas de muerte en México eran atribuidas a diarreas, neumonías, enfermedades de la infancia e infecciones; actualmente las enfermedades que atacan a la población son distintas y están relacionadas con factores de riesgo (obesidad, consumo excesivo de alcohol, tabaco, mala nutrición, etc.) y estilos de vida no dinámicos. El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2009) reportó las principales causas de muerte en México relacionadas con factores de riesgo y entre ellas se encontraron las enfermedades del corazón, diabetes mellitus y tumores malignos.

Las enfermedades que en un principio preocuparon a la población como las diarreas e infecciones pasaron a ser secundarias, debido al avance de la tecnología, la mayor accesibilidad a médicos, el incremento en tratamientos terapéuticos, el cambio en el estilo y esperanza de vida de la población, sin embargo, el surgimiento en otras enfermedades generó la preocupación de la población y surgieron alternativas para reducir o prevenir factores que promuevan la incidencia de las enfermedades como arterioesclerosis, cáncer y enfermedades del corazón y una de ellas es el consumo de alimentos funcionales.

2.1 Alimentos funcionales.

El uso de los alimentos funcionales tuvo su origen en Japón en 1980 y actualmente se engloban bajo el nombre de FOSHU: Alimentos de Uso Dietético Especial, el Instituto de Medicina y la Academia Nacional de Ciencias (1994) definieron a los alimentos funcionales como cualquier alimento o ingredientes que provean un efecto benéfico a la salud más allá de los efectos benéficos causados por los nutrientes que contiene (Hasler, 2002). Los alimentos funcionales deben de ser inocuos, no generar componentes nocivos a la salud, el componente activo debe estar caracterizado, cuantificado y su función debe ser conocida; los alimentos funcionales deben mostrar función biológica y ser consumidos en cantidades de consumo regulares, no en presentaciones como píldoras, pastillas o comprimidos (Dipplock y col., 1999).

En la primera Reunión Plenaria de Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa: Estado del Arte (1996) se destacaron seis áreas de interés para el desarrollo de los alimentos funcionales, las cuales fueron la función digestiva, antioxidante, metabolismo intermediario, sistema

cardiovascular-gastrointestinal, crecimiento-desarrollo y la función cognitiva (Dipplock y col., 1999).

Los probióticos son considerados como elementos que integrados en los alimentos los pueden ejercer beneficios en sus consumidores.

2.2 Probióticos.

El término probiótico se refiere a una preparación o producto que contenga microorganismos viables, en suficiente número que alteren la microflora intestinal y ejerzan efectos benéficos en la salud del hospedero (Havenaar y Huis In't Veld, 1992). Para poder proporcionar un beneficio deben estar en cantidades adecuadas en el alimento y asegurar su supervivencia por el tracto gastrointestinal, la dosis mínima recomendable de probióticos en un alimento debe ser de 10^6 UFC/g o ml y para efectos terapéuticos de 10^7 UFC/g o ml por día (Chávarri y col., 2010).

La caracterización de especies de *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. con potencial probiótico ha sido de importancia para la aplicación de estos microorganismos en la industria alimentaria. Algunos microorganismos considerados como probióticos son: *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. delbrückii*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. ruteri*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Sporolactobacillus insulinus* y *Streptococcus thermophilus* (Holzapfel y col., 2001).

2.2.1 *Lactobacillus* spp.

Las bacterias del género *Lactobacillus* spp. son microorganismos pertenecientes a la clase Bacilli, orden Lactobacillales, familia Lactobacillaceae (Tannock, 2004), se conocen alrededor de 97 especies diferentes, caracterizadas por habitar en el intestino humano y de algunos animales y ser capaces de soportar condiciones drásticas por su paso a través del tracto gastrointestinal y colonizar el intestino humano. *Lactobacillus* spp. es un bacilo Gram positivo, catalasa negativo y no esporulado (Holzapfel, 2001). Producen ácido láctico como único producto de su fermentación (homofermentativo) y ácido láctico junto con otros ácidos como el acético (heterofermentativo) (Tannock, 2004).

Algunos de los beneficios reportados por el consumo de *Lactobacillus* spp. a la salud son la mejora del sistema inmune (Schiffrin y col., 1995), la reducción del riesgo de enfermarse (Tannok, 2004), la prevención de infecciones intestinales (Kailasapathy y Chin, 2000), la mejora en la utilización de la lactosa (Kim y col., 2008, Kim y col., 1983), la estabilización de la barrera de mucosa en el intestino (Kailasapathy y Chin, 2000) y la prevención de cáncer (McIntosh y PhD, 1996).

Lactobacillus spp. puede ser ingerido en un alimento sin causar daño a sus consumidores, esto se debe a que está clasificado como un microorganismo seguro y es un habitante normal del tracto gastrointestinal de los humanos, en la cavidad oral se han reportado de 10^3 - 10^6 *Lactobacillus*/ml de saliva, en el estómago 10^3 *Lactobacillus*/ml y en las heces 10^3 - 10^9 *Lactobacillus*/g (Tannock, 2005).

2.2.2 Caracterización de cepas con potencial probiótico.

La búsqueda de cepas de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico ha sido desarrollada tomando en cuenta criterios que confirmen su actividad como posibles microorganismos benéficos, en el estudio de nuevas cepas, los efectos positivos a la salud del hospedero podrían incrementarse en referencia a los ya estudiados y se podría entender la interacción existente entre la fuente de aislamiento y las bacterias que la colonizan. Algunas características requeridas para la selección de cepas probióticas son el antagonismo contra bacterias patógenas, la resistencia a la acidez gástrica y sales biliares, la colonización y adherencia en el intestino (Chávarri y col., 2010). La capacidad de las células para sobrevivir a las condiciones gástricas, a la bilis y de adherirse al epitelio intestinal puede conferir una ventaja competitiva y es importante para el mantenimiento de bacterias en el tracto gastrointestinal humano (Naidu y col. 1999).

A continuación se describen algunas características de las cepas con potencial probiótico.

2.2.2.1 Antagonismo de los probióticos contra bacterias patógenas.

Se ha reportado que los probióticos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de algunas bacterias patógenas, entre ellas *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *E. coli* (Langhendries y col., 1995). El efecto antagonista de *Lactobacillus* spp. se atribuye principalmente a la producción de sustancias llamadas bacteriocinas, de constitución peptídica y biológicamente activas, capaces de destruir la integridad de la membrana citoplasmática del patógeno por la

formación de poros, provocando la salida de compuestos pequeños o alterando la fuerza motriz de los protones, necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácidos nucleicos (Montville y Chen, 1998; Chikindas y col., 1993). Aunado a las bacteriocinas, la producción de ácidos orgánicos está relacionada con la disminución de pH del medio y la inhibición del crecimiento de cepas patógenas (Langhendries y col., 1995).

2.2.2.2. Resistencia de los probióticos a pH ácidos.

Las bacterias con características probióticas deben de resistir a pH ácidos. Cuando los probióticos son ingeridos, las bacterias deben de recorrer la cavidad oral, pasar al estómago y posteriormente llegar al intestino para colonizarlo. Es de importancia su paso por el estómago, aquí las bacterias se encuentran sometidas a condiciones de estrés por pH ácido. El pH del estómago (2 a 3) es proporcionado por la presencia de ácido clorhídrico y pepsinas que ayudan a la degradación de los alimentos. La resistencia de *Lactobacillus* spp. a pHs ácidos puede deberse a la formación de un gradiente de pH entre el medio extracelular y el citoplasma bacteriano, en bacterias Gram positivas se ha observado un mecanismo de protección a estas condiciones y se ha descrito la actividad del complejo enzimático FoF₁-ATPasa, el cual mantiene un gradiente de tolerancia a pH ácido por la traslocación de protones a través de canales de membrana hacia el medio extracelular, esta actividad enzimática puede modular el pH intracelular (Corcoran, 2005).

Chandramouli y col. (2004) reportaron las condiciones óptimas para proteger a *Lactobacillus* spp. en condiciones gástricas artificiales y una de ellas fue encapsulando las bacterias con alginato de calcio, ellos encontraron conteos altos de células viables en comparación con las bacterias no encapsuladas.

2.2.2.3 Resistencia de los probióticos a sales biliares.

Las sales biliares son tóxicas para las células, la microbiota intestinal autóctona ha desarrollado estrategias para defenderse de éstos compuestos (Noriega y col., 2004). Al ingerir un alimento con *Lactobacillus* spp., las bacterias llegan al intestino donde deben de resistir la acción de la bilis. La bilis es una secreción digestiva que desempeña un papel importante en la emulsificación de los lípidos, tiene la capacidad de afectar a los fosfolípidos y proteínas de las membranas celulares y alterar la homeostasis celular (Burns y col., 2008). Es un fluido generado por la secreción hepática y modificado por la vía biliar en su tráfico desde el hepatocito hacia la vesícula biliar y el intestino,

sus principales solutos son las sales biliares (68 %), la lecitina (22 %), el colesterol (4 %) y la bilirrubina (0.3 %).

Las sales biliares se dividen en primarias y secundarias. Las primarias (ácido glucocólico, glucoquenodesoxicólico, taurocólico y tauroquenodesoxicólico) son sintetizadas en el hígado como resultado de la conjugación del ácido cólico y quenodesoxicólico con la glicina y la taurina. Las secundarias (ácido desoxicólico y litocólico) son sintetizadas en el intestino y se forman por la acción enzimática de algunas bacterias (Hofmann, 1984).

Algunas bacterias probióticas pueden desarrollar mecanismos de resistencia a sales biliares por la producción de hidrolasas de sales biliares, las cuales las desconjugan a la taurina utilizandola como último aceptor de electrones y reduciendo la toxicidad de éstas sales, sin embargo, no todas las bacterias que sintetizan estas hidrolasas pueden resistir a las sales biliares (Moser y Savage, 2001). Gómez y col. (2002) reportaron que una exposición a largo plazo de bacterias a la bilis puede causar cambios metabólicos que afectan sus propiedades adhesivas de manera irreversible, esto puede tomarse como un criterio para definir las propiedades probióticas de cepas diferentes.

2.3 *Lentinula edodes*.

Para que un alimento funcional pueda ser considerado como tal, debe de tener concentrado, reducido, integrado o eliminado algún ingrediente o compuesto con actividad benéfica al organismo, el hongo *Lentinula edodes* puede ser considerado como un elemento para convertir un alimento en funcional.

Lentinula edodes (shiitake) es un hongo comestible, ocupa el 2do. lugar de producción a nivel mundial después de *Agaricus bisporus* (Ghorai y col., 2009). México genera alrededor del 58.6 % de la producción total de latinoamérica, ubicándose como el 18vo. productor a nivel mundial, en los últimos años el incremento en la producción de hongos comestibles en países latinoamericanos ha aumentado (Martínez-Carrera, 2002).

Su nombre está asociado con el árbol del Shii (*Castanopsis cuspidate*) y la palabra take (hongo) (Wasser, 2005), es un organismo saprófito, crece sobre madera muerta en el árbol del Shii, roble y haya, de pudrición blanca, muy apreciado por su sabor característico y buena fuente de proteínas,

carbohidratos y algunos elementos como hierro y zinc, además de ser bajo en grasas y contener polisacáridos y compuestos que promueven la salud de los individuos (Longvah y Deosthale, 1998).

Lentinula edodes es ampliamente usado en la medicina tradicional China debido a las propiedades funcionales que presenta (Enman, 2007). Algunos efectos benéficos reportados por el consumo de este hongo son el efecto inmunomodulatorio (Wang y Lin, 1996), hipocolesterolémico (Enman, 2007), anticarcinogénico (Chihara y col, 1969), hepatoprotector (Akamatsu, 2004), actividad antiviral (Suzuki y col., 1989), antibacterial y antiparasitario (Bender y col., 2003).

A continuación se describen algunos efectos benéficos reportados por el consumo del hongo *Lentinula edodes*.

2.3.1 Efecto hipocolesterolémico.

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad a nivel mundial, altos niveles de colesterol en la sangre son un factor de riesgo para el desarrollo de éstas enfermedades (Mensah y Brown, 2007). La búsqueda y desarrollo de nuevos alimentos que ayuden a la población a disminuir enfermedades está tomando mayor auge. Shimada y col. (2003) reportaron en el hongo *Lentinula edodes* el compuesto llamado eritadenina o ácido (2R), 3 (R)-4(9-adenil) butírico y al cual se le atribuye el efecto hipocolesterolémico.

La acción hipocolesterolémica de la eritadenina ha sido investigada, sin embargo, el mecanismo por el cual causa tal efecto no está bien entendido (Enman, 2007). Shimada y col. (2003) sugirieron que un cambio en el metabolismo de fosfolípidos en el hígado podría generar éste efecto, específicamente por un descenso de la relación fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. La reducción de ésta relación se debe a que la eritadenina es un potente inhibidor de la enzima S-adenosilhomocisteina hidrolasa; al inhibir esta enzima hay un incremento en la concentración de la S-adenosilhomocisteina, que a su vez, inhibe diferentes metiltransferasas reduciendo la producción de fosfatidilcolina. Enman y col. (2007) reportaron que en futuros estudios se puede sugerir que éste cambio en la concentración de fosfolípidos puede aumentar la absorción del colesterol por lipoproteínas plasmáticas y reducir el colesterol.

Se han realizado estudios en ratas y humanos en los cuales se ha observado el efecto de agregar

eritadenina a su dieta. Wasser (2005) agregó eritadenina (0.005 %) en la dieta de ratas y encontró un descenso del 25 % del colesterol total en una semana. Suzuki y col. (1974) suministraron 90 g de *Lentinula edodes* fresco/ día en humanos durante una semana y observaron la disminución de los niveles de colesterol en un 12 %.

Otro de los beneficios atribuidos por el consumo del hongo *Lentinula edodes* es el efecto anticarcinogéno.

2.3.2 Efecto anticarcinogéno.

Se entiende por agente cancerígeno a un compuesto que tiene la capacidad de inducir o causar una neoplasia (Bello y col., 2001). Muchos de los hábitos de vida poco saludables son los responsables una mayor incidencia en el desarrollo de tumores, es decir, un agente cancerígeno no da lugar a la aparición de tumores bajo cualquier circunstancia, sino que se encuentra condicionado a diversos factores (Bello y col., 2001).

Los seres humanos están expuestos a una amplia gama de compuestos que contienen nitrógeno y agentes nitrosantes como los nitritos, nitratos y óxidos de nitrógeno, que pueden reaccionar *in vivo* para formar compuestos N-nitrosos cancerígenos (Bartsch y col., 1996). Los compuestos N-nitrosos se encuentran en agua y verduras debido a la existencia de nitratos y nitritos en el suelo, en las carnes y embutidos donde utilizan a los nitratos y nitritos para conservarlos y curarlos, en las bebidas alcohólicas como el whisky debido a la aparición de aminas secundarias en el proceso de fermentación, en el tabaco y sus humos (Ansorena y col., 2003). Los procesos carcinógenos, por el consumo de alimentos, puede iniciar con la reducción de nitratos a nitritos por acción de la saliva seguida de una reacción en el estómago con las amidas y aminas para formar nitrosamidas (compuestos N-nitrosos) que inducen al cáncer.

Algunos compuestos que inhiben la formación de los compuestos N-nitrosos por la destrucción de los agentes nitrosantes son el ácido ascórbico, los tocoferoles, los compuestos antioxidantes y fenólicos (Bartsch y col., 1996).

Los antioxidantes son compuestos que actúan como captore de radicales libres neutralizando especies reactivas de oxígeno e iones metálicos quelantes (Satué-Gracia y col., 1997). Algunos compuestos fenólicos que capturan radicales libres son los flavones, flavonoides, antocianinas,

entre otros, estos compuestos han sido reportados en frutas y verduras y se ha encontrado una relación inversa entre el consumo de estos alimentos y el riesgo de padecer enfermedades (Reyes y col., 2007).

Se ha reportado que los hongos comestibles contienen compuestos fenólicos con capacidad antioxidante (Kyoung y col., 2010; Ferreira y col., 2007; Heleno y col., 2010). Los procesos de cocción en los hongos pueden incrementar la concentración de antioxidantes, tal y como lo reportó Choi y col. (2005) quienes encontraron en *Lentinula edodes* un incremento de polifenoles totales y antioxidantes en hongos calentados a 100 °C y 121 °C por 15 y 30 min.

Otro compuesto de interés en el hongo shiitake es el ácido thiazolidina-4-carboxílico o tioprolina, el cual ha demostrado tener efectos anticancerígenos debido al bloqueo de compuestos N-nitrosos, la tioprolina es producida por hongos secos sometidos a un proceso de calentamiento (Wasser, 2005).

La tioprolina es un producto no enzimático resultado de la condensación de cantidades equimolares del formaldehído y L-cisteína (Unger y Demoss, 1966). Capaz de atrapar los nitritos en el cuerpo permitiendo que sean removidos en la orina funcionando como un compuesto antioxidante (Jones, 1995).

3. JUSTIFICACIÓN.

La incidencia de enfermedades como la hipocolesterolemia, disfunciones del tracto digestivo y cáncer son cada vez más comunes en la población. Existen alimentos que aparte de suministrar los nutrientes necesarios para el mantenimiento del cuerpo, pueden tener un efecto benéfico en la salud. La preocupación de la población por mejorar su salud por medio de los alimentos funcionales ha venido aumentando en los últimos tiempos, el presente trabajo tuvo como finalidad desarrollar un alimento con potencial funcional a partir de los complementos *Lentinula edodes* y *Lactobacillus* sp. los cuales podrían ayudar a prevenir o reducir el riesgo de padecer enfermedades crónico degenerativas.

Tanto *Lactobacillus* spp. como *Lentinula edodes* han demostrado tener efectos benéficos en la salud. La elaboración de un alimento con potencial funcional a partir de estos dos complementos podría incrementar el beneficio en los consumidores por interacción entre ellos y como consecuencia podrían ayudar a prevenir o reducir el riesgo de padecer enfermedades.

4. OBJETIVOS.

4.1 General.

Desarrollar un alimento con potencial funcional a partir de *Lentinula edodes* y *Lactobacillus* sp.

4.2 Particulares.

- Evaluar el potencial probiótico de las cepas de *Lactobacillus* spp.
- Determinar las condiciones adecuadas de cultivo para el crecimiento de *Lactobacillus* spp.
- Realizar el acondicionamiento del hongo para su incorporación en el alimento.
- Determinar las proporciones en que se van a integrar *Lentinula edodes* y *Lactobacillus* spp. en el alimento.
- Establecer la metodología para la incorporación de *Lactobacillus* spp. en el alimento.
- Determinar el efecto de la adición de los diferentes componentes en el alimento.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

Para la realización de este trabajo se planteó el diagrama de trabajo (Figura 1) y la metodología descrita en los siguientes puntos.

5.1 Material biológico.

Para la realización de este trabajo se utilizaron cuatro cepas de *Lactobacillus* spp. nombradas como A1, A2, A5, B1 aisladas de agua miel de agaves de la región de Zacatlán en el estado de Puebla. Como controles positivos se utilizaron las cepas *Lactobacillus* sp. 22 caracterizada como probiótica y una cepa aislada del producto comercial Yakult.

El hongo *Lentinula edodes* se adquirió en la región de Belén en el estado de Tlaxcala.

En las pruebas de antagonismo se utilizaron las cepas indicadoras de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* 6538P (ENCB-IPN) y EHEC EDL 9333 (CIBA-TLAX).

Para la elaboración de medios de crecimiento para *Lactobacillus* spp. se utilizó suero de leche de vaca proporcionado por de la empresa Lacto productos La Providencia S.A. de C.V.

5.2 Conservación de las cepas.

Las cepas A1, A2, A5 y B1 se sembraron las en caldo De Man Rogosa y Sharpe (MRS) incubándose a 37 °C/24 h en condiciones de anaerobiosis, el cultivo fue centrifugado a 10,000 rpm/10min/4°C, se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en caldo MRS con 20 % de glicerol vertiéndose en crioviales para su almacenamiento en un ultracongelador (-70°C).

5.3 Morfología de *Lactobacillus* spp.

Se confirmó la morfología microscópica y colonial de las cepas A1, A2, A5 y B1 por medio de la prueba de tinción de Gram y la identificación de colonias típicas en placa.

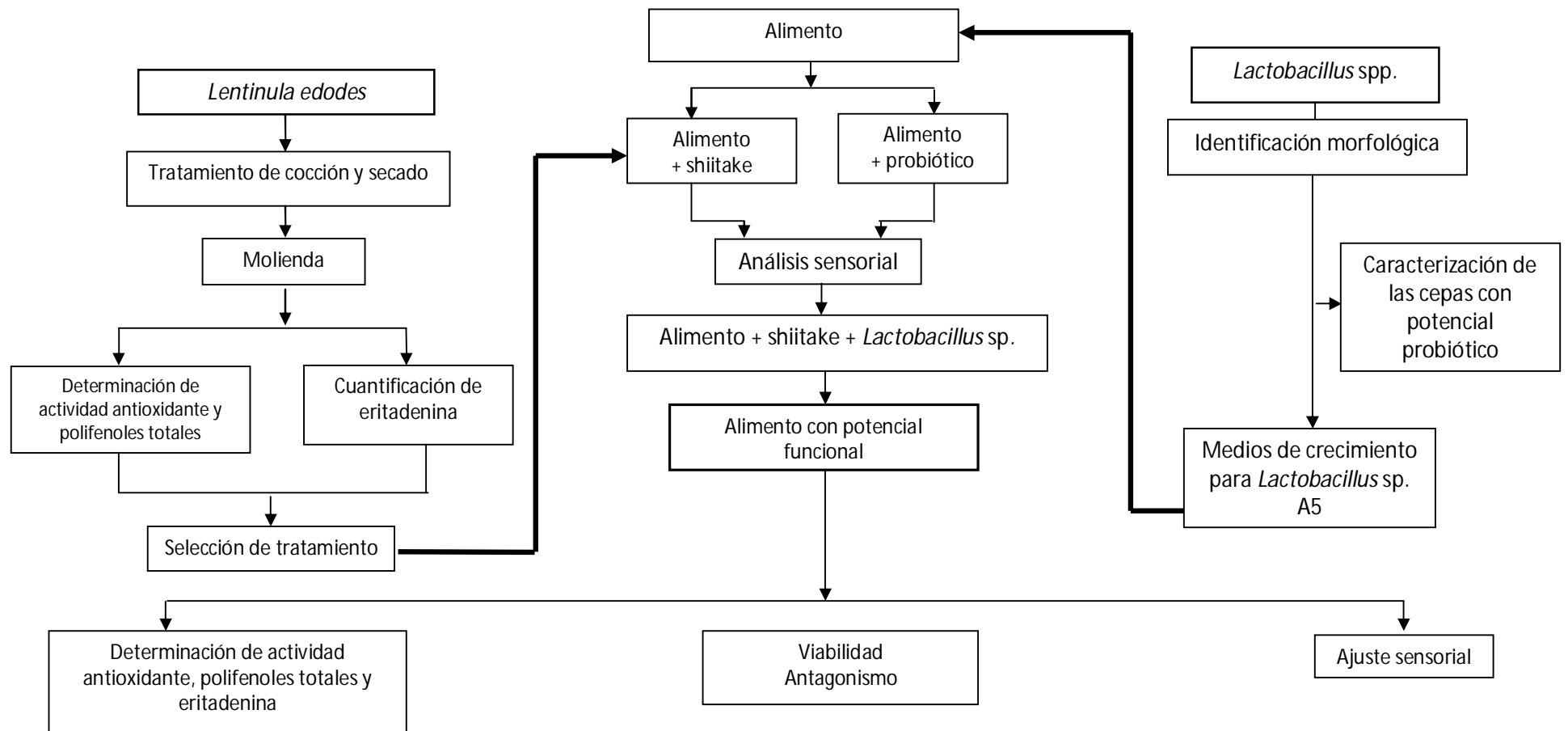


Figura 1. Diagrama general de trabajo.

5.4 Evaluación del potencial probiótico de *Lactobacillus* spp.

La caracterización de las cepas de *Lactobacillus* spp. A1, A2, A5 y B1 como probióticas se llevó a cabo con las pruebas de antagonismo, resistencia a pH ácidos y resistencia a sales biliares, las cuales se describen a continuación.

5.4.1 Antagonismo de las cepas de *Lactobacillus* spp. contra bacterias patógenas.

La prueba de antagonismo fue realizada entre los lactobacilos y las cepas indicadoras de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* 6538P y EHEC EDL 9333 según la técnica descrita por Rammelsberg y Radler (1990) con algunas modificaciones, las cuales consistieron en un ajuste de inóculo de las bacterias indicadoras a 9×10^8 UFC/ml y el depósito de 220 μ l de sobrenadante de *Lactobacillus* spp. en la placa de agar de soya tripticaseína. El halo de inhibición fue medido con ayuda de una regla milimétrica.

5.4.2. Resistencia de *Lactobacillus* spp. a pH ácido.

Se evaluó la resistencia de las cepas A1, A2, A5 y B1 a pH de 2.5 y 3.5 en caldo MRS con un inóculo de 2×10^7 UFC/ml, incubándose a 37 °C/24 h, posteriormente se determinó la viabilidad de las cepas por conteo de colonias en placa por el método de Miles & Mirsa (Miles y col., 1938) con algunas modificaciones las cuales consistieron en agregar 20 μ l de la muestra en la caja de agar, como control positivo se utilizó la cepa de *Lactobacillus* sp. 22 caracterizada como probiótica. Se registró el pH en cada tiempo de muestreo.

5.4.3 Resistencia de *Lactobacillus* spp. a sales biliares.

Para la realización de esta prueba se siguió la técnica descrita por Burns y col. (2008). Se prepararon tubos de caldo MRS con 0.3 % de hiel y 0.3 % de ácido taurocólico, posteriormente se inocularon con 2×10^7 UFC/ml de las cepas A1, A2, A5 y B1 y se incubaron a 37 °C/24 h. La resistencia de las cepas fue monitoreada por el conteo de las células viables. Se registró el pH en los tiempos evaluados. Como controles positivos se utilizaron las cepas de *Lactobacillus* sp. 22 caracterizada como probiótica y cepa aislada del producto comercial de Yakult®.

5.5 Establecimiento de las condiciones de crecimiento de *Lactobacillus* spp.

Se elaboraron medios de crecimiento para *Lactobacillus* spp. formulados con leche de soya y suero de leche como componentes principales, posteriormente se realizó la optimización del medio seleccionado a fin de obtener un mayor crecimiento celular. Los medios evaluados se mencionan a continuación.

5.5.1 Primera selección del medio de crecimiento.

Se elaboraron tres medios de crecimiento tomando como base lo reportado por Savoie y col. (2007); Dimitrijevic-Brankovic y Baras (2001); Pescuma y col. (2008), los medios fueron denominados como M2 (suero de leche 90 % y sacarosa 10 %), M3 (leche de soya 75 %, sacarosa 10 % y agua 15 %) y M5 (suero de leche 60 % y leche de soya 40 %), se prepararon ajustado el pH a 6.5, posteriormente se inocularon con 2×10^7 UFC/ml de la cepa A5 y se incubaron a 37 °C/72 h, se registraron los conteos de células viables . Como blanco se utilizó el medio de crecimiento sin inóculo.

5.5.2 Segunda selección del medio de crecimiento.

De los medios anteriores se seleccionó el medio M2 y se evaluó el efecto de la adición de la sacarosa sobre el crecimiento de *Lactobacillus* sp. A5. Los medios fueron denominados como M2a (suero de leche 95 % y sacarosa 5 %), M2b (suero de leche 97.5 % y sacarosa 2.5 %) y M2c (suero de leche 100% y sacarosa 0 %). A cada medio se le agregó un inóculo de 2×10^7 UFC/ml y se incubó a 37 °C/72 h monitoreando el crecimiento de la cepa por el conteo de células viables.

5.6 Acondicionamiento de *Lactobacillus* spp. para su integración al alimento.

Seleccionada la cepa con potencial probiótico y seleccionado el medio de crecimiento, se determinó la forma en que serían acondicionadas las bacterias para su incorporación en el alimento, esto se realizó de dos maneras.

La primera consistió en agregar directamente las bacterias ácido lácticas junto con el medio de crecimiento, para ello se sembraron 2×10^7 UFC/ml de la bacteria de *Lactobacillus* sp. en el medio de crecimiento seleccionado y se incubaron por 16 h a 37 °C.

La segunda forma de acondicionamiento consistió en el agregado del paquete celular sin el medio de crecimiento, para ello se sembraron las bacterias en las condiciones de crecimiento anteriores y se centrifugó a 10,000 rpm/4 °C/5 min, el sobrenadante fue retirado y el paquete celular se lavó dos veces con agua destilada.

5.7 Acondicionamiento de *Lentinula edodes* para su integración en el alimento.

Se sometió el cuerpo fructífero del hongo fresco a diferentes tratamientos de cocción y secado con la finalidad de incrementar su contenido de antioxidantes e integrarlo en las fórmulas alimenticias. En la tabla 1 se puede observar cada uno de ellos. El secado de los hongos se realizó en un secador de charolas.

Los hongos con tratamiento con ebullición en agua fueron cocidos en dos relaciones hongo:agua, la primera consistió en poner 10 g de hongo con 100 ml de agua (1:10) y la segunda consistió en poner 10 g de hongo con 200 ml de agua (1:20), el agua de ebullición utilizada en los tratamientos también fue analizada.

En todos los tratamientos de cocción y secado del hongo se determinó la concentración de actividad antioxidante y polifenoles totales.

5.7.1 Extracción de los compuestos antioxidantes y polifenoles totales.

La extracción se realizó agregando 1 g de muestra seca o 10 g de muestra húmeda en 40 ml de etanol al 80 %, se dejó en agitación a 200 rpm/ 28 °C por 24 h en oscuridad. Pasado este tiempo se retiró el sobrenadante y se guardó para su análisis. El agua de ebullición fue analizada directamente sin extracción.

Tabla 1. Tratamientos de cocción y secado al hongo *Lentinula edodes*.

Tratamiento	Ebullición en agua						Secado			Asado			Frito			Autoclave		Baño maría		
	Tiempo (min)			hongo: agua			Temperatura (°C)						Tiempo (min)							
	5	10	30	1:10	1:20		35	60	100	2	4	5	2	4	5	10	30	5	10	30
Hongo fresco	H
	HE-1	X	.	.	X
	HE-2	.	X	.	X
	HE-3	.	.	X	X
	HE-4	X	.	.	.	X
	HE-5	.	X	.	.	X
	HE-6	.	.	X	.	X
Hongo seco a 35 °C	HS35
	HS35E-1	X	.	.	X
	HS35E-2	.	X	.	X
	HS35E-3	.	.	X	X
	HS35E-4	X	.	.	.	X
	HS35E-5	.	X	.	.	X
	HS35E-6	.	.	X	.	X
Hongo seco a 60 °C	HS60
	HS60E-1	X	.	.	X
	HS60E-2	.	X	.	X
	HS60E-3	.	.	X	X
	HS60E-4	X	.	.	.	X
	HS60E-5	.	X	.	.	X
	HS60E-6	.	.	X	.	X
Hongo seco a 100 °C	HS100
	HS100E-1	X	.	.	X
	HS100E-2	.	X	.	X
	HS100E-3	.	.	X	X
	HS100E-4	X	.	.	.	X
	HS100E-5	.	X	.	.	X
	HS100E-6	.	.	X	.	X
Hongo fresco	HES35-1	X	.	.	X	.	X
	HES35-2	.	X	.	X	.	X
	HES35-3	.	.	X	X	.	X
	HES35-4	X	X
	HES35-5	.	X	.	.	X	X
	HES35-6	.	.	X	.	X	X
	HES60-1	.	.	.	X	.	.	X
	HES60-2	.	X	.	X	.	.	X
	HES60-3	.	.	X	X	.	.	X
	HES60-4	X	.	.	.	X	.	X
	HES60-5	.	X	.	.	X	.	X
	HES60-6	.	.	X	.	X	.	X
	HES100-1	X	.	.	X	.	.	.	X
	HES100-2	.	X	.	X	.	.	.	X
	HES100-3	.	.	X	X	.	.	.	X
	HES100-4	X	.	.	.	X	.	.	X
	HES100-5	.	X	.	.	X	.	.	X
HES100-6	.	.	X	.	X	.	.	X	
Hongo seco 4 °C	HS4
	HS4As-1	X
	HS4As-2	X
	HS4As-3	X
	HS4Ac-1	X
	HS4Ac-2	X
	HS4Ac-3	X
	HS4A-1	X
	HS4A-2	X	.	.	.
	HS4B-1	X	.	.
	HS4B-2	X	.
	HS4B-3	X

5.7.2 Determinación de la actividad antioxidante.

Se determinó la actividad antioxidante a las muestras hongos sometidos a los tratamientos de cocción y secado (Tabla 1) siguiendo la metodología descrita por Choi y col. (2005). La actividad antioxidante fue expresada como porcentaje de captura del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y para su cálculo se utilizó la ecuación:

$$\text{Porcentaje de captura del radical DPPH} = 1 - \left(\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del testigo}} \right) * 100$$

5.7.3 Determinación de polifenoles totales.

A las muestras de hongo tratadas según la tabla 1 se les determinó la concentración de polifenoles totales utilizando la técnica de Folin-Ciocalteu descrita por Choi y col. (2005). Los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico/g de muestra seca (mg GAE/g muestra seca). Como estándar se utilizó el ácido gálico.

5.7.4 Determinación de eritadenina.

Se realizó la extracción y cuantificación de eritadenina de las muestras tratadas de hongo *Lentinula edodes* (Tabla 1) siguiendo la metodología descrita por Enman y col. (2007).

La extracción se realizó colocando 1 g de hongo en 80 ml de metanol (80 % en agua) en reflujo por 3 h, posteriormente se filtró en papel Wathman No. 5, una vez hecho esto se evaporó al vacío a 50-60 °C y se diluyó 50 ml de agua destilada. Se hizo pasar tres veces por éter al 99.5 % y se incubó 12 h a -20 °C, pasado este tiempo el precipitado fue eliminado. El líquido fue evaporado al vacío a 50-60 °C y se diluyó en 50 ml de agua destilada.

La concentración de eritadenina en las muestras de hongo fue cuantificada por HPLC utilizando una columna de C18 a una temperatura de 23 °C con flujo de 1 ml/min y un detector de UV a 260 nm, como fase móvil se utilizó una mezcla 98:2 de 0.05 % ácido trifluoroacético en agua y 0.05 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo. La elución se realizó con gradiente de 98:2 por 5 min, 40:60 por 15 min y 98:2 por 10 min, antes del análisis los extractos fueron diluidos dos veces en la fase móvil

en la proporción 98:2. Se realizó una curva de calibración de 0.006 mg/ml a 0.2 mg/ml con eritadenina comercial utilizada como estándar.

5.8 Determinación de las proporciones en que serán integrados *Lentinula edodes* y *Lactobacillus* sp. en el alimento.

Para determinar las concentraciones de *Lentinula edodes* y *Lactobacillus* sp. que fueron agregadas al alimento, se realizó un cálculo tomando como base los reportes encontrados de ingesta del hongo y de los lactobacilos en ratas y humanos, en los cuales se ha encontrado un efecto benéfico por su consumo. Los cálculos consideraron la cantidad de alimento final propuesta en este trabajo que fue de 80 g o ml.

5.9 Formulación de alimento.

Una vez determinadas las concentraciones de agregado del hongo y las bacterias en el alimento, se realizaron fórmulas alimenticias para su posterior evaluación y ajuste sensorial, la evaluación de tales alimentos se realizó en tres etapas las cuales se describen a continuación.

5.9.1 Primera evaluación de las fórmulas alimenticias.

Consistió en la elaboración de 67 fórmulas alimenticias, entre ellas 17 presentaciones de jugos, 9 de untables, 18 de quesos, 15 de aderezos y 8 de dulces de confitería, con/sin el agregado de *Lentinula edodes* y *Lactobacillus* sp. a fin de identificar aquellos ingredientes que brindaron mejores cualidades al alimento. En la tabla 2 se muestra la composición principal de cada una de ellas.

La evaluación sensorial se realizó por medio de una prueba hedónica preferencial con un panel de evaluación de 6 personas.

5.9.2 Segunda evaluación de las fórmulas alimenticias.

Se realizó un ajuste sensorial de las fórmulas alimenticias aceptadas de la primera evaluación con el agregado de *Lentinula edodes* y *Lactobacillus* sp. En esta etapa se integró la fórmula de natilla de leche denominada fórmula 68'. Se realizó una prueba hedónica preferencial con un panel de 6 personas. Los ingredientes principales de cada una de las fórmulas se presentan en la tabla 3.

Tabla 2. Fórmulas alimenticias de la primera evaluación.

Jugos			Quesos			Aderezos			Untables			Confitería							
Fórmula	Ingredientes		Fórmula	Ingredientes		Fórmula	Ingredientes		Fórmula	Ingredientes		Fórmula	Ingredientes						
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III				
1´	a	4	0	18´	s	4	0	36´	Z	4	0	51´	m,r	4	0				
2´	a,b	4	0	19´	s,ee	4	0	37´	Z,e	4	20	52´	m,r	4	20	60´	(aa), p, q	4	0
3´	a,c	8	20	20´	s,ee	4	20	38´	Z,e	8	20	53´	m,r	8	20	61´	(aa), p, q	8	0
4´	a,f	4	0	21´	s,ee	8	20	39´	Z,f	4	0	54´	m,n	4	0	62´	(aa), x, p.	4	0
5´	a,f	4	20	22´	s,v	4	0	40´	Z,x	4	0	55´	m,n	4	20	63´	(aa), x, p.	8	0
6´	a,f	8	20	23´	s,n	4	0	41´	Z,x	4	20	56´	m,n	8	20	64´	(bb), q, (cc)	4	0
7´	b	4	0	24´	t,w	4	0	42´	Z,x	8	20	57´	m,o	4	0	65´	(bb), q, (cc)	8	0
8´	e	4	0	25´	t,e	4	0	43´	z,y	4	0	58´	m,o	4	20	66´	(dd)	4	0
9´	c,f	4	0	26´	t,e	4	20	44´	z,y	4	20	59´	m,o			67´	(dd)	8	0
10´	g,h	4	0	27´	t,e	8	20	45´	z,y	8	20								
11´	i,	4	0	28´	t,v	4	0	46´	z,y	4	0								
12´	F,j	4	0	29´	t,y	4	0	47´	z,y	4	20								
13´	j	4	0	30´	u	4	0	48´	z,x	8	20								
14´	k	4	0	31´	u,e	4	0	49´	z,t	4	0								
15´	J,k,l	4	0	32´	u,e	4	20	50´	z,v	4	0								
16´	c	4	0	33´	y,e	8	20												
17´	d	4	0	34´	y,v	4	0												
				35´	u,n	4	0												

I= ingrediente, II=% de Dosis de *Lentinula edodes* y III= % de Dosis de *Lactobacillus* sp.

a) Naranja, b) Piña, c) Papaya, d) Betabel, e) Mango, f) Jitomate, g) Chayote, h) Zanahoria, i) Manzana, j) Lechuga, k) Mandarina, l) Calabaza, m) Aguacate, n) Chile poblano, o) Chile árbol, p) Chile en polvo, q) Chile serrano, r) Sal, s) Queso añejo, t) Queso panela, u) Queso fresco, v) Camarón molido, w) Orégano, x) Chipotle, y) Nuez, z) Crema, aa) Chile escarchar, bb) Pelón, cc) Tamarindo, dd) Gomas, ee) Chile chipotle polvo y ff)Naatilla

Tabla 3. Fórmulas alimenticias de la segunda evaluación.

Fórmula	Jugos			Quesos			Aderezos			Untables					
	Ingredientes			Ingredientes			Ingredientes			Ingredientes					
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II				
3'	a,c	9	20	18'	s	9	20	36'	z,e*	9	20	51'	m,r	9	2
4'	a,j	9	20	19'	s,x	9	20	37'	z,e*	9	20	54'	m,n	9	2
9'	c,j	9	20	21'	s,x,*	9	20	38'	z,e*	9	20	57'	m,o	9	2
14'	k	9	20	23'	s,n	9	20	39'	z,f	9	20				
				22'	s,v	9	20	40'	z,h	9	20				
				25'	t,x*	9	20	41'	z,h*	9	20				
				26'	t,x,*	9	20	42'	z,y*	9	20				
				28'	t,v	9	20	43'	z,y*	9	20				
				29'	t,y	9	20	44'	z,y*	9	20				
				31'	u,e*	9	20	45'	z,e*	9	20				
				32'	u,e,*	9	20	46'	z,e*	9	20				
				33'	y,e*	9	20	47'	z,e*	9	20				
				34'	y,v	9	20	48'	z,t	9	20				
				35'	u,n	9	20	49'	z,v	9	20				

* Las proporciones de los ingredientes variaron en la fórmula con respecto a fórmulas similares.

I= ingrediente, II= %

a) Naranja, b) Piña, c) Papaya, d) Mandarina, l) Calabaza, m) Aguacate, n) Queso añejo, t) Queso panela, u) Chile escarchar, bb) Pelón, cc) Ta

Tabla 4. Fórmulas alimenticias de la tercera evaluación.

Fórmula	I	II	III
31'	y,x	9	20
65'	(bb), q, (cc)	4.5	20

5.9.3 Tercera evaluación de las fórmulas alimenticias.

La tercera evaluación sensorial se realizó con las fórmulas seleccionadas de los ensayos anteriores, y consistió en ajuste sensorial con la modificación de las proporciones de los ingredientes a fin de obtener la mayor aceptabilidad de los panelistas, las fórmulas fueron evaluadas por una prueba hedónica por 68 personas seleccionadas al azar entre 15 y 50 años de edad y de diferentes ocupaciones. En la tabla 4 se presentan los ingredientes y dosis de *Lentinula edodes* y *Lactobacillus* sp. de cada fórmula.

5.10 Evaluación del potencial funcional de las fórmulas alimenticias seleccionadas.

De los ensayos anteriores se seleccionaron dos fórmulas alimenticias y se les realizaron las pruebas de antagonismo, viabilidad de la cepa probiótica, determinación de la actividad antioxidante, polifenoles totales y cuantificación de eritadenina a fin de poder catalogarlas como alimentos con potencial funcional. A continuación se describe cada prueba.

5.10.1 Antagonismo de los alimentos contra bacterias patógenas.

El ensayo de antagonismo de las fórmulas alimenticias finales contra las bacterias patógenas *E. coli*, *S. typhimurium* y *S. aureus* se realizó siguiendo la metodología descrita por Rammelsberg y Radler (1990) con algunas modificaciones (Punto 5.4.1).

Se prepararon 10 g de cada alimento, se centrifugaron a 1000 rpm/4 °C/4 min y el sobrenadante fue utilizado para la realización de la técnica, como controles se utilizaron los alimentos con/sin hongo y bacterias. El halo de inhibición fue medido con ayuda de una regla milimétrica.

5.10.2 Viabilidad de *Lactobacillus* sp. en los alimentos.

Las fórmulas alimenticias finales fueron preparadas, posteriormente se tomó 0.1 g del alimento, se hicieron diluciones seriadas y se realizó el conteo de células viables por el método de gota en placa (Miles y col., 1938) hasta los 14 días de almacenamiento.

5.10.3 Determinación de la actividad antioxidante y polifenoles en los alimentos.

Se evaluó la actividad antioxidante y polifenoles totales de las fórmulas alimenticias finales, la extracción de tales compuestos se realizó según la metodología descrita en el punto 5.7.1, la cuantificación de la actividad antioxidante y polifenoles totales se realizó según lo descrito en el punto 5.7.2 y 5.7.3.

5.10.4 Cuantificación de eritadenina en los alimentos.

Se realizó la extracción y cuantificación de eritadenina a las fórmulas alimenticias finales según lo descrito en el punto 5.7.4

5.11 Análisis estadístico.

Todos los experimentos fueron llevados a cabo con sus respectivas replicas, las medias de los resultados fueron analizados mediante ANOVA ($p < 0.05$). Se utilizó el programa Statgraphics Plus version 5.1 para determinar las diferencias significativas entre las medias individuales usando la prueba de Tukey.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 Morfología microscópica y colonial de *Lactobacillus* spp.

Se confirmó la morfología colonial de los lactobacilos en agar MRS. Se observaron colonias suaves, convexas, con márgenes enteros y redondeados de 2 a 5 mm de diámetro y color crema. En la morfología microscópica se observaron bacterias con forma de bacilos largos o cortos, que forman cadenas, no móviles y Gram positivos, tal como se muestra en la figura 2.

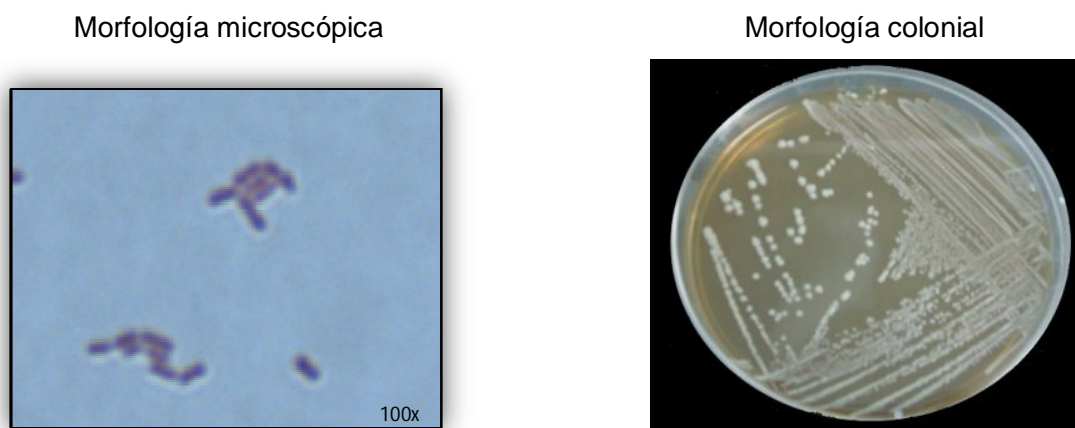


Figura 2. Morfología de *Lactobacillus* spp.

La morfología colonia y microscópica obtenida en este ensayo confirmó la pureza de la cepa crecida en el medio MRS, así como las características típicas de los lactobacilos según lo reportado por Holzapfel y col. (2001); Tannok (2004); Vamanu y col. (2005) y Mejia y col. (2007).

6.2 Evaluación del potencial probiótico de las cepas de *Lactobacillus* spp.

Se evaluó el potencial probiótico de las cepas A1, A2, A5 y B1 a fin de determinar si estas podrían tener un efecto positivo en la salud del hospedero una vez que hayan sido ingeridas. Para ello se realizaron ensayos de antagonismo, resistencia a pH ácidos y sales biliares los cuales se describen a continuación.

6.2.1 Antagonismo de *Lactobacillus* spp. contra bacterias patógenas.

Los resultados de la prueba de antagonismo de las cepas de *Lactobacillus* sp. A1, A2, A5 y B1 contra las cepas de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* 6538P y EHEC EDL 9333 se muestran en la tabla 5.

Se encontró que todas las cepas presentaron antagonismo contra *E. coli* y *S. aureus*, presentando halos de inhibición de 1.0 ± 0.23 hasta 1.6 ± 0.21 cm. No se encontró diferencia significativa en la inhibición de *S. aureus* y *E. coli* por las cepas de *Lactobacillus* spp. (excepto en la cepa A1 para *E. coli*). No se encontró diferencia significativa en una misma cepa para inhibir el crecimiento de *E. coli* o *S. aureus* (excepto en la cepa A1 para *E. coli*). Para *S. typhimurium* no hubo inhibición.

Tabla 5. Antagonismo de *Lactobacillus* spp. contra bacterias patógenas.

	Halo de inhibición (cm)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>
<i>Lactobacillus</i> sp. A1	1.0 ± 0.23 ^{b,B}	1.5 ± 0.13 ^{a,A}	-
<i>Lactobacillus</i> sp. A2	1.5 ± 0.17 ^{ab,A}	1.5 ± 0.28 ^{a,A}	-
<i>Lactobacillus</i> sp. A5	1.2 ± 0.34 ^{ab,A}	1.4 ± 0.11 ^{a,A}	-
<i>Lactobacillus</i> sp. B1	1.4 ± 0.30 ^{ab,A}	1.4 ± 0.15 ^{a,A}	-
Control: <i>Lactobacillus</i> sp. 22	1.6 ± 0.21 ^{a,A}	1.5 ± 0.10 ^{a,A}	-

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Letras minúsculas: comparación entre columnas, letras mayúsculas: comparación entre filas. (-) = no hubo inhibición. n=6

La inhibición del crecimiento *E. coli* y *S. aureus* por los lactobacilos se puede deber a la producción de sustancias llamadas bacteriocinas, de naturaleza proteica que exhiben actividad bactericida contra algunos microorganismos (Yamato y col., 2003) y pueden destruir la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros (Montville y Chen, 1998 y Chikindas y col., 1993). Otra manera de inhibir el crecimiento de bacterias como *S. aureus* es por la producción de ácidos orgánicos como el láctico o acético, que afectan el crecimiento de bacterias por la acidificación del medio afectando su pared celular (Charlier y col., 2008). Se ha reportado que algunas bacterias ácido lácticas, además de producir bacteriocinas y ácidos orgánicos, producen pequeñas moléculas como el peróxido de hidrógeno, acetaldehído y dióxido de carbono que inhiben el crecimiento de patógenos (Ouweland y Vesterlund, 2004).

La inhibición de igual magnitud de las cepas A2, A5 y B1 contra *E. coli* y *S. aureus* podría deberse a que todas las cepas provienen de la misma fuente (aguamiel) y quizás a una producción similar o parecida de bacteriocinas y ácidos orgánicos (tipo y concentración).

Ninguna de las cepas ensayadas inhibió el crecimiento de *Salmonella typhimurium*, debiéndose quizás al tipo de moléculas antagónicas producidas por *Lactobacillus* spp. y a las características específicas de la cepa indicadora. Sin embargo en otros trabajos como el realizado por Klose y col. (2010) se ha reportado la actividad antagónica hacia *S. typhimurium* por *L. salivarius* FACA12, *L. salivarius* LSS y *L. salivarius* LCS, con halos de inhibición de 4, 5 a 11 mm, lo que indica que cepas diferentes generan diferentes grados de inhibición.

Los resultados encontrados en este ensayo superan a los reportados por Zhang y col. (2010), quienes reportaron halos de inhibición de 1 a 5 mm con las cepas de *Lactobacillus paracasei* subsp. M5-L, *L. rhamnosus* J10-L y *L. casei* Q8-L contra la cepa indicadora de *E. coli*, así como lo encontrado por Silva y col. (1987) para la cepa de *Lactobacillus* sp. GG contra *E. coli* y *Salmonella* spp. con halos de inhibición entre 4 y 8 mm.

Todas las cepas de *Lactobacillus* spp. presentaron antagonismo contra *E. coli* y *S. aureus* y podrían ser utilizadas para la elaboración de un alimento funcional.

6.2.2 Resistencia de *Lactobacillus* spp. a pH ácidos.

Una característica de las cepas con potencial probiótico es la capacidad de sobrevivir al pH ácido del estómago. En este ensayo se evaluó la sobrevivencia de las cepas de *Lactobacillus* sp. A1, A2, A5 y B1 a pHs de 2.5 y 3.5.

En la figura 3 se presentan éstos resultados, donde se encontró que no hay un descenso en las UFC/ml a través del tiempo, todas las cepas fueron resistentes a pH 2.5 y 3.5. Se observa en el inciso a de la figura 3, que las cepas A5 y 22 (control) muestran un aumento significativo en las primeras 2 h de incubación a pH de 2.5 (4.4×10^7 UFC/ml y 4.7×10^7 UFC/ml, respectivamente) y aunque pasadas estas horas hay un descenso de la población celular, estas se mantienen con respecto al inóculo inicial. Considerando que el paso del bolo alimenticio por el estómago es de aproximadamente 2 a 4 horas podemos decir que las bacterias ensayadas podrían sobrevivir a esta condición de estrés al ser ingeridas o incluso aumentar su número.

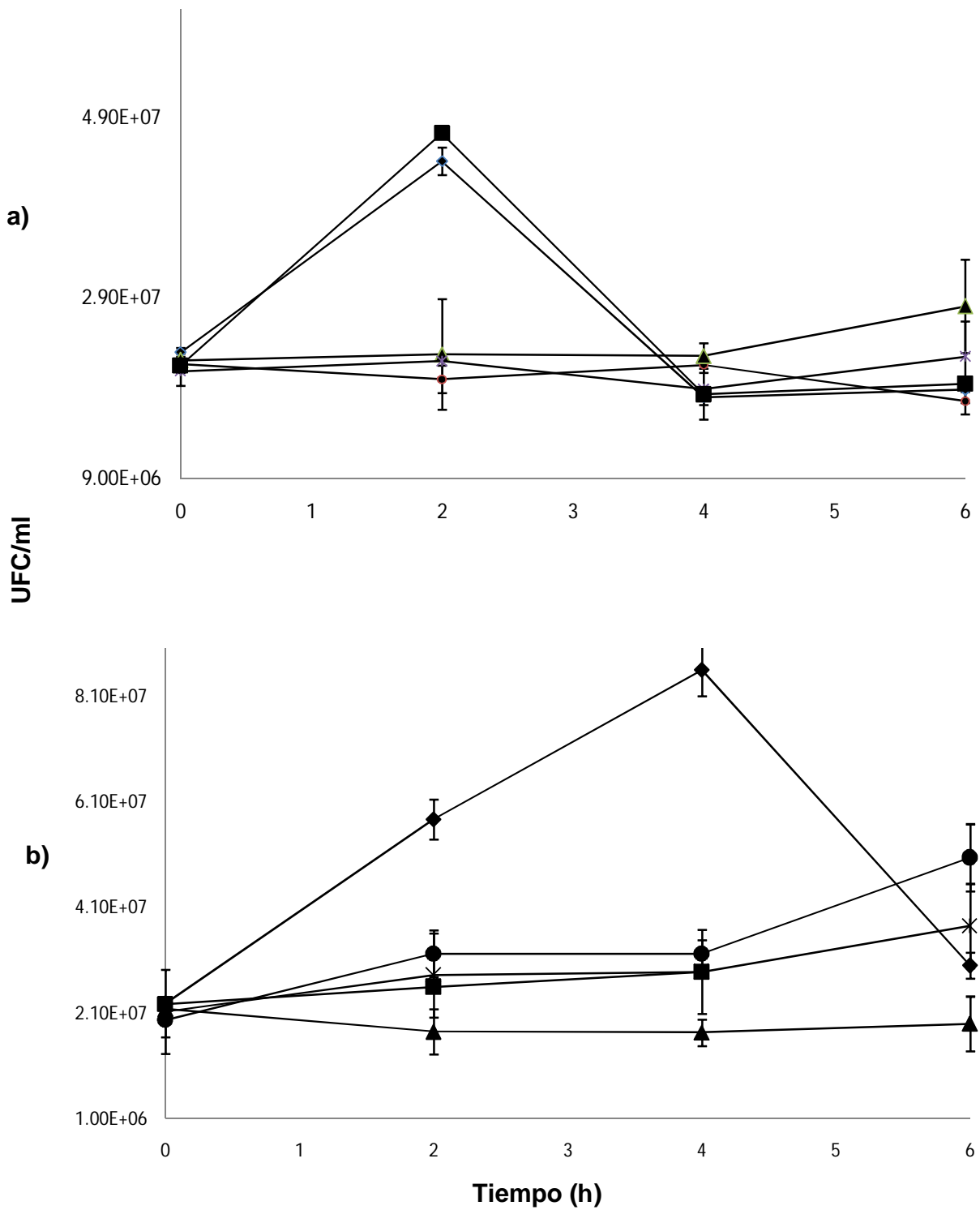


Figura 3. Resistencia de *Lactobacillus* spp. en medio MRS a pH ácido. a) 2.5 y b) 3.5. (x) A1, (●) A2, (◆) A5, (▲) B1 y (■) control.

A pH de 3.5 y después de 2 h de inoculación de la cepa A5 (inciso b, figura 3) se cuantificaron 5.7×10^7 UFC/ml y después de 4 h incrementó a 8.9×10^7 UFC/ml, dicha densidad celular es 2.4 veces superior a la del control cuya máxima cuenta celular fue de 3.7×10^7 UFC/ml.

Lactobacillus spp. es un microorganismo que habita normalmente el intestino delgado (Tannok, 2004) pudiendo soportar condiciones ácidas del estómago, resulta interesante en éste ensayo la capacidad de sobrevivencia de las cepas debido a que son aisladas de agua miel, donde no existen condiciones extremas de acidez (pH de 6.5), indicando la capacidad de las cepas para adaptarse al medio que las rodea, esta adaptación puede representar la diferencia para la selección de cepas con potencial probiótico.

Las estrategias de resistencia a pH ácidos por los lactobacilos se podría deber a la actividad del complejo enzimático FoF₁-ATPasa, el cual mantiene un gradiente de tolerancia a pHs ácidos por la traslocación de protones a través de canales de la membrana hacia el medio extracelular (Corcoran y col., 2005).

Los resultados obtenidos en este ensayo son similares a los reportados por Shukla y col. (2010) y Mejia y col. (2007).

Oh y col. (2000) reportaron en *L. acidophilus* 30CS inoculada en pH ácidos un recuento celular de 6×10^4 UFC/ml a las 3 h de de incubación, la cepa A5 usada en este ensayo supera estos resultados, debido a que no solo mantiene su número de UFC/ml, sino aumenta su cuenta celular a las 2 y 4 h para pH de 2.5 y 3.5, respectivamente.

Pan y col. (2009) reportaron que *L. acidophilus* NIT después de 3 h de incubación a pH de 2, 3 y 4 presentó un porcentaje de sobrevivencia del 0, 10 y 60 %, respectivamente, sin embargo, las cepas A1, A2, A5 y B1 mostraron un 100 % de sobrevivencia después de las 6 h de incubación, lo que sugiere que estas cepas son más resistentes a las condiciones ácidas que las reportadas en otros trabajos.

Se monitoreó la sobrevivencia a pH ácidos de las cepas de *Lactobacillus* spp. a las 24 h de incubación, la figura 4 (inciso a) muestra los resultados a pH 2.5, donde se encontró que todas las cepas de *Lactobacillus* spp. sobreviven a este tiempo de incubación. No se encontró diferencia significativa entre las cepas A1, A2, A5 y B1, pero sí se encontró diferencia significativa con

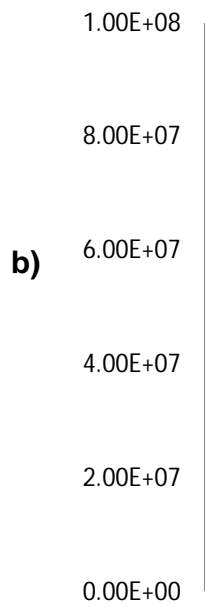
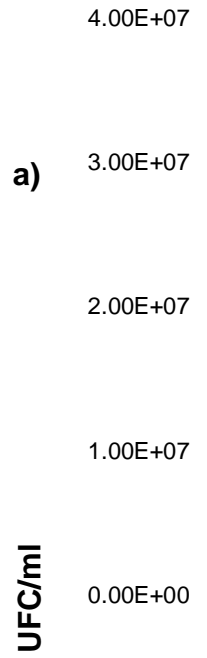


Figura 4. Sobrevivencia de *Lactobacillus* spp. a las 24 h de incubación a pH ácidos. a) 2.5 y b) 3.5. (x) A1, (●) A2, (◆) A5, (▲) B1 y (■) control. Letras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0.05$). $n = 3$.

respecto al control, las cepas de lactobacilos A5 y B1 superan a la cepa de *Lactobacillus* sp. 22 utilizada como control.

En el inciso b de la figura 4 se observa la resistencia de las cepas a pH 3.5 y 24 h de incubación, se encontró una diferencia significativa en la cepa de *Lactobacillus* sp. 22 (control) con una cuenta celular de 7.9×10^7 UFC/ml. La cepa A5 no es igual al control, sin embargo, presentó una resistencia parecida con 6.4×10^7 UFC/ml.

Todas las cepas de lactobacilos sobrevivieron a pH ácidos en el tiempo de incubación evaluado, las cuentas celulares más bajas fueron observadas a pH de 3.5 para la cepa A2 y B1 (2.1×10^7 UFC/ml y 2.2×10^7 UFC/ml, respectivamente). Las diferencias encontradas se pueden deber al ambiente extracelular (pH ácidos) al que están sometidas. Corcoran y col. (2005) mencionaron que la energía necesaria para mantener el pH intracelular es incrementada cuando existe una condición de estrés y otras funciones celulares que requieren de energía son disminuidas, por lo que no todas las células sometidas a esta condición logran sobrevivir. Wu y col. (2011) encontraron que los niveles de expresión de 33 proteínas son inducidas en *L. casei* Zhang cuando está en condiciones de pH bajos.

La caracterización de cepas con potencial probiótico nos da la oportunidad de utilizarlas para su integración en un alimento, el cual servirá de matriz para hacerlas llegar al tracto gastrointestinal, aquí deberán sobrevivir a pH ácidos y metabolitos generados por la microflora intestinal. Se debe asegurar que las bacterias permanezcan viables el mayor tiempo posible, de esta manera el alimento es el primer eslabón donde las bacterias sufren estrés.

6.2.3 Resistencia de *Lactobacillus* spp. a sales biliares.

Una de las características de los probióticos es su resistencia a sales biliares, en este ensayo se evaluó esta resistencia a las cepas A1, A2, A5 y B1 usando hiel comercial y ácido taurocólico.

En la figura 5 se presenta la resistencia de *Lactobacillus* spp. a sales biliares donde se encontró que las cepas A1, A2, A5 y B1 fueron resistentes a hiel y ácido taurocólico, debido a que mantuvieron su cuenta celular con respecto al inoculo inicial.

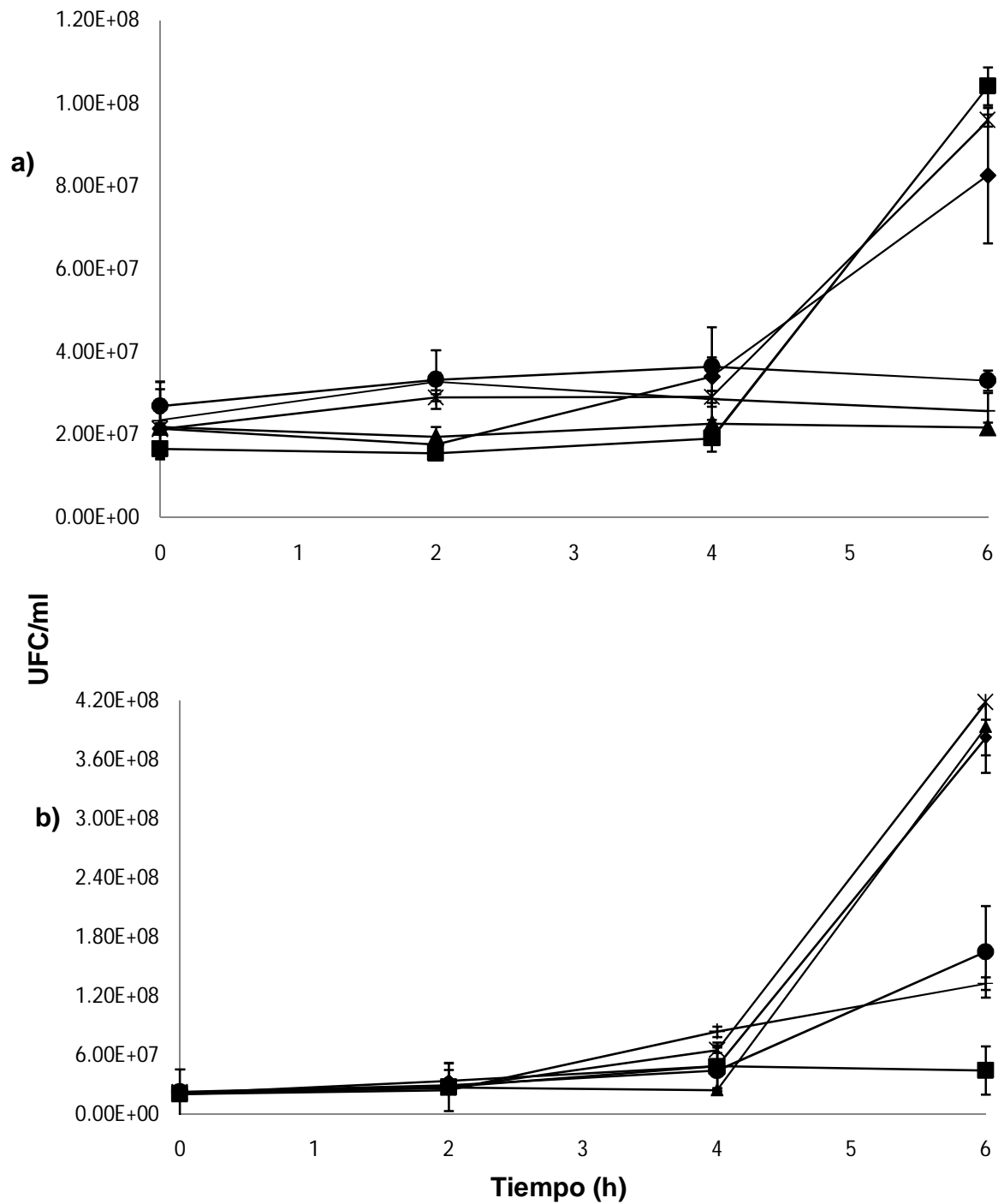


Figura 5. Resistencia de *Lactobacillus* spp a sales biliares. a) ácido taurocólico y b) hiel.
 (*-) A1, (-●-) A2, (-◆-) A5, (-▲-) B1, (-■-) control y (+) cepa de Yakult

Se encontró en el ácido taurocólico (inciso a de la figura 5) que después de las 4 h de incubación las

cepas A1, A5 y control (cepa 22) elevaron su número de UFC/ml en comparación con los tiempos anteriores, siendo de 9.5×10^7 , 8.2×10^7 y 1.04×10^8 UFC/ml, respectivamente. Para la hiel hay un comportamiento similar (inciso b), donde las cepas A1, A5 y B1 elevan su número de células a 4.1×10^8 , 3.9×10^8 y 3.8×10^8 UFC/ml, respectivamente.

Este incremento se podría atribuir a la síntesis de hidrolasas de sales biliares las cuales reducen la toxicidad del medio permitiéndoles adaptarse mejor. Se ha reportado que no todas las bacterias producen hidrolasas de sales biliares y que no todas las que lo producen son resistentes a estas condiciones de estrés (Moser y Savage, 2001).

Las primeras 4 h son críticas para la sobrevivencia de *Lactobacillus* spp. tanto en el estómago como en el intestino. El proceso de digestión involucra tiempos largos de residencia que pueden afectar la viabilidad de las células. Desde que un alimento es consumido hasta que es liberado del estómago transcurren 90 min (Berreda y col., 1991), durante el cual las bacterias se encuentran sometidas a pH ácido, pasado éste tiempo se encuentran nuevamente ante una condición de estrés: las sales biliares, cuya concentración disminuye después de la primera hora hasta la cuarta hora de digestión, en este ensayo se encontró que las bacterias pueden sobrevivir las condiciones de estrés generadas por las sales biliares.

El incremento significativo de células a partir de la quinta y sexta hora de incubación le podrían permitir a los lactobacilos adherirse y colonizar el intestino, debido a que la resistencia a sales biliares en estas horas fue mayor y quizás la célula se encuentre en una condición de estrés menor que en horas anteriores.

Los resultados encontrados en este ensayo son comparables con los realizados por Shukla y col. (2010) quienes evaluaron la resistencia a sales biliares de varias cepas de *Lactobacillus* por 3 h de incubación, ellos encontraron que la cepa no disminuye su población en los tiempos evaluados. También coinciden con lo reportado por Moser y Savage (2001) quienes reportaron en varias cepas de *Lactobacillus* aisladas de humanos, resistencia a sales de sodio del ácido taurodesoxicólico con cuentas celulares de 2.31×10^8 células/ml a las 5 h de incubación.

La colonización y adherencia de *Lactobacillus* spp. se realiza en el intestino, donde frecuentemente hay excreción de sales biliares para la emulsificación de los lípidos, un monitoreo de la resistencia a estas sales por más tiempo es fundamental. En este ensayo se evaluó la resistencia de las cepas

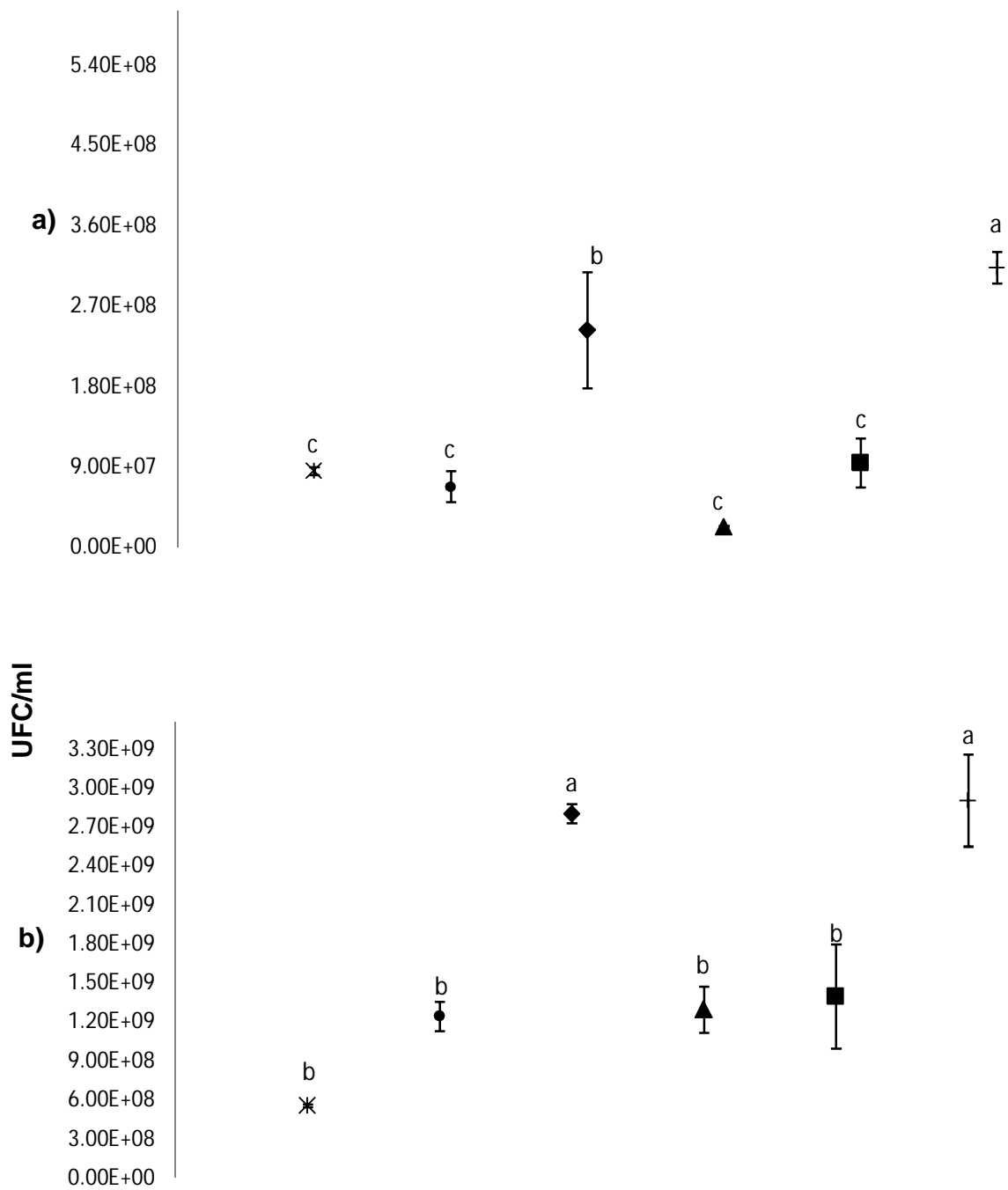


Figura 6. Resistencia de *Lactobacillus* spp. a 24 h de incubación en sales biliares. a) ácido taucólico y b) hiel. (*-) A1, (-●-) A2, (-◆-) A5, (-▲-) B1, (-■-) control y (-+) cepa de Yakult. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$). $n=3$.

A1, A2, A3 y B1 a las 24 h de incubación (Figura 6, incisos a y b).

Se encontró que todas las cepas fueron resistentes a este tiempo de incubación. En el inciso a de la figura 6 se observa la resistencia al ácido taurocólico, se encontró diferencia significativa en la cepa de Yakult con 3.3×10^8 UFC/ml, seguida de la cepa A5 con 2.4×10^8 UFC/ml.

No se encontró diferencia significativa en el ensayo de hiel (inciso b de la figura 6) en las cepas A5 y la de Yakult, que presentaron cuantías celulares de 2.8×10^9 UFC/ml y 2.9×10^9 UFC/ml, respectivamente.

Oh y col. (2000) reportaron para varias cepas de *Lactobacillus acidophilus* resistencia a sales biliares a las 24 h de incubación, las cuales aumentaron una orden exponencial sus células con 7×10^5 UFC/ml con respecto al inóculo inicial, datos que son similares a los encontrados en este ensayo.

Comparando la resistencia de las cepas de *Lactobacillus* spp. a las 24 h de incubación entre sales biliares y pH ácidos se encontró que todas las cepas ensayadas fueron más resistentes a sales biliares que a pH ácidos. Esto se puede deber al pH del medio el cual se mantuvo en 2.5 y 3.5 para el ensayo de pH ácido y de 4.5 y 3.5 para el ácido taurocólico y hiel, respectivamente, por lo que el medio del ensayo de sales biliares creó un ambiente menos hostil a las bacterias.

Se utilizó la correlación de Pearson para determinar la relación entre la resistencia a hiel y ácido taurocólico para la cepa de *Lactobacillus* sp. A5, encontrando una correlación positiva fuerte de 0.9, esto indicó que tanto la hiel como el ácido taurocólico se pueden utilizar para la evaluación de cepas resistentes a sales biliares. Considerando que en condiciones reales en el intestino no se encuentra al ácido taurocólico en su forma pura, sino en una mezcla de compuestos conocida como hiel, constituida por las sales biliares (68 %), lecitina (22 %), colesterol (4 %) y bilirrubina (0.3 %) (Álvarez Alcalde, 2003).

Todas las cepas de lactobacilos evaluadas en este trabajo presentaron potencial probiótico. Observando el comportamiento de las cepas A1, A2, A5 y B1 en las diferentes condiciones de estrés (antagonismo, pH y sales biliares) podemos descartar aquellas con un potencial probiótico menor en comparación con los controles y con las mismas cepas evaluadas. En la tabla 6 se observa este análisis.

Tabla 6. Características probióticas de las cepas de *Lactobacillus* spp.

Cepa / Ensayo	Antagonismo		Resistencia a pH ácido		Resistencia a sales biliares	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	2.5	3.5	Ácido taurocólico	Hiel
A1		X			X	X
A2	X	X				
A5	X	X	X	X	X	X
B1	X	X				X
Control 22	X	X	X		X	
Cepa de Yakult						

X = mejor característica probiótica.

Se encontró que la cepa A5 es la que presenta mayores características probióticas en comparación con las demás cepas, por lo cual podría sobrevivir el paso por el tracto gastrointestinal una vez que haya sido ingerida y fue la seleccionada para su integración en el alimento con potencial funcional.

6.3 Establecimiento de las condiciones de crecimiento de *Lactobacillus* spp.

Se elaboraron medios de crecimiento para la cepa A5 (seleccionada en los ensayos anteriores), a fin de tener un abasto celular y pueda ser integrada en una fórmula alimenticia, tales medios fueron evaluados en dos etapas que a continuación se describen.

6.3.1 Primera selección de los medios de crecimiento.

Se determinó la viabilidad de la cepa A5 en tres medios de crecimiento elaborados a partir de suero de leche, leche de soya y sacarosa.

En la figura 7 se muestra el perfil de crecimiento de ésta cepa en los medios evaluados. Se encontró un mayor crecimiento celular a las 12 h de incubación en los medios M3 y M5 con 2.6×10^9 y 2.5×10^9 UFC/ml, respectivamente. En el medio M2 se encontraron 1.1×10^9 UFC/ml en el mismo tiempo de incubación.

Pasadas las 12 h de incubación se observó una disminución de las células en los medios M3 y M5 hasta las 48 y 60 h de incubación con 6.9×10^8 y 7.6×10^8 UFC/ml, respectivamente. El medio M2 fue el único que mantuvo una cuenta celular constante hasta las 60 h de incubación, perfil deseado

para las cepas con potencial probiótico debido a que deben de permanecer viables el mayor tiempo posible.

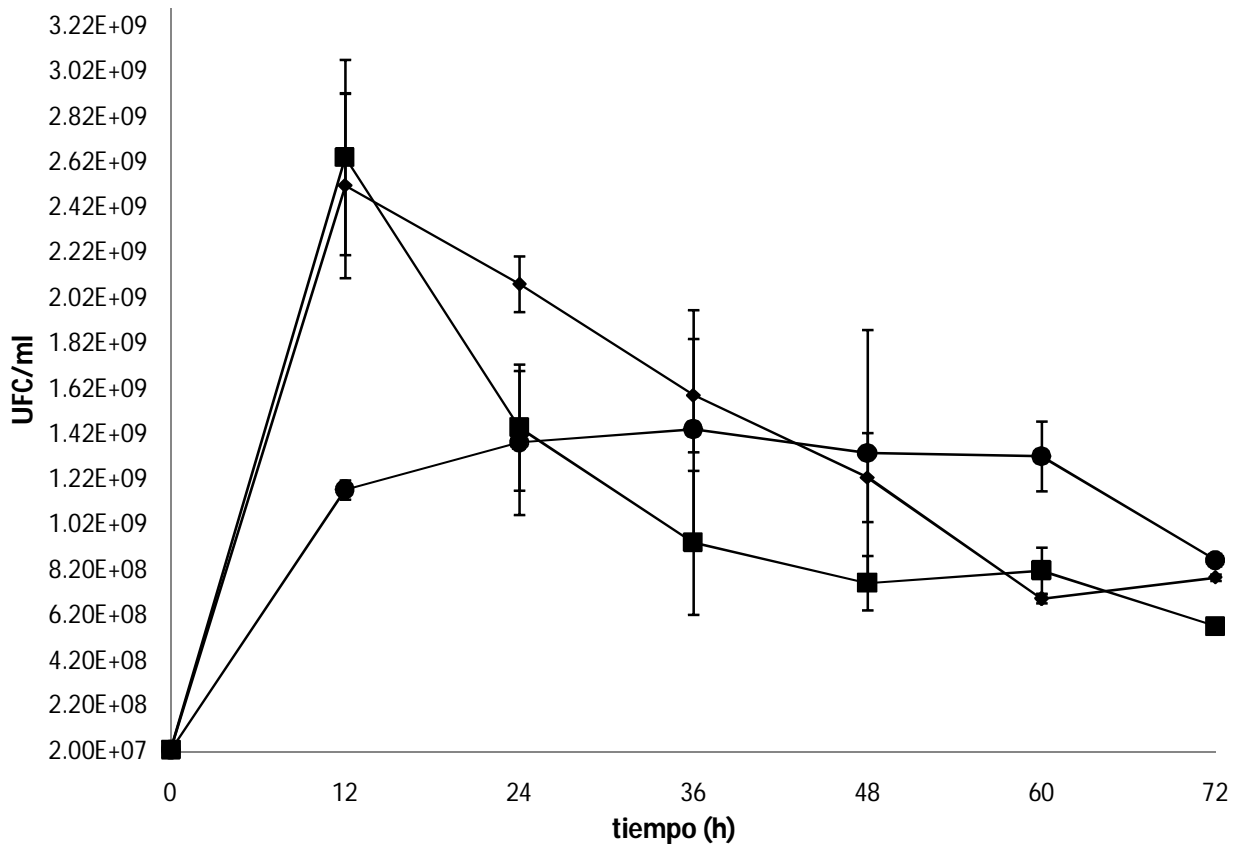


Figura 7. Crecimiento de *Lactobacillus* sp. A5 en los medios M2, M3 y M5. (●—M2) suero de leche 90 % y sacarosa 10 %, (◆—M3) leche de soya 75 %, sacarosa 10 % y agua 15 % y (■—M5) suero de leche 60 % y leche de soya 40 %. n=3.

La diferencia en crecimiento de la cepa de *Lactobacillus* sp. A5 en los diferentes medios se debe a la composición química de cada uno de ellos, así como a las necesidades nutricionales de la cepa.

Se realizó un estimado de la composición química de los medios evaluados (Tabla 7) encontrando en los medios M3 y M5 una concentración de sólidos totales de 133.3 y 50.8 g/L, respectivamente. A mayor concentración de nutrientes existe la posibilidad de mayor crecimiento celular, debido a que las células tienen nutrientes para convertirlos en biomasa. La cepa A5 en el medio M5 con menor

concentración de sólidos totales presentó una disminución celular conforme se fueron agotando los nutrientes. El medio M3 con 133.3 g/L de sólidos totales, presentó un crecimiento acelerado a las 12 h de incubación, sin embargo, este no disminuyó tan drásticamente como en el medio M5 debido a la mayor concentración de sólidos totales.

Tabla 7. Composición química de los medios de crecimiento de *Lactobacillus* sp. A5

Nutriente / Medio	M2	M3	M5
	(g/L)		
Carbohidratos	145*	113.2	37.0
Proteínas	4.7	20.1	13.8
Total	149.7	133.3	50.8

*Datos calculados

El medio M2 con mayor concentración de nutrientes (149.7 g/L) fue el que presentó un crecimiento celular sostenido a partir de las 12 h de incubación y hasta las 60 h, confiriéndole ventaja sobre los demás medios evaluados. La concentración de sólidos totales en los medios M2 y M3 fue similar (149.7 y 133.3 g/L, respectivamente) lo cual podría sugerir crecimientos celulares parecidos, sin embargo depende de la composición de cada medio y de los nutrientes suministrados para que exista igual crecimiento.

La fuente de carbono en el medio de cultivo es importante para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas. En este ensayo se encontró mayor concentración de carbohidratos en el medio M2 (133.3 g/L) en comparación con los demás medios. El crecimiento acelerado de la cepa en el medio M3 a las 12 h de incubación se podría deber a las características nutricionales de la leche de soya. Según Bozanic y col. (2011) la leche de soya es un buen sustrato para el crecimiento de bifidobacterias debido a la asimilación de oligosacáridos como una fuente de carbono y a la presencia de β -galactosidasas. La leche de soya de los medios M3 y M5 estimulan el crecimiento de la cepa en las primeras 12 h de incubación, sin embargo, pasado este tiempo hay una disminución celular.

El perfil de crecimiento de la cepa de *Lactobacillus* sp. A5 en el medio M3 coincide con lo reportado por Bozanic y col. (2011) quienes crecen a *L. acidophilus* y *Bifidobacterium* spp. en leche de soya y encontraron a las 8 h de incubación cuentas celulares de 6.3×10^6 y 1×10^7 UFC/ml,

respectivamente, a las 24 h observaron una disminución significativa de las UFC/ml en *L. acidophilus* y mencionaron que *Lactobacillus* spp. crece pobremente en leche de soya, pero este efecto se ve reducido cuando el inóculo es suplementado con *Bifidobacterium* spp.

Según Morishita y col. (1974) la fuente de nitrógeno es importante para el crecimiento de los lactobacilos. La concentración de proteína del medio M2 (4.7 %) resultó ser la más favorable para el crecimiento y sostenimiento de la cepa A5, el medio M3 y M5 con una concentración de proteína de 20.1 y 13.8 %, respectivamente, favorecieron el crecimiento inicial de la cepa pero no el mantenimiento de las células viables a través del tiempo de incubación.

Hebert y col. (2000) reportaron el requerimiento de aminoácidos como el ácido glutámico, histidina, isoleucina, metionina, entre otros, para el crecimiento de *L. herviticus* CRL 974, la omisión de otros como ácido aspártico, asparagina, glutamina o cisteína no afectó el crecimiento de esta cepa y algunos otros no son esenciales para el crecimiento de bacterias lácticas, pero funcionaron como factores de crecimiento. En este ensayo, se realizó un cálculo aproximado de los aminoácidos presentes en cada medio con base a lo reportado por Nilsson y col. (2007); Wang y Calvins (1989), encontrando mayor concentración de aminoácidos en los medios M3 y M5 (4643 y 2972 mg/g N, respectivamente), siendo de aproximadamente de 2 a 10 veces mayor en comparación con el medio M2 (674 mg/g N), esto indica que altas concentraciones de aminoácidos estimulan el crecimiento de la cepa de *Lactobacillus* sp. A5 en las primeras horas de incubación pero no el sostenimiento de las cuentas celulares, esta última característica es importante para las cepas con potencial probiótico, por lo que el medio M2 con 674 mg/g N resultó favorable para el crecimiento de la cepa probiótica A5.

Hofman y Thonart (2001) reportaron que la proteína de soya contiene aminoácidos como arginina, isoleucina y ácido glutámico que favorece el crecimiento de los probióticos. Pescuma y col. (2008) reportaron el crecimiento de *Lactobacillus* sp. en suero de leche reconstituido con un consumo del 27 al 77 % de treonina y arginina a las 24 h de incubación. La baja concentración de aminoácidos en el suero de leche podría ocasionar un crecimiento celular menor, sin embargo, existen otros factores que lo favorecen debido a que no disminuye sus cuentas celulares drásticamente como en los medios M3 y M5. Según Kunji y col. (1996) el crecimiento de las bacterias ácido lácticas en medios complejos está limitado a la producción de proteasas, al existir mayor concentración de proteínas en los medios M3 y M5 existe la posibilidad de menor crecimiento celular debido a que deben de estar presentes las enzimas necesarias para su desdoblamiento.

En otros ensayos se inoculó la cepa A5 en el medio enriquecido MRS, encontrando cuentas celulares de 1.5×10^9 UFC/ml a las 12 h de incubación (datos no mostrados), las cuentas celulares encontradas en los medios M3 y M5 (2.6×10^9 y 2.5×10^9 UFC/ml a las 12 h de incubación, respectivamente) son superiores a las encontradas en el medio MRS, los medios M3 y M5 estimulan el crecimiento de la cepa de manera similar al medio MRS a las 12 h, su posterior crecimiento dependió de la composición de cada uno de ellos.

Lactobacillus sp. A5 en el medio M2 presentó un perfil de crecimiento ideal para los microorganismos con propiedades probióticas, los cuales deben de mantenerse viables por largos periodos de tiempo, se requiere un medio con la capacidad de mantener un número constante de microorganismos y una vez que sea integrado en una matriz alimenticia puedan sobrevivir el tiempo de almacenamiento y tener efecto benéfico en el hospedero, los medios M3 y M5 no presentan esta característica. El medio M2 es el seleccionado para el crecimiento de la cepa de *Lactobacillus* sp. A5.

6.3.2 Segunda selección de los medios de crecimiento.

Con la finalidad de incrementar el crecimiento de la cepa A5, se varió la concentración de sacarosa añadida en el medio M2 seleccionado en el ensayo anterior. En la figura 8 se presentan los resultados encontrados en cada medio evaluado.

Se puede observar que *Lactobacillus* sp. A5 inoculada en todos los medios evaluados presentó el mismo perfil de crecimiento independientemente de la cantidad de sacarosa añadida. A las 16 h de incubación se encontró una diferencia significativa (análisis no mostrado) en el crecimiento de la cepa A5 en el medio M2a (suero de leche 95 % y sacarosa 5 %) con una cuenta celular de 1.1×10^9 UFC/ml y a partir del tiempo 24 h y hasta las 52 h de la fermentación en este mismo medio se encontró diferencia significativa en comparación con los medios M2b y M2c. *Lactobacillus* sp. A5 en el medio M2c (suero de leche 100 % y sacarosa 0 %) fue el que presentó menor crecimiento celular a partir de las 24 h de incubación.

El comportamiento encontrado en los medios M2a, M2b y M2c indican la capacidad de *Lactobacillus* sp. A5 para utilizar los hidratos de carbono y el efecto que tiene la concentración de sacarosa sobre su crecimiento, en este ensayo se encontró una relación proporcional entre el crecimiento de la cepa A5 y las concentraciones de sacarosa añadidas. No se encontró una diferencia significativa

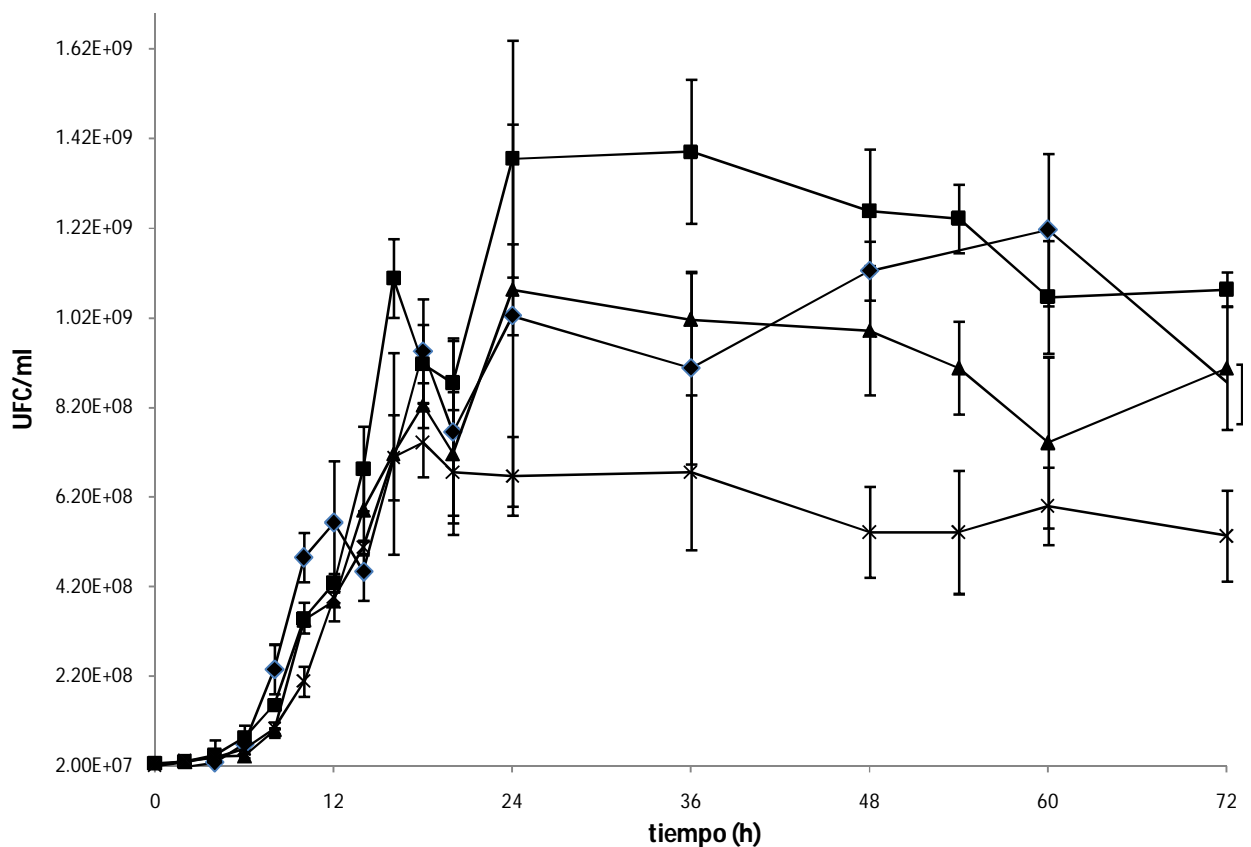


Figura 8. Crecimiento de *Lactobacillus* sp. A5 con diferentes % de sacarosa. (◆-M2) suero de leche 90 % y sacarosa 10 %, (■-M2a) suero de leche 95 % y sacarosa 5 %, (▲- M2b) suero de leche 97.5 % y sacarosa 2.5 % y (✱- M2c) suero de leche 100 % y sacarosa 0 %.

cuando la concentración de sacarosa fue del 10 % (M2) y del 5 % (M2a) en todos los tiempos evaluados (excepto al tiempo 36 h), lo cual indica que los medios M2 y M2a son buenos candidatos para el crecimiento de la cepa A5.

Se realizó la estimación de los sólidos totales, concentración de carbohidratos y proteínas en los medios evaluados (Tabla 8). Se encontró que una concentración de sólidos totales de 149.7 (M2) o 102.5 g/L (M2a) no afectaron el crecimiento de *Lactobacillus* sp. A5, sin embargo, cuando la concentración de sólidos totales fue de 81.3 y 53 g/L (M2b y M2c, respectivamente) si afectaron el crecimiento de la cepa A5, donde se encontró un crecimiento celular inferior.

Tabla 8. Composición química de los medios de crecimiento de *Lactobacillus* sp. A5

Nutriente / Medio	M2	M2a	M2b	M2c
	(g/L)			
Carbohidratos	145*	97.5	76.2	50.0
Proteínas	4.7	5.0	5.1	5.3
Total	149.7	102.5	81.3	53.0

*Datos calculados

No se encontró diferencia significativa en el crecimiento de las bacterias con un contenido de carbohidratos de 145 y 97.5 g/L (medios M2a y M2, respectivamente). Las células necesitan energía en forma de ATP para su supervivencia. Calderón y col. (2003) crecieron a *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 en diferentes mezclas de sustratos entre ellos almidón, fructosa, sacarosa y glucosa, encontrando que diferentes mezclas de hidratos de carbono presentan una eficiencia de ATP diferente sobre la formación de biomasa (g de biomasa/mol de ATP) y que la competitividad de una cepa se basa en su capacidad de utilizar simultáneamente hidratos de carbono. Los medios de crecimiento elaborados en este ensayo contienen principalmente lactosa y sacarosa como fuente de carbono, la variación en la concentración de sacarosa en los medios sí tienen un efecto significativo en el crecimiento de la cepa A5, indicando mayor eficiencia en la producción de ATP en el medio M2a (5 % de sacarosa) y M2 (10 % de sacarosa), donde se encontró una mayor concentración de células viables a partir de las 16 h de incubación.

El consumo de ambas fuentes de carbono (lactosa y sacarosa) depende del tipo de cepa ensayada, se ha reportado que algunas cepas de *Lactobacillus* spp. tienen la capacidad de crecer únicamente en un limitado número de sustratos prefiriendo la utilización de mono y disacáridos (De Vos, 1996). Se ha reportado en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* CRL 454 inoculadas en suero de leche reconstituido el consumo del 12 % de la concentración inicial de lactosa (Pescuma y col., 2008). En otros ensayos como los realizados por Calderón y col. (2003) las cepas de *Lactobacillus* sp. presentaron preferencia por el consumo de sacarosa. Se deben de realizar más ensayos para determinar que sustrato es preferentemente consumido por la cepa A5 en los medios evaluados.

La temperatura de fermentación es un factor importante para el consumo de la lactosa por bacterias mesofílicas, el incremento de la actividad enzimática a temperaturas de 30 °C promueve la síntesis

de enzimas para desdoblar la lactosa (Aritidis y col., 2011). Los medios evaluados en este ensayo mantuvieron una temperatura de fermentación de 37 °C que pudiera favorecer la síntesis de enzimas por los lactobacilos y su uso para adquirir los nutrientes del medio.

En la tabla 9 se muestran algunos parámetros cinéticos calculados de los medios de crecimiento, como la velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de generación de la cepa. La μ fue calculada cuando el crecimiento celular exponencial se ajustó a un modelo lineal de crecimiento.

Se puede observar en la tabla 9 que no se encontró diferencia significativa en los medios M2 y M2a (10 y 5 % de sacarosa, respectivamente) en la velocidad específica de crecimiento (μ) con valores de 0.25 y 0.26 h⁻¹, respectivamente, indicando un crecimiento celular más acelerado en la fase exponencial de las bacterias en comparación con los medios M2b y M2c (2.5 y 0 % de sacarosa, respectivamente) con velocidades específicas de crecimiento de 0.23 y 0.22 h⁻¹, respectivamente.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de la cepa A5 en los medios de cultivo M2, M2a, M2b y M2c.

Parámetro / medios de crecimiento	Unidades	M2	M2a	M2b	M2c
Velocidad específica de crecimiento (μ)	h ⁻¹	0.25 ± 0.01* ^{ab}	0.26 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.004 ^c	0.22 ± 0.007 ^c
Tiempo de generación	h	2.7 ± 0.19 ^c	2.6 ± 0.13 ^c	2.9 ± 0.17 ^{ab}	3.15 ± 0.1 ^a

*Media ± desviación estándar. Letras diferentes hay diferencia significativa (P<0.05), comparación entre filas. n= 3. M2 (suero de leche 90 % y sacarosa 10 %), M2b (suero de leche 97.5 % y sacarosa 2.5 %), M2a (suero de leche 95 % y sacarosa 5 %) y M2c (suero de leche 100 % y sacarosa 0 %).

La velocidad específica de crecimiento encontrada en éste ensayo puede ser comparada con los reportes de Pescuma y col. (2008) quienes reportaron en *Lactobacillus acidophilus* CRL 636 inoculada en suero de leche reconstituido una velocidad específica de crecimiento de 0.23 h⁻¹, sin embargo, en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* CRL 454 y *S. thermophilus* CRL 804 reportaron velocidades específicas de crecimiento de 0.51 y 0.31 h⁻¹, respectivamente. Brizuela y col. (2001) reportaron en *Lactobacillus* sp. LB-12 y *Lactobacillus* B/103-1-5 velocidades de crecimiento específico de 0.54 y 0.49 h⁻¹, respectivamente.

Årsköld y col. (2008) inocularon a *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 en 50 g/L de sacarosa, 50 g/L de glucosa y 25 g/L de glucosa y fructosa como principal fuente de carbono, encontrando velocidades específicas de crecimiento de 0.82, 0.45 y 0.66 h⁻¹, respectivamente, ellos reportaron la preferencia al consumo de sacarosa por las bacterias lácticas. La μ de las bacterias sembradas en los medios M2, M2a, M2b y M2 está regulada por la fuente de carbono empleada y por factores de crecimiento que pudieran ser una limitante en comparación con aquellos medios definidos o semi definidos. El medio usado por Årsköld y col. (2008) fue un medio de crecimiento enriquecido con factores de crecimiento adicionales y debido a esto encontraron velocidades de crecimiento específico superiores a las encontradas en este trabajo, sin embargo, los medios realizados en este ensayo son medios económicos que podrían contrarrestar el menor crecimiento celular con el costo de producción.

El tiempo de generación indica el tiempo que necesitan las células para crecer y dividirse dando lugar al doble de la población, a mayores velocidades específicas de crecimiento el tiempo de generación es menor. En este ensayo se encontró una diferencia significativa entre los tiempos de generación, la cepa A5 en los medios con 10 y 5 % de sacarosa (M2 y M2a, respectivamente) presentó un tiempo de generación de 2.7 y 2.6 h, respectivamente, en comparación con los medios M2b y M2c, en donde la cepa necesitó más tiempo para aumentar el doble de su población (2.9 y 3.5 h, respectivamente). Årsköld y col. (2008) reportaron tiempos de generación de 1.2 a 1.4 h en *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 siendo menores a los encontrados en este ensayo, hay que considerar que ellos utilizan un medio enriquecido y por lo tanto el crecimiento celular fue mayor.

En este ensayo se seleccionó el medio con 5 % de sacarosa (M2a) debido a que estimula un mayor crecimiento celular de la cepa A5 en comparación con los medios M2b y M2c, además de mantener su cuenta viable en las 72 h de incubación y aunque no se encontró diferencia significativa con el medio con 10 % de sacarosa (M2) representa un menor costo de producción con la misma producción de células, por lo que es el seleccionado para el crecimiento de la cepa A5.

6.4 Acondicionamiento del hongo para su integración en el alimento.

Con la finalidad de incrementar la actividad antioxidante del hongo *Lentinula edodes* se realizaron diferentes tratamientos de cocción y secado (Tabla 1). En los tratamientos con secado se monitoreó la pérdida de peso del hongo a través del tiempo, encontrando un tiempo de secado de 9 h para los

hongos sometidos a 35 y 60 °C y de 7 h a la temperatura de 100 °C, se observó que el tipo de tratamiento aplicado al hongo no afectó en el tiempo de secado, debido a que todos los tratamientos presentaron el mismo perfil en la reducción de su peso.

Una vez realizados los tratamientos térmicos al hongo, se determinó su actividad antioxidante, resultados descritos a continuación.

6.4.1 Determinación de la actividad antioxidante de los hongos tratados.

Los tratamientos realizados al hongo *Lentinula edodes* (Tabla 1) implicaron altas y bajas temperaturas, en este ensayo, se determinó el efecto de la temperatura sobre las muestras de hongo y el efecto de la cantidad de agua utilizada para su tratamiento sobre su actividad antioxidante. En la tabla 10, se presentan los valores encontrados expresando los resultados como porcentaje de captura del radical DPPH.

El hongo fresco (H) presentó una concentración de 61.7 ± 0.3 % de captura del radical DPPH, concentración que fue superior a las reportadas por Choi y col. (2005) en *Lentinula edodes* con valores de 45.1 % de captura del radical DPPH, esta variación en la concentración de actividad antioxidante en una misma clase de hongo podría depender de la variedad, sustrato y condiciones de siembra al que fue sometido. Barros y col. (2011) reportaron en variedades de castañas concentraciones diferentes de antioxidantes y reportaron que éste comportamiento se debe al tipo de cultivo y variedad.

En los tratamientos con ebullición en agua (HE-1 al HE-6) la actividad antioxidante disminuyó en comparación con el hongo fresco (H), se encontró una diferencia significativa en todos los tiempos y relaciones hongo: agua evaluadas. La disminución de la actividad antioxidante podría deberse a la pérdida de aquellas moléculas sensibles al calor. Estos resultados coinciden con los reportes de Barros y col. (2011) quienes encontraron una disminución de la actividad antioxidante de 25 al 54 % en castañas cocidas en agua por 20 min, atribuyendo el daño de los antioxidantes a la exposición al calor.

Tabla 10. Porcentaje de captura del radical DPPH de los hongos tratados.

Tratamiento	% captura del radical DPPH	Tratamiento	% captura del radical DPPH
Control H	61.7 ± 0.2 ^a		
HE-1	29.7 ± 5.8 ^{b,A}	HE-4	29.3 ± 6.7 ^{c,B}
HE-2	39.4 ± 6.0 ^{1,B}	HE-5	28.3 ± 1.8 ^{d,A}
HE-3	31.0 ± 3.0 ^{b,A}	HE-6	26.4 ± 2.2 ^{e,B}
AHE-1	53.6 ± 1.3 ^{b,A}	AHE-4	39.9 ± 2.8 ^{b,B}
AHE-2	53.4 ± 0.2 ^{b,B}	AHE-5	30.4 ± 1.4 ^{b,A}
AHE-3	48.2 ± 2.8 ^{c,A}	AHE-6	29.8 ± 0.5 ^{c,B}
Control HS35	51.4 ± 1.2 ^b		
HS35-E-1	5.1 ± 1.4 ^{cd,A}	HS35-E-4	3.2 ± 0.6 ^{e,A}
HS35-E-2	4.9 ± 1.7 ^{cde,A}	HS35-E-5	4.0 ± 0.2 ^{de,A}
HS35-E-3	3.2 ± 0.6 ^{e,B}	HS35-E-6	6.0 ± 1.0 ^{c,A}
AHS35-E-1	45.0 ± 0.9 ^{c,A}	AHS35-E-4	26.3 ± 2.8 ^{d,B}
AHS35-E-2	62.5 ± 1.0 ^{a,A}	AHS35-E-5	25.3 ± 2.0 ^{c,B}
AHS35-E-3	29.6 ± 1.3 ^{d,B}	AHS35-E-6	42.1 ± 1.6 ^{d,A}
Control HS60	50.8 ± 0.4 ^c		
HS60-E-1	3.9 ± 1.6 ^{e,B}	HS60-E-4	11.3 ± 1.3 ^{d,A}
HS60-E-2	3.9 ± 1.0 ^{e,A}	HS60-E-5	2.7 ± 1.5 ^{e,A}
HS60-E-3	5.4 ± 2.5 ^{e,A}	HS60-E-6	2.7 ± 1.5 ^{e,A}
AHS60-E-1	49.3 ± 2.1 ^{c,A}	AHS60-E-4	31.6 ± 1.0 ^{e,B}
AHS60-E-2	66.5 ± 2.0 ^{a,A}	AHS60-E-5	29.9 ± 2.8 ^{e,B}
AHS60-E-3	58.8 ± 7.0 ^{b,A}	AHS60-E-6	44.6 ± 5.6 ^{d,B}
Control HS100	50.6 ± 2.0 ^b		
HS100-E-1	2.1 ± 0.3 ^{e,B}	HS100-E-4	4.1 ± 0.8 ^{de,A}
HS100-E-2	4.3 ± 0.5 ^{d,A}	HS100-E-5	4.1 ± 1.0 ^{de,A}
HS100-E-3	8.2 ± 1.3 ^{c,A}	HS100-E-6	5.6 ± 1.7 ^{d,A}
AHS100-E-1	67.4 ± 2.1 ^{a,A}	AHS100-E-4	40.5 ± 0.8 ^{c,B}
AHS100-E-2	67.0 ± 1.3 ^{a,A}	AHS100-E-5	54.0 ± 2.4 ^{a,B}
AHS100-E-3	50.5 ± 1.3 ^{b,B}	AHS100-E-6	56.6 ± 1.7 ^{a,A}
Control H	61.7 ± 0.2 ^a		
HES35-1	30.7 ± 0.7 ^{b,A}	HES35-4	27.8 ± 1.5 ^{c,B}
HES35-2	31.5 ± 1.1 ^{b,A}	HES35-5	26.1 ± 1.3 ^{c,B}
HES35-3	25.7 ± 2.5 ^{c,A}	HES35-6	21.9 ± 2.3 ^{d,A}
HES60-1	41.8 ± 1.2 ^{b,A}	HES60-4	37.1 ± 2.3 ^{c,B}
HES60-2	30.4 ± 0.9 ^{e,A}	HES60-5	24.0 ± 0.5 ^{f,B}
HES60-3	33.8 ± 1.3 ^{d,A}	HES60-6	15.3 ± 0.7 ^{g,B}
HES100-1	39.7 ± 4.1 ^{b,A}	HES100-4	40.2 ± 1.2 ^{b,A}
HES100-2	24.4 ± 2.4 ^{e,B}	HES100-5	32.6 ± 1.5 ^{d,A}
HES100-3	28.3 ± 2.6 ^{e,A}	HES100-6	18.2 ± 2.3 ^{f,B}
Control HS4	57.6 ± 3.1 ^a		
HS4As-1	48.4 ± 2.1 ^b	HS4Ac-1	17.3 ± 4.0 ^d
HS4As-2	46.4 ± 3.0 ^b	HS4Ac-2	45.2 ± 1.6 ^b
HS4As-3	30.0 ± 2.2 ^c	HS4Ac-3	37.5 ± 3.7 ^c
HS4A-1	57.9 ± 1.9 ^a	HS4B-1	50.4 ± 1.7 ^b
HS4A-2	53.8 ± 1.7 ^b	HS4B-2	45.1 ± 3.1 ^c
		HS4B-3	51.0 ± 0.8 ^b

*Media ± desviación estándar. Letras diferentes hay diferencia significativa (P<0.05).

Letras minúsculas: comparación entre columnas en una misma relación hongo: agua, letras mayúsculas: comparación entre filas de un mismo tratamiento de un mismo tratamiento. n=6 y 3.

H: Hongo fresco

HE-1 al HE-3: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:10.

HE-4 al HE-6: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:20.

AHE1 al AHE-6: agua de ebullición de los tratamientos HE-1 al HE-6.

HS35: Hongo seco a 35 °C.

HS35E-1 al HS35E-3: Hongo seco a 35 °C con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min y la relación 1:10.

HS35E-4 al HS35E-6: Hongo seco a 35 °C con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min y la relación 1:20.

AHS35E-1 al AHS35E-6: agua de ebullición de los tratamientos HS35E-1 al HS35E-6

HS60: Hongo seco a 60 °C

HS60E-1 al HS60E-3: Hongo seco a 60 °C con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min y la relación 1:10.

HS60E-4 al HS60E-6: Hongo seco a 60 °C con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min y la relación 1:20.

AHS60E-1 al AHS60E-6: agua de ebullición de los tratamientos HS60E-1 al HS60E-6

HS100: Hongo seco a 100 °C

HS100E-1 al HS100E-3: Hongo seco a 100 °C con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min y relación 1:10.

HS100E-4 al HS100E-6: Hongo seco a 100 °C con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min y relación 1:20.

AHS100E-1 al AHS100E-6: agua de ebullición de los tratamientos HS100E-1 al HS100E-6.

HES35-1 al HES35-3: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:10 con su posterior secado a 35 °C.

HES35-4 al HES35-6: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:20 con su posterior secado a 35 °C.

HES60-1 al HES60-3: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:10 con su posterior secado a 60 °C.

HES60-4 al HES60-6: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:20 con su posterior secado a 60 °C

HES6100-1 al HES100-3: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:10 con su posterior secado a 100 °C.

HES6100-4 al HES100-6: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:20 con su posterior secado a 100 °C.

HS4: Hongo seco a 4 °C.

HS4As-1 al HS4As-3: Hongo seco a 4 °C con su posterior asado por 2, 4 y 5 min.

HS4Ac-1 al HS4Ac-3: Hongo seco a 4 °C con su posterior freído en aceite por 2, 4 y 5 min.

HS4A-1 al HS4A-2: Hongo seco a 4 °C con su posterior cocción en autoclave por 10 y 30 min.

HS4B-1 al HS4B-3: Hongo seco a 4 °C con su posterior cocción en baño maría por 5, 10 y 30 min.

Las muestras de *Lentinula edodes* tienen propiedades antioxidantes y es necesario considerar que presentan radicales generados por procesos normales de la célula como la generación de energía. La formación de radicales libres, está asociada con el metabolismo normal de las células (Barros y col., 2007) y es necesario tomar en cuenta la posible interacción o inhibición entre diferentes clases de antioxidantes y los radicales presentes en la muestra que podrían estar afectando la actividad antioxidante final (Di Majo y col., 2008). Se ha reportado que los procesos térmicos son generalmente aplicados para extender la vida de anaquel de los productos, sin embargo, los antioxidantes pueden ser perdidos durante tal proceso debido a la naturaleza de los nutrientes, algunos de ellos inestables al calor (Choi y col., 2005). Los hongos contienen vitaminas E, C, niacina, tiamina, riboflavina y biotina (Sasidharan y col., 2010), algunas de ellas son termolábiles y tienen propiedades antioxidantes, tal es el caso de la vitamina C, la cual es disminuida en procesos térmicos.

En el agua de ebullición de los tratamientos HE-1 al HE-6 se encontraron compuestos antioxidantes, de esta manera, el agua funcionó como disolvente para su extracción. Cheung y col. (2003) utilizaron diferentes disolventes entre ellos metanol y agua para realizar la extracción de los compuestos que promueven la actividad antioxidante del hongo *Lentinula edodes*, encontrando al agua como un buen disolvente para tal extracción. Los resultados encontrados en este ensayo para el agua de ebullición sugieren que hay la formación de nuevos compuestos antioxidantes, sin embargo, no quedan retenidos en el hongo sino pasan a la fase acuosa.

La cantidad de agua agregada al hongo sí presentó efecto sobre la formación de compuestos antioxidantes. En la relación 1:20 (HE-4 al HE-6) los hongos estuvieron en mayor contacto con el agua y se extrajeron en mayor cantidad de antioxidantes por tener mayor área de contacto. En estos tratamientos se encontró una diferencia significativa con respecto al control (hongo fresco), sin embargo, debe de considerarse una buena concentración debido a que están disueltos 2 veces más que en la relación 1:10. La relación hongo: agua 1:10 favoreció la actividad antioxidante en los tratamientos HE-1 y HE-6 (hongos con ebullición en agua por 5 y 30 min) y la 1:20 para el tratamiento HE-5 (hongos con ebullición en agua por 10 min).

La transferencia de compuestos antioxidantes a la fase acuosa se pueden comparar con los reportes de Oboh y col. (2010), quienes encontraron en extractos calentados a 100 °C por 10 min de la hierba del limón, en una relación 1:10, un incremento del 50 al 70 % de captura del radical DPPH en comparación con los extractos no calentados, indicando la transferencia de los compuestos

solubles al agua debido al calor.

En la tabla 10 se observan los resultados de los tratamientos HS35, HS60 y HS100 (hongos secos a 35, 60 y 100 °C, respectivamente) utilizados como controles, donde se encontró una diferencia significativa con respecto al hongo fresco (análisis no presentado) con una disminución del aproximadamente 17 %. Miranda y col. (2010) reportaron en las semillas quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) un efecto positivo por la acción del secado a 40, 50, 60, 70 y 80 °C, encontrando a los 60 y 70 °C una mayor concentración de antioxidantes, esto indica que la capacidad antioxidante depende del tipo de muestra y variedad utilizada, debido a que en este ensayo no se encontraron resultados similares.

Los tratamientos de secado del hongo a 35, 60 y 100 °C con su posterior ebullición en agua (HS35E-1 al HS35E-6, HS60E-1 al HS60E-6 y HS100E-1 al HS100E-6) presentaron una diferencia significativa con respecto a su control, con una disminución de aproximadamente 88 al 94 % en todos los tiempos y relaciones hongo: agua evaluadas, estos tratamientos no representaron una alternativa de acondicionamiento del hongo *Lentinula edodes*. Sin embargo, el agua de ebullición utilizada incrementó su actividad antioxidante un 21, 30, 33, 32, 6.7 y 11.8 % en los tratamientos del agua de ebullición AHS35-2, AH60E-1, AHS100E-2, AHS100E-5 y AHS100E-6, respectivamente, en comparación con el control utilizado.

Estos resultados amplían el panorama de los beneficios que podríamos obtener del hongo *Lentinula edodes* al ser consumido el cuerpo fructífero y el agua de ebullición en té o infusiones. Los hongos han sido usados por muchos años por culturas orientales como té y alimentos funcionales debido a su especial fragancia y textura (Manzi y col., 1999). *Inonotus obliquus* (hongo comestible) ha sido tradicionalmente usado por sus efectos benéficos a la salud administrado usualmente en extractos de agua caliente con efectos antimicóticos (Burczyk y col., 1966).

Una explicación del aumento de la actividad antioxidante en el agua de ebullición de los tratamientos podría ser la reportada por Morales y Babel (2002), quienes reportaron un aumento de antioxidantes en hortalizas cocidas debido a la destrucción térmica de las paredes y sub-compartimentos celulares, a la eliminación de radicales por acción de los antioxidantes, a la supresión de la capacidad de oxidación por la inactivación térmica de las enzimas oxidativas y la producción de nuevos compuestos antioxidantes como los productos de la reacción de Maillard. Xu y Chang (2008) reportaron que los cambios en las propiedades antioxidantes podrían deberse a la

lixiviación de compuestos antioxidantes solubles en agua y la formación o pérdida de antioxidantes durante el tratamiento.

En tabla 10 se muestran los resultados encontrados en los hongos con ebullición en agua con su posterior secado a 35, 60 y 100 °C (HES35-1 al HES35-6, HES60-1 al HES60-6 y HES100-1 al HES100-6). En estos tratamientos se encontró una diferencia significativa en todos los tiempos y relaciones hongo: agua evaluados con respecto al control, con una reducción de aproximadamente 32 al 70 %, por lo que estos tratamientos no fueron apropiados para el incremento de la actividad antioxidante. Según Choi y col. (2005) el tratamiento de calor puede producir cambios en la extracción de los compuestos debido a la disrupción de la pared celular, los compuestos antioxidantes encontrados dentro de la célula son más fácilmente librados con el calentamiento, sin embargo, en estos tratamientos este efecto no se observó.

Los hongos secos a 4 °C presentaron una concentración de 56.7 ± 2.2 % de captura del radical DPPH, no se encontró diferencia significativa con respecto al hongo fresco, siendo un tratamiento que podría ser considerado para la conservación de antioxidantes en el hongo. Cheung y col. (2003) reportaron concentraciones de 38.3 a 40.4 % de captura del radical DPPH en el hongo *Lentinula edodes* liofilizado, estos resultados son superados por el tratamiento a 4 °C. El secado a bajas temperaturas podría mantener la actividad antioxidante del hongo debido a que los cambios morfológicos en la célula no son drásticos como en el secado a altas temperaturas.

Se encontró una diferencia significativa en los hongos secos a 4 °C a su posterior asado (HS4As-1, HS4As-2 y HS4As-3) con concentraciones de 48.4 ± 1.2 , 46.4 ± 3.9 y 30.0 ± 1.7 % de captura del radical DPPH, respectivamente. Tubaro y col. (1996) reportaron que el asado destruye algunos compuestos con propiedades antioxidantes, pero los productos generados por la reacción de Maillard aumentan los antioxidantes. En estos tratamientos no se observó la formación de antioxidantes, estos disminuyeron con forme aumentó el tiempo de exposición al calor. Kim y col. (2011) aplicaron tratamientos de asado a soya negra (*Glycine max* L. Merrill) a 250 °C por 26, 30 y 34 min, ellos encontraron un incremento en la actividad antioxidante de 48, 65 y 58 %, respectivamente, en comparación con la soya no tratada, efecto que no se presentó en el asado del hongo *Lentinula edodes*.

En los hongos secos a 4 °C con su posterior freído en aceite (HS4Ac-1, HS4Ac-2 y HS4Ac-3) se encontró una diferencia significativa en comparación con el control, con una disminución de

aproximadamente el 69, 20 y 34 % de captura del radical DPPH, respectivamente. Murcia y col. (2009) frieron en aceite de oliva (75 ml) vegetales (200 g) entre ellos zanahorias, acelgas, ensaladas y sopas y encontraron que la actividad antioxidante total no se fue afectada significativamente por éste tratamiento (excepto en acelgas), en otro ensayo, la inhibición de la peroxidación lipídica sí es afectada por el freído. Cho y col. (2008) reportaron que el freído en aceite de oliva algunos compuestos como las vitaminas y fenóles presentes en el aceite pueden preservar o incrementar la actividad antioxidante, dependiendo de la temperatura, tiempo y grado de enranciamiento del aceite. El tratamiento de freído aplicado a *Lentinula edodes* no aumentó su concentración de antioxidantes quizás por la cantidad de aceite utilizada (1 ml) y tipo de aceite (aceite refinado de girasol y/o canola adicionado con 0.007% del antioxidante BHT). Según Moller (2003) los aceites de girasol y canola contienen menor cantidad de antioxidantes que los de oliva, por lo que la transferencia de antioxidantes del aceite al hongo fue menor.

En el hongo seco a 4 °C con su posterior cocción en autoclave por 2 min (HS4A-1) presentó un valor de 58.9 ± 1.5 % de captura del radical DPPH, no se encontró diferencia significativa con respecto al control (hongo seco a 4 °C), por lo que podría ser considerado para el acondicionamiento de *Lentinula edodes*. Choi y col. (2005) reportaron que la actividad antioxidante de *Lentinula edodes* aumentó aproximadamente un 72 % de captura del radical DPPH cuando sometieron los hongos a cocción en autoclave a 100 y 121 °C por 10 y 30 min, datos que no son parecidos a los encontrados en este ensayo, donde únicamente se mantiene la actividad antioxidante sin aumentarla, esto se puede deber a la variedad y condiciones de cultivo a las que fue sometido el hongo.

Xu y Chang (2008) reportaron en legumbres cocidas a presiones de 5 y 15 psi por 15, 60 y 70 min, una disminución de la actividad antioxidante del 51–67 % en guisantes verdes, 49–67 % en guisantes amarillos, 33–83% en garbanzos y 14–26 % en lentejas, en este ensayo se encontró una disminución del 0 y 3.4 % para el tratamiento HS4A-1 y HS4A-2, respectivamente.

Los hongos secos a 4 °C con su posterior cocción en baño maría (HS4B-1, HS4B-2 y HS4B-3) presentaron una disminución del 11, 20 y 10 % de captura del radical DPPH, respectivamente, en comparación con el control. Aunque en este tratamiento hay una diferencia significativa, esta no es drástica como en los tratamientos con una ebullición en agua (con disminuciones de 50 %), esto podría deberse a que el hongo no estuvo en contacto con el agua y los compuestos antioxidantes no pasaron a esta fase.

Se realizó una comparación de los mejores tratamientos aplicados al hongo mostrada en la tabla 11, en donde se encontró al hongo fresco (H), hongo seco a 4 °C (HS4) y hongo seco a 4 °C con su posterior cocción en autoclave por 10 min (HS4-2) la mayor concentración de compuestos antioxidantes, con valores de 61.7 ± 0.3 , 56.7 ± 2.2 y 58.9 ± 1.5 % de captura del radical DPPH, respectivamente.

Debido a que el hongo fresco es un producto perecedero es necesario implementar estrategias para su conservación por un mayor tiempo, los tratamientos HS4 y HS4A-2 (secado a 4 °C y secado a 4 °C con su posterior cocción en autoclave por 10 min) podrían representar una estrategia para evitar su deterioro y la pérdida de sus características antioxidantes.

Tabla 11. Porcentaje de captura del radical DPPH de los mejores tratamientos aplicados al hongo.

Tratamiento	% captura del radical DPPH
H	$61.7 \pm 0.3^* \text{ }^a$
HS4	$56.7 \pm 2.2 \text{ }^a$
HS4A-1	$58.9 \pm 1.5 \text{ }^a$

*Media \pm desviación estándar. Letras diferentes hay diferencia significativa (P<0.05). n=6 y 3.

H: Hongo fresco

HS4: Hongo seco 4 °C

HS4A-1: Hongo seco 4 °C con posterior cocción en autoclave por 10 min

Los antioxidantes son compuestos que cuando se agregan a los alimentos pueden aumentar la vida de anaquel (Seok y col., 2010). Antioxidantes sintéticos como el BHA y BHT han sido utilizados para evita la oxidación en alimentos, pero han sido restringidos por ser sospechosos de ser carcinógenos (Namiki, 1990). Los tratamientos HS4 y HS4A-2 podrían representar una alternativa para enriquecer otros alimentos con antioxidantes naturales.

Aunque en el tratamiento HS4As-1 (Hongo seco a 4 °C con su posterior asado por 2 min) presentó una diferencia significativa con respecto al control (con una disminución del 20 y 14 % de captura del radical DPPH en comparación con el hongo fresco y el hongo seco a 4 °C, respectivamente) es de importancia mencionar que el asado generó la formación de otros compuestos de interés sensorial

que brindan al paladar de los consumidores mayor aceptación en comparación con otros tratamientos realizados y podría tener mayor significancia incluso que aquellos cuya actividad antioxidante fue mayor debido a la conjunción de dos características importantes: la aceptabilidad de los consumidores y la existencia de compuestos con potencial benéfico a la salud, la aplicación de uno o de otro tratamiento dependerá del tipo de producto que se requiera obtener.

El tratamiento HS4As-1 (Hongo seco a 4 °C con su posterior asado por 2 min) fue el seleccionado para acondicionar el hongo y utilizarlo en la elaboración de un alimento con potencial funcional debido a las características sensoriales adquiridas durante el asado y mantener una actividad antioxidante aceptable.

6.4.2 Determinación de polifenoles totales en los hongos tratados.

Se cuantificó la concentración de polifenoles totales a cada una de las muestras de hongo tratadas según lo descrito en la tabla 1, expresando los resultados como mg equivalentes de ácido gálico por g de muestra seca (mg GAE/g muestra seca).

En la tabla 12, se muestran los valores encontrados en los tratamientos. Donde se observa que el hongo fresco presentó una concentración de 10.1 ± 2.7 mg GAE/g muestra seca, concentración que supera lo reportado por Choi y col. (2005), quienes encontraron en *Lentinula edodes* concentraciones de 0.29 mg GAE/g muestra seca. La concentración y composición de compuestos fenólicos en los hongos puede ser afectada por la variedad, composición del medio de crecimiento, técnicas de producción, condiciones de crecimiento y preparación de sustratos (Heleno y col., 2010).

En otros hongos comestibles se ha reportado la presencia de polifenoles totales, en *Tricholoma portentosum* se han encontrado valores de 10.8 ± 0.47 mg GAE/g muestra seca (Ferreira y col., 2007), en *Laccaria laccata* 1.5 ± 0.02 mg GAE/g muestra seca, en *Suillus mediterraneensis* 7.4 ± 0.21 mg GAE/g muestra seca, en *R. vesca* 6.6 ± 0.36 mg GAE/g muestra seca, en *H. aurantiaca* 7.9 ± 0.29 mg GAE/g muestra seca y en *C. alexandri* 1.5 ± 0.06 mg GAE/g muestra seca (Heleno y col., 2010). En este ensayo se encontró al hongo *Lentinula edodes* con altas concentraciones de polifenoles totales comparado con otro tipo de hongos comestibles.

Tabla 12. Polifenoles totales en los hongos tratados.

Tratamiento	mg GAE/g muestra seca	Tratamiento	mg GAE/g muestra seca
Control H	10.1 ± 2.7* ^a		
HE-1	6.4 ± 1.7 ^{b,A}	HE-4	6.1 ± 1.2 ^{b,A}
HE-2	10.9 ± 3.1 ^{a,A}	HE-5	4.8 ± 1.3 ^{bc,B}
HE-3	5.0 ± 1.6 ^{bc,A}	HE-6	3.1 ± 0.9 ^{c,B}
AHE-1	1.0 ± 0.1 ^{d,A}	AHE-4	0.5 ± 0.0 ^{b,B}
AHE-2	2.6 ± 0.0 ^{b,A}	AHE-5	0.4 ± 0.0 ^{b,B}
AHE-3	2.1 ± 0.1 ^{c,A}	AHE-6	0.7 ± 0.2 ^{b,B}
Control HS35	15.0 ± 0.9 ^a		
HS35-E-1	2.2 ± 0.4 ^{bc,A}	HS35-E-4	1.3 ± 0.3 ^{cd,B}
HS35-E-2	2.7 ± 0.8 ^{b,A}	HS35-E-5	1.0 ± 0.3 ^{d,B}
HS35-E-3	2.3 ± 0.4 ^{bc,A}	HS35-E-6	1.1 ± 0.1 ^{d,B}
AHS35-E-1	0.8 ± 0.2 ^{bc,A}	AHS35-E-4	0.2 ± 0.03 ^{b,B}
AHS35-E-2	1.3 ± 0.3 ^{b,A}	AHS35-E-5	0.2 ± 0.04 ^{b,B}
AHS35-E-3	0.2 ± 0.02 ^{c,B}	AHS35-E-6	0.4 ± 0.03 ^{b,A}
Control HS60	15.9 ± 1.8 ^a		
HS60-E-1	1.5 ± 0.4 ^{b,A}	HS60-E-4	1.3 ± 0.5 ^{b,A}
HS60-E-2	1.2 ± 0.4 ^{b,A}	HS60-E-5	1.4 ± 0.2 ^{b,A}
HS60-E-3	1.6 ± 0.6 ^{b,A}	HS60-E-6	1.6 ± 0.5 ^{b,A}
AHS60-E-1	0.5 ± 0.1 ^{c,A}	AHS60-E-4	0.2 ± 0.0 ^{d,B}
AHS60-E-2	1.4 ± 0.2 ^{b,A}	AHS60-E-5	0.3 ± 0.0 ^{cd,B}
AHS60-E-3	1.4 ± 0.06 ^{b,A}	AHS60-E-6	0.6 ± 0.2 ^{b,B}
Control HS100	17.7 ± 1.4 ^a		
HS100-E-1	2.1 ± 0.4 ^{b,A}	HS100-E-4	2.1 ± 0.5 ^{b,A}
HS100-E-2	3.0 ± 1.1 ^{b,A}	HS100-E-5	2.4 ± 0.4 ^{b,A}
HS100-E-3	3.2 ± 0.2 ^{b,A}	HS100-E-6	2.5 ± 0.3 ^{b,B}
AHS100-E-1	1.0 ± 0.0 ^{d,A}	AHS100-E-4	0.6 ± 0.1 ^{bc,B}
AHS100-E-2	1.3 ± 0.1 ^{cd,A}	AHS100-E-5	0.6 ± 0.2 ^{bc,B}
AHS100-E-3	2.4 ± 0.7 ^{b,A}	AHS100-E-6	2.1 ± 0.6 ^{b,A}
Control H			
HES35-1	7.8 ± 0.4 ^{c,B}	HES35-4	10.3 ± 0.8 ^{b,A}
HES35-2	5.5 ± 0.7 ^{d,B}	HES35-5	12.8 ± 0.7 ^{a,A}
HES35-3	5.3 ± 0.9 ^{d,B}	HES35-6	12.3 ± 0.9 ^{a,A}
HES60-1	6.3 ± 0.9 ^{b,A}	HES60-4	5.3 ± 0.7 ^{bc,A}
HES60-2	4.6 ± 0.6 ^{c,A}	HES60-5	5.0 ± 0.8 ^{bc,A}
HES60-3	3.0 ± 1.4 ^{cd,A}	HES60-6	3.8 ± 1.0 ^{cd,A}
HES100-1	8.9 ± 1.7 ^{a,A}	HES100-4	6.4 ± 1.2 ^{bc,B}
HES100-2	8.4 ± 3.0 ^{ab,A}	HES100-5	5.4 ± 1.2 ^{cd,A}
HES100-3	4.2 ± 0.5 ^{de,A}	HES100-6	3.0 ± 0.3 ^{e,B}
Control HS4	10.3 ± 1.7 ^a		
HS4As-1	8.7 ± 1.1 ^b	HS4Ac-1	7.7 ± 0.9 ^c
HS4As-2	8.5 ± 0.6 ^{bc}	HS4Ac-2	12.4 ± 1.3 ^a
HS4As-3	7.2 ± 0.5 ^c	HS4Ac-3	11.3 ± 1.2 ^{ab}
HS4A-1	11.5 ± 0.6 ^a	HS4B-1	10.43 ± 0.6 ^{ab}
HS4A-2	13.0 ± 0.8 ^a	HS4B-2	11.4 ± 0.3 ^a
		HS4B-3	11.7 ± 0.5 ^a

*Media ± desviación estándar. Letras diferentes hay diferencia significativa (P<0.05).

Letras minúsculas: comparación entre columnas en una misma relación hongo: agua,

letras mayúsculas: comparación entre filas de un mismo tratamiento de un mismo tratamiento.

n=6 y 3.

H: Hongo fresco

HE-1 al HE-3: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:10.

HE-4 al HE-6: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:20.

AHE1 al AHE-6: agua de ebullición de los tratamientos HE-1 al HE-6.

HS35: Hongo seco a 35 °C.

HS35E-1 al HS35E-3: Hongo seco a 35 °C con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min y la relación 1:10.

HS35E-4 al HS35E-6: Hongo seco a 35 °C con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min y la relación 1:20.

AHS35E-1 al AHS35E-6: agua de ebullición de los tratamientos HS35E-1 al HS35E-6

HS60: Hongo seco a 60 °C

HS60E-1 al HS60E-3: Hongo seco a 60 °C con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min y la relación 1:10.

HS60E-4 al HS60E-6: Hongo seco a 60 °C con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min y la relación 1:20.

AHS60E-1 al AHS60E-6: agua de ebullición de los tratamientos HS60E-1 al HS60E-6

HS100: Hongo seco a 100 °C

HS100E-1 al HS100E-3: Hongo seco a 100 °C con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min y relación 1:10.

HS100E-4 al HS100E-6: Hongo seco a 100 °C con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min y relación 1:20.

AHS100E-1 al AHS100E-6: agua de ebullición de los tratamientos HS100E-1 al HS100E-6.

HES35-1 al HES35-3: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:10 con su posterior secado a 35 °C.

HES35-4 al HES35-6: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:20 con su posterior secado a 35 °C.

HES60-1 al HES60-3: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:10 con su posterior secado a 60 °C.

HES60-4 al HES60-6: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:20 con su posterior secado a 60 °C

HES6100-1 al HES100-3: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:10 con su posterior secado a 100 °C.

HES6100-4 al HES100-6: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:20 con su posterior secado a 100 °C.

HS4: Hongo seco a 4 °C.

HS4As-1 al HS4As-3: Hongo seco a 4 °C con su posterior asado por 2, 4 y 5 min.

HS4Ac-1 al HS4Ac-3: Hongo seco a 4 °C con su posterior freído en aceite por 2, 4 y 5 min.

HS4A-1 al HS4A-2: Hongo seco a 4 °C con su posterior cocción en autoclave por 10 y 30 min.

HS4B-1 al HS4B-3: Hongo seco a 4 °C con su posterior cocción en baño maría por 5, 10 y 30 min.

En tabla 12 se observa el tratamiento de ebullición en agua por 10 min y la relación 1:10 (HE-2) el cual no presentó diferencia significativa con respecto al control, con un valor de 10.9 ± 3.1 mg GAE/g muestra seca. En los demás tratamientos de ebullición en agua (HE-1, HE-3 y HE-4 al HE-6) se encontró una disminución en los polifenoles totales del 36 – 69 %. La ebullición en agua al tiempo 10 min podría estar generando la liberación de polifenoles de los compartimentos celulares.

Se encontró un efecto por la cantidad de agua utilizada en el hongo, el cual presentó diferencia significativa en la relación 1:10 en todos los tiempos evaluados, la 1:20 favoreció únicamente el tratamiento HE-4.

El agua de ebullición de los tratamientos HE-1 al HE-6 presentó el mismo comportamiento encontrado en el ensayo de actividad antioxidante, ésta sirvió de disolvente para la extracción de polifenoles, sin embargo la concentración encontrada fue del 3 y 25 % en comparación con el control. En el agua de ebullición se encontró diferencia significativa entre las relaciones hongo: agua evaluadas.

Oboh y col. (2010) reportaron en extractos de hierba de limón un aumento en su contenido de polifenoles totales de 0.3 ± 0.2 a 0.5 ± 0.3 mg GAE/g cuando fueron calentados a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min, en comparación con los no es calentados, esto indica, que el agua de ebullición de los extractos de plantas retienen en su fase compuestos polifenolicos, efecto que es observado en este ensayo.

Im y col. (2011) sometieron cebollas blancas a cocción en agua en una relación 1:10 por 5, 10, 20, 40 y 60 min y encontraron una disminución de los polifenoles totales conforme avanzó el tiempo de ebullición, a los 10 y 40 min de tratamiento reportaron una disminución del 7 y 49 % de polifenoles totales. Resultados comparables a lo encontrado en el tratamiento HE-2 y HE3 donde se encontró una disminución del 8 y 52 %, respectivamente. La pérdida de polifenoles no es totalmente conocida, sin embargo, podría atribuirse a la transformación o descomposición química de los fenoles (Xu y Chang, 2008).

En los tratamientos HS35, HS60 y HS100 (hongos secos a 35, 60 y $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente) se encontró una diferencia significativa con respecto al control, con concentraciones superiores al hongo fresco (análisis no presentado) de 15.0 ± 0.9 , 15.9 ± 1.8 y 17.7 ± 1.4 mg GAE/g muestra seca, respectivamente, representando un incremento del 40-58 %. Estos resultados superan las concentraciones reportadas por Yang y col. (2002) quienes registraron concentraciones de

polifenoles totales en *Lentinula edodes* 271 y *Lentinula edodes* tainung secos a 40 °C de 6.27 ± 0.02 y 9.11 ± 0.07 mg /g, respectivamente. Yi y Wetzstein (2011) reportaron en romero (*Rosmarinus officinalis*) y otras hierbas culinarias, un incremento de los polifenoles totales en comparación con las muestras frescas cuando fueron secados en una estufa a 40 y 70 °C, sin embargo, depende del tipo de muestra a analizar que éste patrón de incremento se repita. Miranda y col. (2010) reportaron en las semillas quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) secas a 40 °C y 60 °C una disminución del contenido de polifenoles totales del 39 y 82 %, respectivamente. El secado de los hongos a 35, 60 y 100 °C favorece el incremento de los polifenoles totales.

Cuando los hongos fueron secados con su posterior ebullición en agua (HS35E-1 al HS35E-6, HS60E-1 al HS60E-6 y HS100E-1 al HS100E-6) se encontró una diferencia significativa en comparación con el control, en todas las temperaturas, tiempos y relaciones hongo: agua evaluadas, observándose una disminución del 80-97 %. Estos tratamientos no fueron considerados para el acondicionamiento del hongo. En el agua de ebullición de estos tratamientos se encontró del 1 al 13 % de polifenoles totales en comparación con el control, por lo que no son una buena fuente de polifenoles.

Los tratamientos HES35-5, HES35-6 (hongos con ebullición en agua por 10 y 30 min con su posterior secado a 35 °C), HES100-1 y HES100-2 (hongos con ebullición en agua por 5 y 10 min con su posterior secado a 100 °C) no presentaron diferencia significativa con respecto al control. La relación hongo: agua que aumentó los polifenoles totales en los tratamientos HES35-1 al HES35-6 (Hongo con ebullición en agua con su posterior secado a 35 °C) fue la 1:20, en los tratamientos HES60-1 al HES60-6 (Hongo con ebullición en agua con su posterior secado a 60 °C) no se encontró diferencia significativa y en los tratamientos HES100-1 al HES100-6 (Hongo con ebullición en agua con su posterior secado a 100 °C) fue la relación 1:10.

Los hongos secos a 4 °C (HS4) no presentaron diferencia significativa con respecto al hongo fresco (análisis no mostrado), por lo que este tratamiento puede ser considerado para el acondicionamiento del hongo. Cuando los hongos fueron secados a 4 °C con su posterior asado (HS4As-1 al HS4As-3) se observó una diferencia significativa, con una disminución de 15 - 17 % de polifenoles totales. El comportamiento de los polifenoles al tratamiento de asado es diferente dependiendo de la muestra y variedad a analizar. Kim y col. (2011) aplicaron tratamientos de asado a la soya negra (*Glycine max* L. Merrill) a 250 °C por 26, 30 y 34 min y encontraron un incremento de los polifenoles de 27, 33 y 32 %, respectivamente, en comparación con el no tratado, resultados

diferentes a los encontrados en *Lentinula edodes*. Según Barros y col. (2011) la variación entre el contenido de polifenoles de diferentes muestras podría deberse a las propiedades de transferencia térmica que pudieran afectar el paso del calor y su liberación o producción. Otro factor importante es la geometría de la muestra, en este tratamiento *Lentinula edodes* fue asado sin alterar su geometría, asegurando que el tiempo de contacto con el calor en una área del hongo fuera el mismo en otras áreas, sin embargo por la geometría del hongo, no todas las partes recibieron la misma cantidad de calor y quizás por ésta razón el contenido de polifenoles no se incrementó.

En los hongos secos a 4 °C y posteriormente fritos en aceite por 4 y 5 min (HS4Ac-1 y HS4Ac-2, respectivamente) se encontró un aumento significativo de polifenoles totales con respecto al control, con una concentración de 12.4 ± 1.3 y 11.3 ± 1.2 mg GAE/g muestra seca, respectivamente. En el tiempo 2 min de cocción se encontró una disminución del 25 % de polifenoles totales. Resultados similares fueron encontrados por Azizah y col. (2009) quienes reportaron en calabaza (*Cucurbita moschato*) frita por 2, 4 y 6 min una disminución del 18 al 56 % de polifenoles, atribuyéndolo a la inestabilidad de los compuestos al calor. Sahlin y col. (2004) reportaron en tomates (*Lycopersicon esculentum* L. var. Excell y Aranca) fritos una pérdida de los polifenoles. La disminución o aumento de los polifenoles totales y de la actividad antioxidante en los procesos de cocción que involucran altas temperaturas no es claramente entendido debido a la complejidad de interacciones de los compuestos bioactivos.

Cuando se sometió a los hongos secos a 4 °C a su cocción en autoclave y baño maría, HS4A-1 al HS4A-2 y HS4B-1 al HS4B-3) no se encontró una diferencia significativa en el contenido de polifenoles, estos tratamientos podrían considerarse para el acondicionamiento del hongo.

En la cocción del hongo en autoclave a 121 °C se encontró un incremento de los polifenoles totales del 10 y 13 % a los 10 y 30 min, respectivamente. Dicho aumento también es reportado por Choi y col. (2005) en *Lentinula edodes* tratado térmicamente en autoclave a 100 °C por 15 y 30 min, ellos encontraron un incremento de 24 y 29 %, respectivamente, a 121 °C por 15 y 30 min un aumento de 32 y 88 %, respectivamente. Aunque tal aumento encontrado en este ensayo no es de la misma magnitud al reportado por Choi y col. (2005), el tratamiento de cocción en autoclave es favorable para mantener los polifenoles totales. Kyoung y col. (2010) reportaron en *Inonotus obliquus* un aumento en los polifenoles por el tratamiento de calor a 120 °C por 3 h. En otras investigaciones como las realizadas por Xu y Chang (2008) en guisantes y otras legumbres cocidas al vapor a 5 y 15 psi por 15, 60 y 70 min se encontró una reducción de los polifenoles totales del 10 al 30 %, a los 60

y 70 min de cocción, respectivamente y a los 15 min una pérdida del 100 %. Wolosiak y col. (2011) en guisantes y judías verdes aplicaron un tratamiento de cocción al vapor y encuentran una reducción del 16 y 33 %, en otro ensayo aplicaron un tratamiento de congelación a -18 °C con su posterior cocción al vapor y encontraron una disminución del 53 y 71 % de polifenoles totales, el tratamiento de congelación a -18 °C resultó perjudicial a los compuestos bioactivos. En este ensayo la temperatura de secado a 4 °C y el tratamiento en autoclave y baño maría favorecieron los polifenoles.

En la tabla 13, se presentan los tratamientos que incrementaron los polifenoles totales en *Lentinula edodes* en comparación con el hongo fresco, estos tratamientos representan una alternativa para aumentar la vida de anaquel del hongo *Lentinula edodes* y la conservación de polifenoles totales, el uso de un tratamiento u otro depende de la aplicación al que sea destinado, por ejemplo, los tratamientos de secado podrían ser aplicados para la conservación del hongo, el agua de ebullición, cocción en autoclave, baño maría y en aceite podrían tener una aplicación gastronómica debido a las características sensoriales adquiridas con el tratamiento.

Tabla 13. Polifenoles totales de los mejores tratamientos aplicados a *Lentinula edodes*.

Tratamiento	mg GAE/g muestra seca
HS100	17.7 ± 1.4* ^a
HS60	15.9 ± 1.8 ^b
HS35	15.0 ± 0.9 ^b
HS4A-2	13.0 ± 0.8 ^c
HES35-5	12.8 ± 0.7 ^c
HS4Ac-2	12.4 ± 1.3 ^{cd}

*Media ± desviación estándar. Letras diferentes hay diferencia significativa (P<0.05). n=6 y 3.

HS100: Hongo seco 100 °C

HS60: Hongo seco 60 °C

HS35: Hongo seco 35 °C

HS4A-2: Hongo seco 4 °C + autoclave por 30 min

HES35-5: Hongo ebullición en agua por 10 min en la relación 1:20 + secado 35 °C

HS4Ac-2: Hongo seco 4 °C + freído en aceite por 4 min

Para la realización de este trabajo se seleccionó el tratamiento HS4As-1 (hongo seco a 4 °C con su posterior asado por 2 min), que aunque no presentó una concentración de polifenoles totales igual al control, si presentó una actividad antioxidante aceptable, además el proceso de asado mejoró la aceptabilidad sensorial del hongo.

6.4.3 Relación entre la actividad antioxidante y polifenoles totales.

La correlación entre los antioxidantes y los polifenoles totales se determinó utilizando la correlación de Pearson del programa Excel de Microsoft office. En la tabla 14 se presentan los tratamientos donde se encontró una correlación fuerte. La correlación mostrada indica que al aumentar o disminuir la concentración de polifenoles totales disminuyen o aumentan los antioxidantes en las muestras de hongo tratadas.

Tabla 14. Correlación entre polifenoles totales y porcentaje de captura del radical DPPH en los hongos tratados.

Tratamiento	Correlación
HS60	0.99
HES60-2	0.96
HES60-6	0.97
HES100-4	1.00
HS35E-6	0.96
HS100E-3	0.91
HS100E-6	0.99

HS60: Hongo seco a 60 °C

HES60-2: Hongo con ebullición en agua por 10 min en la relación 1:10 con su posterior secado a 60 °C

HES60-6: Hongo con ebullición en agua por 30 min en la relación 1:20 con su posterior secado a 60 °C

HES100-4: Hongo con ebullición en agua por 5 min en la relación 1:20 con su posterior secado a 100 °C

HS35E-6: Hongo seco a 35 °C con ebullición en agua por 30 min en la relación 1:20

HS100E-3: Hongo seco a 100 °C con ebullición en agua por 30 min en la relación 1:10

HS100E-6: Hongo seco a 100 °C con ebullición en agua por 30 min en la relación 1:20

En los demás tratamientos no se encontró una correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales, esto se puede deber a que los polifenoles totales no siempre

contribuyen a la actividad antioxidante de las muestras, existiendo la posibilidad de formación de otros compuestos con propiedades antioxidantes. Es necesario realizar más estudios para determinar el efecto del tratamiento y la posible correlación entre los polifenoles totales y los antioxidantes en las muestras.

La variación entre el contenido de antioxidantes y polifenoles totales de las muestras de hongo tratadas térmicamente podría deberse a que varios compuestos fenólicos tienen diferentes respuestas antioxidantes basados en su número de OH y OCH₃ (Finnotti y Majo, 2003), la presencia de altas concentraciones de polifenoles totales no siempre representa una actividad antioxidante alta, depende de la estructura química de cada compuesto y su capacidad de captura de radicales libres.

Varios estudios, entre ellos los realizados por Navarro y col. (2011) indican que después de un daño en el tejido hay un incremento en la capacidad antioxidante. Reyes y col. (2007) reportaron que después de que una planta sufre un daño en el tejido, comienza la síntesis de fenoles, pero ésta síntesis resulta de un balance entre tal síntesis y el rango de utilización. En este ensayo, las células de las muestras tratadas térmicamente no son viables, por lo tanto, únicamente existe la salida de compuestos de sus compartimentos celulares por acción del calor. Otro factor importante es el grado de polimerización de las moléculas, moléculas monoméricas tienen diferentes capacidades antioxidantes en comparación con las poliméricas (Arnous y col., 2002).

La formación de nuevos compuestos (diferentes a los polifenoles) podría explicar la falta de correlación entre las muestras tratadas térmicamente. Un compuesto que puede contribuir a la actividad antioxidante final del hongo es la tioprolina. Unger y Demoss (1995) encontró tioprolina en el hongo *Lentinula edodes*. Jones (1999) reportó que la tioprolina es capaz de atrapar los nitritos en el cuerpo permitiendo que sean removidos en la orina funcionando como un compuesto antioxidante. Kurashima y col. (1990) no encontraron tioprolina en *Lentinula edodes* cuando está crudo, sin embargo, cuando es secado a altas temperaturas las concentraciones de tioprolina aumentaron de 134 a 406 µg/100 g de hongo seco. Suvachittanont y col. (1996) reportaron en semillas de *Parkia speciosa* un incremento significativo en las concentraciones de tioprolina cuando las semillas son calentadas en agua por 5 min en la relación 1:10, altas concentraciones de tioles en semillas de *Parkia speciosa* indicó la presencia de altas cantidades de cisteína, que aunado a altas concentraciones de formaldehído provocó un incremento en la concentración de tioprolina cuando las semillas fueron calentadas. El tratamiento de cocción y secado podría dar como resultado la

formación de de tioprolina en el hongo y contribuir a su actividad antioxidante.

6.4.4 Determinación de eritadenina en los hongos tratados.

A las muestras de hongo tratadas según la tabla 1 se les realizó la extracción y cuantificación de eritadenina por HPLC, utilizando como estándar eritadenina comercial, los resultados fueron expresados como mg de eritadenina/100 g hongo seco. En la figura 9 se presenta la curva de calibración de la eritadenina la cual fue utilizada para el cálculo de la concentración de eritadenina en cada muestra.

En la tabla 15 se presentan las concentraciones de eritadenina encontradas en los tratamientos evaluados en éste ensayo. En los hongos secos a 35, 60 y 100 °C (HS35, HS60 y HS100, respectivamente) utilizados como controles, se encontraron concentraciones de 30.50 ± 1.0 , 38.4 ± 2.1 y 39.2 ± 3.3 mg/100 g muestra seca, respectivamente, estos resultados no superan a los encontrados por Enman y col., (2007) quienes reportaron en *Lentinula edodes* seco concentraciones de 320 a 630 mg/100 g de muestra seca y en hongos con un pretratamiento enzimático reportaron concentraciones de 380 mg/100 g muestra seca, estas diferencias se pueden deber a la variedad de hongo utilizada y a las condiciones de siembra al que fue sometido.

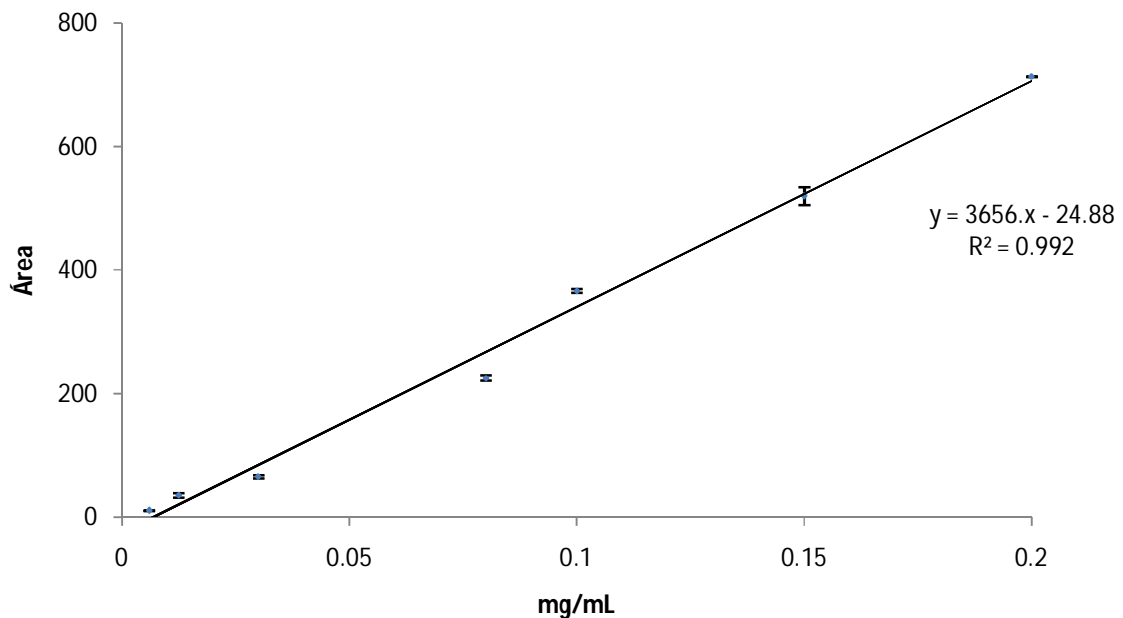


Figura 9. Curva de calibración para la eritadenina. n=3

Cuando los hongos fueron sometidos al secado a 60 °C con su posterior ebullición en agua (HS60E-1 al HS60-5) se encontró un incremento en la concentración de eritadenina conforme aumentó el tiempo de ebullición en agua. La máxima concentración encontrada en este tratamiento fue al tiempo 10 min y la relación 1:20 (HS60E-5) con 79.1 ± 0.3 mg /100 g muestra seca. El agua de ebullición utilizada en este tratamiento presentó una disminución del 100 y 90 % en comparación con el control.

Los hongos secos a 100 °C con su posterior ebullición en agua (HS100E-1 al HS100E-6), presentaron una reducción del 32 al 39 % en todos los tiempos evaluados en comparación con el control, el secado a 100 °C no fue favorable para aumentar la concentración de eritadenina en el hongo. En el agua de ebullición de este tratamiento se encontró una disminución del 80 % al 93 % en comparación con el control.

En los tratamientos HES35-2 (Hongos con ebullición en agua por 10 min en la relación 1:10 con su posterior secado a 35 °C), HES35-4 y HES35-6 (Hongos con ebullición en agua por 5 y 30 min en la relación 1:20 con su posterior secado a 35 °C) se encontró un incremento de eritadenina del 8, 55 y 58 %, respectivamente, en comparación con el control. La relación 1:20 de estos tratamientos fue la que favoreció el aumento de eritadenina en el hongo, quizás porque el hongo estuvo en mayor contacto con el agua, provocando la salida de eritadenina de los compartimentos celulares.

Se encontró una diferencia significativa en el tratamiento HES60-1 y HES60-4 (hongo tratado con ebullición en agua por 5 min en la relación 1:10 y 1:20 y posteriormente secado a 60 °C) con un incremento del 61 y 140 % de eritadenina, respectivamente. La relación hongo: agua que aumentó la concentración de eritadenina en estos tratamientos fue la 1:20.

Los tratamientos HES100-2, HES100-3 (hongos con ebullición en agua por 10 y 30 min en la relación 1:10 y posteriormente secados a 100 °C) y HES100-5 (hongos con ebullición en agua por 10 en la relación 1:20 y posteriormente secados a 100 °C) presentaron una diferencia significativa en comparación con el control, incrementando su concentración de eritadenina de un 25, 27 y 120 %, respectivamente, en comparación con el control.

Los hongos secos a 4 °C (HS4) presentaron 1.7 a 2.2 veces más la concentración de eritadenina que los hongos secados 100 y 60 °C, las temperaturas de secado bajas resultaron favorables para el aumento de la eritadenina en el hongo.

Tabla 15. Cuantificación de eritadenina de los tratamientos realizados al hongo *Lentinula edodes*.

Tratamiento	mg GAE/g muestra seca	Tratamiento	mg GAE/g muestra seca
Control HS60	38.4 ± 2.1* ^b		
HS60-E-1	21.0 ± 1.5 ^{d,B}	HS60-E-4	25.5 ± 2.0 ^{c,A}
HS60-E-2	27.1 ± 2.5 ^{c,B}	HS60-E-5	79.1 ± 0.3 ^{a,A}
AHS60-E-1	3.8 ± 0.2 ^{dA}	AHS60-E-4	2.3 ± 0.1 ^{c,B}
AHS60-E-2	6.6 ± 1.7 ^{c,A}	AHS60-E-5	0.0 ± 0 ^{d,B}
Control HS100	39.2 ± 3.3 ^a		
HS100-E-1	NA	HS100-E-4	25.8 ± 2.4 ^b
HS100-E-2	25.6 ± 1.2 ^{b,A}	HS100-E-5	23.6 ± 0.5 ^{b,A}
HS100-E-3	NA	HS100-E-6	26.5 ± 1.6 ^b
AHS100-E-1	NA	AHS100-E-4	2.5 ± 0.1 ^b
AHS100-E-2	4.3 ± 0.7 ^{b,A}	AHS100-E-5	2.7 ± 0.4 ^{b,A}
AHS100-E-3	NA	AHS100-E-6	2.5 ± 0.3 ^b
Control HS35	30.50 ± 1.0 ^c		
HES35-1	27.4 ± 1.4 ^{c,B}	HES35-4	47.5 ± 1.6 ^{ab,A}
HES35-2	33.2 ± 5.5 ^{a,A}	HES35-5	40.9 ± 2.0 ^{b,A}
HES35-3	23.3 ± 1.7 ^{c,B}	HES35-6	48.4 ± 4.1 ^{a,A}
HES60-1	49.4 ± 2.4 ^{a,B}	HES60-4	73.8 ± 2.9 ^{a,A}
HES60-2	40.1 ± 2.5 ^{b,B}	HES60-5	39.8 ± 5.4 ^{c,A}
HES60-3	22.0 ± 1.3 ^{d,B}	HES60-6	37.6 ± 3.2 ^{c,A}
HES100-1	21.7 ± 0.9 ^{d,B}	HES100-4	48.0 ± 0.6 ^{b,A}
HES100-2	38.2 ± 0.9 ^{a,B}	HES100-5	67.4 ± 5.9 ^{a,A}
HES100-3	38.8 ± 6.3 ^{a,A}	HES100-6	30.3 ± 0.9 ^{c,B}
Control HS4	68.7 ± 2.9 ^b		
HS4As-1	97.9 ± 5.3 ^a	HS4Ac-1	131.4 ± 12.0 ^a
HS4As-2	NA	HS4Ac-2	NA
HS4As-3	NA	HS4Ac-3	NA
HS4A-1	25.18 ± 1.5 ^c	HS4B-1	24.9 ± 0.5 ^d
HS4A-2	50.3 ± 0.06 ^b	HS4B-2	31.6 ± 1.0 ^c
		HS4B-3	43.1 ± 0.2 ^b

*Media ± desviación estándar. Letras diferentes hay diferencia significativa (P<0.05).
 Letras minúsculas: comparación entre columnas en una misma relación hongo: agua,
 letras mayúsculas: comparación entre filas de un mismo tratamiento de un mismo tratamiento.
 n=6 y 3.

HS60: Hongo seco a 60 °C

HS60E-1 al HS60E-2: Hongo seco a 60 °C con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min y la relación 1:10.

HS60E-4 al HS60E-5: Hongo seco a 60 °C con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min y la relación 1:20.

AHS60E-1 al AHS60E-5: agua de ebullición de los tratamientos HS60E-1 al HS60E-6

HS100: Hongo seco a 100 °C

HS100E-1 al HS100E-3: Hongo seco a 100 °C con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min y relación 1:10.

HS100E-4 al HS100E-6: Hongo seco a 100 °C con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min y relación 1:20.

AHS100E-1 al AHS100E-6: agua de ebullición de los tratamientos HS100E-1 al HS100E-6.

HES35-1 al HES35-3: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:10 con su posterior secado a 35 °C.

HES35-4 al HES35-6: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:20 con su posterior secado a 35 °C.

HES60-1 al HES60-3: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:10 con su posterior secado a 60 °C.

HES60-4 al HES60-6: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:20 con su posterior secado a 60 °C

HES6100-1 al HES100-3: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:10 con su posterior secado a 100 °C.

HES6100-4 al HES100-6: Hongo fresco con ebullición en agua por 5, 10 y 30 min en la relación 1:20 con su posterior secado a 100 °C.

HS4: Hongo seco a 4 °C.

HS4As-1 al HS4As-3: Hongo seco a 4 °C con su posterior asado por 2, 4 y 5 min.

HS4Ac-1 al HS4Ac-3: Hongo seco a 4 °C con su posterior freído en aceite por 2, 4 y 5 min.

HS4A-1 al HS4A-2: Hongo seco a 4 °C con su posterior cocción en autoclave por 10 y 30 min.

HS4B-1 al HS4B-3: Hongo seco a 4 °C con su posterior cocción en baño maría por 5, 10 y 30 min.

Cuando el hongo fue secado a 4 °C con su posterior asado por 2 min (HS4As-1) se encontró una diferencia significativa en la concentración de eritadenina con un valor de 97.9 ± 5 mg/100 g hongo seco), esto representa un aumento del 42 % en comparación con el control. Tal incremento podría deberse a la ruptura de las membranas celulares por acción del calor y la liberación de compuestos precursores de eritadenina, que al estar en contacto podrían reaccionar generando un incremento, un efecto similar es encontrado en el hongo seco a 4 °C con su posterior freído en aceite por 2 min (HS4-Ac-1) donde se encontró un incremento de 90 %. Azizah y col. (2009) y Murcia y col. (2009) reportaron las temperatura alcanzadas durante el proceso de freído en vegetales y hongos siendo de 170 °C. En el asado Barros y col. (2011) y Kim y col. (2011) reportaron temperaturas de 150, 200 y 250 °C, en este ensayo se encontró un incremento en la concentración de eritadenina a temperaturas superiores a 150 °C promoviendo la formación de eritadenina en el hongo *Lentinula edodes*.

La concentración de eritadenina en *Lentinula edodes* fue reportada por Saito y col. (1975) quienes analizaron extractos de hongos de *L. edodes*, *Agaricus bisporus*, *Lyophyllum aggregatum*, *Auricularia auriculajudae*, *Flammulina velutipes* y *Pholiota nameko* y encontraron únicamente eritadenina en *Lentinula edodes* con concentraciones de 50-70 mg/100 g muestra seca y 30-40 mg/100 g muestra seca en las tapas y tallos. En *Agaricus bisporus* encontraron concentraciones apenas detectables de 7 mg/kg de eritadenina. Los resultados encontrados en los hongos secos a 4 °C con su posterior asado y freído superan a los reportes encontrados por Saito y col. (1975).

Los hongos secos a 4 °C con su posterior cocción en autoclave (HS4A-1 y HS4-2) y los hongos secos a 4 °C con su posterior cocción en baño maría (HS4B-1 al HS4B-3), no incrementaron su concentración de eritadenina, se encontró una diferencia significativa, con valores inferiores al control en todos los tiempos evaluados. Esto se puede deber a que el daño generando a los hongos por acción del calor en los compartimentos celulares es menor y podría evitar la salida de precursores de eritadenina.

Varios estudios se han realizado para determinar el efecto de la eritadenina sobre la disminución del colesterol en ratas, entre ellos los realizados por Shimada y col. (2003) y Yamada y col. (2007), sin embargo, no existe ningún estudio que cuantifique la eritadenina en hongos con diversos tratamientos de cocción y secado.

La eritadenina ha sido reportada en el cuerpo fructífero y el micelio del hongo *Lentinula edodes*

(Enman, 2008), la razón por la que *Lentinula edodes* sintetiza este compuesto aun no está esclarecido. Según Chibata y col. (1969) la eritadenina es un alcaloide de una purina. Las plantas sintetizan metabolitos secundarios, entre ellos, alcaloides usados como defensa a un estrés generado, la mayoría de ellos alcalinos, con pH normales de la célula (7.2) y vacuolas (5 a 6), en general son solubles en agua (Taiz y Zeiger, 2006). La presencia de alcaloides en las células del hongo podría generar la formación de eritadenina ante una situación de estrés. Es necesario el desarrollo de investigaciones que puedan esclarecer el papel de la eritadenina en el hongo *Lentinula edodes* y su rol en la disminución del colesterol.

En la tabla 16 se presentan los tratamientos que obtuvieron mayor concentración de eritadenina con los tratamientos de cocción, encontrando que fueron los hongos secos a 4 °C con su posterior freído en aceite por 2 min (HS4Ac-1), seguido del hongo seco a 4 °C con su posterior asado por 2 min (HS4As-1).

Tabla 16. Eritadenina de los mejores tratamientos aplicados a *Lentinula edodes*

Tratamiento	mg /100 g hongo seco
HS4Ac-1	131.4 ± 12.0* ^a
HS4As-1	97.9 ± 5.3 ^b
HES60-4	73.8 ± 2.9 ^c
HS4	68.7 ± 2.9 ^c
HES100-5	67.4 ± 5.9 ^c

* Media ± desviación estándar. Letras diferentes hay diferencia significativa (P<0.05). n=2.

HS4Ac-1: Hongo seco a 4 °C con su posterior freído por 2 min

HS4As-1: Hongo seco a 4 °C con su posterior asado por 2 min

HS60E-4: Hongo seco 60 °C con su posterior ebullición en agua por 10 min en la relación 1:20

HS4: Hongo seco 4 °C

HES100-5: Hongo ebullición en agua por 10 min en la relación 1:20 con su posterior secado a 100 °C

En ensayos anteriores se seleccionó al tratamiento HS4As-1 (hongos secos a 4 °C con su posterior asado por 2 min) para el acondicionamiento del hongo *Lentinula edodes* para su integración en un alimento con potencial funcional, en este ensayo el tratamiento de asado incrementó la concentración de eritadenina en el hongo, por tal motivo se confirma la selección realizada anteriormente, debido a que este tratamiento es favorable para los antioxidantes, polifenoles totales

y eritadenina.

6.5 Determinación de las proporciones en que fueron integrados *Lentinula edodes* y *Lactobacillus* sp. en los alimentos.

Tomando como base los datos reportados por Kailasapathy y Chin (2000); Oshima (1974); Saito y col. (1975); Vitanyi y col. (1998) y los resultados encontrados en la evaluación de los lactobacilos con potencial probiótico; el establecimiento de los medios de crecimiento de *Lactobacillus* sp. A5 y el acondicionamiento del hongo para su integración en el alimento (puntos 6.2, 6.3 y 6.4, respectivamente) se determinaron las concentraciones en que fueron incorporados el hongo *Lentinula edodes* y *Lactobacillus* sp. A5 en los alimentos. En la tabla 17 se observan estos resultados.

Tabla 17. Concentración de *Lentinula edodes* y *Lactobacillus* sp. A5 agregadas a los alimentos.

	<i>Lentinula edodes</i>	<i>Lactobacillus</i> sp. A5
Acondicionamiento antes del agregado al alimento	Secado a 4 °C con su posterior asado por 2 min	Cepa inoculada en el medio M2a a 37 °C / 16 h de incubación con un inóculo inicial de 2×10^7 UFC/ml
Concentración de agregado al alimento (%)*.	20	4.5 y 9

*Datos calculados para 80 g o ml de alimento

De esta manera, las fórmulas alimenticias realizadas tuvieron 1.6×10^9 UFC/80 g o ml del alimento y 3.6 ó 7.2 % de hongo en 80 g o ml de alimento. En pruebas preliminares del alimento funcional se probaron diferentes concentraciones de bacterias a fin de seleccionar las más aceptables (ver tablas 2, 3 y 4).

Una vez determinadas las concentraciones de bacterias y hongo se elaboraron los alimentos con la integración de los mismos.

6.6 Formulación del alimento.

Las fórmulas alimenticias elaboradas según las tablas 2, 3 y 4 fueron evaluadas en tres etapas que se describen a continuación.

6.6.1 Primera evaluación sensorial de los alimentos.

Se elaboraron 67 formulaciones alimenticias 17 presentaciones de jugos, 9 de untables, 18 de quesos, 15 de aderezos y 8 de confitería, para su evaluación sensorial.

En la tabla 18 se muestran los resultados del análisis sensorial de las fórmulas alimenticias. No se encontró diferencia significativa en la mayoría de las fórmulas, debido a que el rango de gusto o disgusto entre los panelistas evaluadores fue amplio, sin embargo, el panel evaluador mostró preferencia del hacia los grupos de quesos, aderezos y confitería.

Las fórmulas con mayor aceptación por los panelistas para los jugos fueron la 5', 15' y 14', para quesos la 25', 19' y 31', para aderezos la 46', 36' y 43', para untables la 51', 54' y 57' y para confitería la 60', 61' y 64'. Los puntajes obtenidos entre las fórmulas con mayor aceptación son muy cercanos entre sí, pero pequeñas diferencias son las que determinan las preferencias individuales de productos semejantes y son determinantes para su aceptación o rechazo. Para un consumidor, los atributos organolépticos más importantes de los alimentos lo constituyen sus características organolépticas tales como el sabor, textura, aroma y color, estas son fundamentales para la inclinación hacia una u otra.

La necesidad de desarrollar nuevos productos que brinden opciones de alimentación a los diversos sectores de la población ha aumentado junto con la preocupación de la población por mejorar su alimentación. La aceptación de un alimento por los consumidores es el objetivo final de todo producto y por encima de sus características funcionales están las sensoriales. Son los consumidores, evaluadores no entrenados que emiten su juicio basados en sus sensaciones y percepciones. La prueba preferencia hedónica es una prueba que nos permite medir el agrado o desagrado de un producto, tiende a ser compleja debido a gustos diversos.

Tabla 18. Primera evaluación sensorial.

Grupo alimenticio	Jugos		Quesos		Aderezos		Untables		Confitería	
	Fórmula	Puntuación	Fórmula	Puntuación	Fórmula	Puntuación	Fórmula	Puntuación	Fórmula	Puntuación
	5´	8.4 ± 0.9* ^a	25´	9.6 ± 1.9 ^a	46´	9.2 ± 1.0 ^a	51´	8.7 ± 0.1 ^a	60´	9.0 ± 1.0 ^a
	15´	7.7 ± 1.5 ^{ab}	19´	9.3 ± 0.5 ^{ab}	36´	9.1 ± 0.5 ^{ab}	54´	8.7 ± 0.9 ^a	61´	8.3 ± 1.1 ^a
	14´	7.7 ± 2.8 ^{ab}	31´	9.2 ± 0.2 ^{ab}	43´	9.0 ± 0.6 ^{ab}	57´	8.2 ± 0.5 ^a	64´	8.0 ± 2.6 ^a
	4´	7.2 ± 1.5 ^{ab}	20´	9.0 ± 0.2 ^{abc}	38´	9.0 ± 0.8 ^{ab}	52´	8.0 ± 0.3 ^a	62´	7.6 ± 1.5 ^a
	3´	6.3 ± 0.9 ^{ab}	29´	8.6 ± 1.6 ^{abcd}	40´	9.0 ± 1.4 ^{ab}	55´	7.7 ± 0.4 ^{ab}	65´	7.3 ± 1.5 ^a
	6´	6.8 ± 0.5 ^{ab}	32´	8.4 ± 0.6 ^{abcd}	37´	8.6 ± 0.8 ^{abc}	58´	7.2 ± 0.7 ^{abc}	63´	7.3 ± 1.1 ^a
	17´	6.8 ± 1.3 ^{ab}	30´	8.1 ± 0.4 ^{bcde}	47´	8.6 ± 0.4 ^{abc}	59´	6.0 ± 1.2 ^{bc}	67´	7.0 ± 1.0 ^{ab}
	2´	6.6 ± 0.7 ^{abc}	35´	8.0 ± 1.0 ^{bcde}	49´	8.5 ± 0.9 ^{abc}	56´	5.5 ± 1.3 ^c	66´	4.0 ± 3.4 ^b
	9´	6.5 ± 1.0 ^{abc}	26´	7.7 ± 0.8 ^{cdef}	45´	8.4 ± 1.2 ^{abc}	53´	3.5 ± 0.5 ^d		
	12´	6.5 ± 1.2 ^{abc}	21´	7.6 ± 1.1 ^{cdef}	42´	8.3 ± 0.8 ^{abc}				
	16´	6.5 ± 1.8 ^{abc}	23´	7.6 ± 1.2 ^{cdef}	39´	8.2 ± 1.0 ^{bcd}				
	1´	6.1 ± 2.5 ^{abc}	34´	7.5 ± 1.1 ^{def}	41´	8.0 ± 0.7 ^{cde}				
	7´	5.8 ± 2.0 ^{abc}	22´	7.5 ± 0.4 ^{def}	48´	7.8 ± 1.4 ^{cde}				
	11´	5.5 ± 2.0 ^{bc}	28´	7.2 ± 0.4 ^{def}	44´	7.1 ± 0.9 ^{de}				
	8´	3.8 ± 3.4 ^{cd}	18´	7.2 ± 1.7 ^{def}	50´	6.8±2.3 ^e				
	13´	2.2 ± 2.5 ^d	27´	6.7 ± 0.6 ^{ef}						
	10´	2.2 ± 2.5 ^d	24´	6.5 ± 1.1 ^f						
			33´	6.4 ± 0.7 ^f						

*Media ± desviación estándar. Letras diferentes representan una diferencia significativa con un nivel de significancia p<0.05. n=6, letras minúsculas: comparación entre columnas. Composición de las fórmulas ver tabla 2.

Es importante mencionar las características sensoriales adquiridas por las fórmulas con el agregado de *Lactobacillus* sp. A5 y *Lentinula edodes*. En general, el agregado del hongo a los alimentos presentó notas descritas como un sabor umami, diferente al sabor dulce, salado, amargo o agrio y corresponde al sabor de las proteínas, encontrado en pescados, carnes, hongos, quesos y otros (Rolls, 2000). Los descriptores del sabor umami son un sabor fuerte, residual y especiado. Yamaguchi y Kimizuka (1979) describieron este sabor como de continuidad, plenitud en la boca, impacto, grosor, suavidad y amplitud. *Lactobacillus* sp. A5 junto con el medio de cultivo M2a le confirieron al alimento un sabor dulce, agradable, suave, fresco y no persistente en la boca.

Los jugos con el agregado del hongo y las bacterias presentaron un sabor residual amargo y astringente, debido a ello, los puntajes encontrados inferiores en comparación con los demás grupos alimenticios (2.2 ± 2.5 hasta 8.4 ± 0.9 puntos).

En las fórmulas de quesos, el sabor adquirido con el agregado del hongo fue especiado, con regusto prolongado y en combinación con algunos ingredientes como el picante o nuez fue mejorado. Las fórmulas presentaron mayor aceptabilidad con puntajes de 6.4 ± 0.7 hasta 9.6 ± 1.9 .

Los aderezos fueron mejorados con el sabor de las bacterias, dejando un sabor dulce. Los untables perdieron textura con el agregado de las bacterias y el medio de crecimiento. El sabor umami del hongo fue disminuido en los untables y la aceptación de los panelistas hacia este grupo de alimentos presentó puntuaciones de 6.8 ± 2.3 hasta 9.2 ± 1.0 .

Los dulces de confitería presentaron el sabor umami del hongo, el cual mezclado con el picante dejó un sabor persistente y agradable en la boca, el sabor de las bacterias fue percibido ligeramente. En este grupo de alimentos, la aceptación de la fórmula dependió del tipo de dulce elaborado, algunas fórmulas como la número 66´ no fueron aceptadas ampliamente presentando puntuaciones de 4.0 ± 3.4 , otras como la número la 60´ presentó una mayor aceptación con puntuaciones de 9.0 ± 1.0 .

La formulación de un nuevo alimento al cual se le ha agregado, eliminado o concentrado algún ingrediente o compuesto, lleva implícito encontrar las concentraciones, ingredientes y procesos óptimos, que sean representativos del agrado de los consumidores. En esta primera evaluación sensorial realizada a 67 fórmulas, se eliminaron aquellas con menor aceptabilidad y se consideraron aquellas que pudieran tener un potencial de aceptación por el perfeccionamiento de las técnicas de elaboración, selección de materias primas y ajuste de la dosis de hongo y las bacterias.

6.6.2 Segunda evaluación sensorial de los alimentos.

Se realizaron modificaciones a las fórmulas alimenticias seleccionadas en el ensayo anterior para su análisis sensorial y se incluyó la fórmula 68´ consistente en una natilla de leche. Se utilizó la prueba preferencial hedónica para evaluar los parámetros de sabor, textura, color, apariencia, olor y aceptabilidad general de las fórmulas.

Como se ha mencionado anteriormente, el desarrollo de nuevos productos implica el perfeccionamiento de las técnicas e ingredientes de elaboración, una fórmula con defectos sensoriales como colores no agradables y olores poco atractivos, podrían afectar en el juicio de un evaluador, obteniendo resultados no significativos. En esta segunda evaluación, se realizaron dos análisis estadísticos, el primero con la finalidad de evaluar la aceptabilidad de los panelistas hacia el sabor de las fórmulas y el segundo considerando todos los parámetros sensoriales evaluados (color, olor, sabor, textura y apariencia). De esta manera, se identificaron las características no deseadas del alimento y se modificaron.

En la tabla 19, se presenta el análisis estadístico realizado para el sabor. Los quesos fueron el grupo alimenticio más aceptado con las fórmulas 31´, 26´, 20´ y 33´, seguido de los aderezos (fórmulas 44´ y 45´) y confitería (fórmulas 63´, 65´ y 67´). Entre la población mexicana, los sabores fuertes y persistentes no son del agrado general de los consumidores, quienes se inclinan por los sabores dulces, ácidos y picosos, la adición del hongo a los alimentos generó un cambio en la percepción de las fórmulas por los panelistas. El sabor adquirido por el agregado del hongo se debe a sustancias como las sales de glutamato y ribonucleotidos (Yamaguchi y Ninomiya, 2000). El guanilato ha sido encontrado en el hongo *Lentinula edodes* seco y le proporciona el sabor umami (Nakajima y col., 1961). La aceptación de las formulaciones por la combinación de este sabor con otros ingredientes como frutas, quesos, crema y azúcar tiene relación con la naturaleza química de cada ingrediente, de esta manera, combinar sabores afines, generó sabores agradables al paladar, por ejemplo, la mezcla de sabores dulces con agrios dio como resultado un sabor refrescante, la mezcla de sabores salados con dulces dio como resultado sabores no agradables.

Tabla 19. Segunda evaluación del sabor.

Grupo alimenticio	Jugos		Quesos		Aderezos		Untables		Confitería	
	Fórmula	Puntuación	Fórmula	Puntuación	Fórmula	Puntuación	Fórmula	Puntuación	Fórmula	Puntuación
	14	7.7 ± 1.4 ^a	31	9.4 ± 0.8 ^a	44	9.3 ± 0.5 ^a	57	7.7 ± 1.3 ^a	63	9.4 ± 0.7 ^a
	4	7.2 ± 1.8 ^{ab}	26	9.0 ± 0.5 ^{ab}	45	9.0 ± 0.8 ^{ab}	51	7.1 ± 1.5 ^a	65	8.6 ± 1.8 ^a
	9	6.5 ± 1.0 ^{ab}	20	9.0 ± 1.5 ^{ab}	43	8.8 ± 0.8 ^{abc}	54	6.8 ± 1.2 ^a	67	8.6 ± 0.4 ^a
	3	6.3 ± 0.5 ^b	33	9.0 ± 1.1 ^{ab}	46	8.8 ± 0.4 ^{abc}			68	8.6 ± 0.4 ^a
			25	8.8 ± 1.5 ^{ab}	48	8.8 ± 1.0 ^{abc}			61	8.6 ± 1.0 ^a
			34	8.8 ± 0.4 ^{ab}	40	8.8 ± 0.8 ^{abc}			66	8.6 ± 0.5 ^a
			32	8.8 ± 1.0 ^{ab}	47	8.8 ± 1.2 ^{abc}			60	8.5 ± 1.2 ^a
			21	8.6 ± 1.9 ^{ab}	37	8.6 ± 0.5 ^{abcd}			64	8.3 ± 1.4 ^a
			30	8.5 ± 0.8 ^{abc}	36	8.6 ± 0.8 ^{abcd}				
			19	8.4 ± 0.5 ^{abc}	49	8.4 ± 0.8 ^{abcde}				
			29	8.4 ± 1.1 ^{abc}	38	8.1 ± 0.8 ^{bcde}				
			28	8.0 ± 1.8 ^{bc}	41	8.0 ± 0.6 ^{cde}				
			18	8.0 ± 1.2 ^{bc}	42	7.8 ± 0.4 ^{de}				
			23	8.0 ± 1.3 ^{bc}	39	7.6 ± 1.5 ^e				
			35	7.3 ± 1.0 ^c						

*Media ± desviación estándar Letras diferentes representan una diferencia significativa a un nivel de significancia p<0.05. n=6, letras minúsculas: comparación entre columnas. Composición de las fórmulas ver tabla 3.

En la tabla 19 se observa que los jugos no fueron aceptados por los panelistas, registrando puntuaciones inferiores a los demás grupos alimenticios, esto se pudo deber que la mezcla de ingredientes del alimento con el hongo no fueron afines. Uno de los compuestos que pudo determinar su aceptabilidad por la compatibilidad de los ingredientes pudiera ser el ácido glutámico (el cual le brinda el sabor umami). En frutas como la manzana, uva y kiwi se han reportado concentraciones de 4, 5.1 y 5 mg de ác. glutámico /100 g, respectivamente y en el hongo *Lentinula edodes* seco se ha reportado 71 mg/100 g de ácido glutámico libre (Yamaguchi y Ninomiya, 2000). La incorporación del hongo *Lentinula edodes* a los jugos con menor concentración de ácido glutámico no resultó favorable para la aceptabilidad del sabor, quizás por la concentración de sustancias que favorecen el sabor umami y que en este caso proporcionaron el sabor principal del alimento. El mismo caso se presentó con los untables, por ejemplo, las fórmulas elaboradas con aguacate tienen valores de 18 mg/100 g de ácido glutámico libre.

En los quesos y aderezos, se han reportado valores altos de ácido glutámico. Yamaguchi y Ninomiya (2000) reportaron en el queso cheddar y el parmesano concentraciones de 182 y 1680 mg/100 g de ácido glutámico libre, respectivamente. Una mayor concentración de éste compuesto en los alimentos representó mayor aceptabilidad de las fórmulas por los consumidores. Kuninaka (1960) describió la sinergia entre el gusto por el glutamato y los nucleótidos, es decir, cuando el glutamato y los ribonucleotidos se mezclan, la intensidad del sabor umami es mejorada ampliamente.

En todas las fórmulas de confitería evaluadas, el sabor del hongo confiere armonía entre los sabores dulce, picante, ácido y umami, siendo aceptadas.

En los test de evaluación sensorial, se solicitó a los panelistas comentarios generales sobre la fórmula probada, los comentarios sobre el sabor impartido por el hongo en las fórmulas fueron un sabor a ajo, cominos y guajes. Yamaguchi y Kimizuka (1979) describieron que el umbral de detección del sabor umami es lo suficientemente bajo para usarse como condimento y paladares poco acostumbrados a este tipo de sabores los relacionan con alimentos condimentados. El sabor de las bacterias y el medio de cultivo en los alimentos fue descrito como dulce.

Tsai y col. (2009) reportaron 8 compuestos volátiles y dos compuestos aromáticos que brindan el aroma típicos de los hongos *C. máxima*, *P. ferulae* y *P. ostreatus*, también reportaron azúcares

solubles como el arabitol, fructosa y glucosa que proporcionan el sabor dulce; el sabor agradable lo confieren aminoácidos entre ellos alanina y arginina.

En el segundo análisis estadístico se consideró los atributos del alimento de olor, color, apariencia, sabor y aceptabilidad general, en la tabla 20 se presentan estos resultados, donde se encontró que las fórmulas de jugos y untables obtuvieron puntuaciones inferiores a 80 puntos, los quesos, aderezos y dulces de confitería presentaron puntuaciones superiores a 80 puntos.

Se observó que las fórmulas evaluadas estuvieron relacionadas unas con otras, por ejemplo, en el análisis de sabor no se encontró diferencia significativa entre las fórmulas 31´ y 32´ y a su vez no se encontró diferencia significativa con la fórmula 23´, sin embargo, ésta última si presentó diferencia significativa con la fórmula 20´. Ésta relación encontrada entre las fórmulas se debe a la amplia variabilidad de gustos del panel evaluador.

A través del análisis de resultados de la aceptabilidad del sabor y atributos generales se encontró a las fórmulas: 31´, 26´, 20´, 33´, 32´ y 25´ para el grupo alimenticio de quesos, 44´, 45´, 47´ y 48´ para los aderezos y 63´, 65´, 67´, 60´ y 61´ presentaron mayor aceptación por los evaluadores.

Considerando que los alimentos funcionales son alimentos que brindar un efecto benéfico en la salud, más allá de los nutrientes que contiene, se descartaron aquellas fórmulas que se contrapongan al concepto de buena salud. A cada fórmula se le asignó un puntaje de acuerdo a los criterios establecidos a continuación y que cumplieron las características necesarias para la elaboración y consumo de los alimentos funcionales, el primer atributo fue el proceso de elaboración del alimento; debido a que el alimento contiene bacterias probióticas y una característica de ellas es su viabilidad y concentración para ejercer su efecto benéfico y la elaboración del alimento con procesos térmicos podría afectar la viabilidad de las bacterias, el segundo criterio fue el tipo de ingredientes utilizados en la fórmula; los alimentos funcionales no deben de contradecir su concepto de funcionalidad, esto es, no deben de contener ingredientes que por su naturaleza puedan afectar a la salud del consumidor, como altos contenidos de grasas o azúcares, el tercer atributo fue la frecuencia de consumo del alimento; considerando que los alimentos funcionales deben consumirse con regularidad para observar un efecto benéfico en el consumidor, en este trabajo se realizó un aproximado de la frecuencia de consumo de la población mexicana de cada formulación y el cuarto atributo fue el costo aproximado de elaboración del alimento; debido a que fórmulas alimenticias económicas podrían ser consumidas por varios sectores socio-económicos de la población, para

Tabla 20. Segunda evaluación de todos los atributos sensoriales.

Grupo alimenticio		Quesos		Aderezos		Untables		Confitería	
Fórmula	Puntuación	Fórmula	Puntuación	Fórmula	Puntuación	Fórmula	Puntuación	Fórmula	Puntuación
9´	7.4 ± 0.7 ^a	20´	8.7 ± 0.9 ^a	47´	8.9 ± 0.4 ^a	57´	7.8 ± 0.4 ^a	63´	9.2 ± 0.8 ^a
14´	7.3 ± 1.0 ^a	33´	8.7 ± 0.6 ^{ab}	44´	8.9 ± 0.2 ^a	51´	7.2 ± 0.8 ^a	60´	9.1 ± 0.6 ^a
4´	7.2 ± 1.0 ^a	26´	8.7 ± 0.4 ^{ab}	48´	8.7 ± 1.0 ^{ab}	54´	7.1 ± 1.0 ^a	61´	9.0 ± 0.4 ^a
3´	6.9 ± 0.8 ^a	32´	8.6 ± 0.7 ^{abc}	40´	8.6 ± 0.4 ^{abc}			65´	9.0 ± 1.0 ^a
		25´	8.6 ± 0.7 ^{ab}	36´	8.5 ± 0.5 ^{abcd}			64´	8.7 ± 0.9 ^{ab}
		31´	8.4 ± 0.6 ^{abcd}	46´	8.5 ± 0.5 ^{abcd}			66´	8.2 ± 0.4 ^b
		34´	8.4 ± 0.2 ^{abcd}	43´	8.5 ± 0.4 ^{abcd}			68´	8.1 ± 0.4 ^b
		29´	8.3 ± 0.3 ^{abcd}	37´	8.4 ± 0.3 ^{abcd}			67´	8.1 ± 0.4 ^b
		21´	8.2 ± 1.0 ^{abcd}	45´	8.4 ± 0.5 ^{abcd}				
		18´	8.1 ± 0.4 ^{abcd}	38´	8.3 ± 0.5 ^{abcd}				
		19´	8.1 ± 0.5 ^{abcd}	39´	8.1 ± 0.4 ^{bcd}				
		30´	8.0 ± 0.4 ^{abcd}	49´	7.9 ± 0.7 ^{cd}				
		28´	7.9 ± 0.9 ^{bcd}	41´	7.9 ± 0.6 ^d				
		23´	7.9 ± 0.4 ^{cd}	42´	7.9 ± 0.3 ^d				
		35´	7.8 ± 0.4 ^d						

*Media ± desviación estándar Letras diferentes representan una diferencia significativa a un nivel de significancia p<0.05. n=6, letras minúsculas: comparación entre columnas. Composición de las fórmulas ver tabla 3.

ello se realizó un estimado del costo de producción de las fórmulas evaluadas y se dio preferencia a las fórmulas cuyo costo fue bajo. Los puntos asignados a cada criterio de selección se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Puntaje de los criterios de selección de las fórmulas alimenticias.

Criterio de selección	Puntaje
Proceso de elaboración	
No requiere calor	10
Requiere calor pero se puede adaptar el proceso	8
Forzosamente requiere calor	5
Ingredientes	
No afectan	10
Alto contenido en grasas	7
Alto contenido en azúcares	7
Se puede sustituir el ingrediente	8
Costo	
Bajo	10
Medio	8
Elevado	5
Frecuencia de consumo	
3 veces por semana	9
2 veces por semana	8
1 vez por semana	7

En la tabla 22 se presentan las fórmulas que obtuvieron un alto puntaje, tanto del análisis estadístico de sabor y atributos generales como de los criterios de selección; entre ellas se encontró a las fórmulas 31', 32' y 33' para los quesos así como la 65' para confitería. No es objetivo de éste trabajo discriminar aquellas fórmulas que pudieran tener un potencial de aceptación, al contrario, un número mayor de formulaciones podría generar más opciones de alimentos con potencial benéfico en la salud y para diversos sectores de la población, sin embargo, se deben de seleccionar las más

representativas para los ensayos que confirmen su potencial funcional.

Tabla 22. Fórmulas alimenticias con mayor aceptación.

Fórmula	Puntuación
31´	9.2 ± 0.3* ^a
32´	9.1 ± 0.8 ^{ab}
33´	9.0 ± 0.8 ^{abc}
65´	8.9 ± 0.4 ^{abc}

*Media ± desviación estándar. Letras diferentes representan una diferencia significativa a un nivel de significancia $p < 0.05$. $n = 6$

No se encontró diferencia significativa entre las fórmulas 31´, 32´ y 33´ de los quesos, sin embargo, se realizó la selección de la fórmula 31´, debido a que los ingredientes de elaboración de éstas son muy parecidos entre sí y las diferencias entre una y otra son representativas de la fórmula 31´. La fórmula 65´ correspondiente a un dulce de confitería también fue seleccionada para su ajuste sensorial.

Otras razones de selección de la fórmula 31´ fue que no existe en el mercado queso elaborado con *Lentinula edodes*, el consumo frecuente entre la población mexicana del queso involucra diferentes estratos sociales y gran diversidad de edades, además de que los sabores característicos del queso fresco son bien aceptados por la población; otra razón es que los consumidores podrían obtener mayores beneficios al consumir un alimento rico en proteínas y micronutrientes y la variedad de combinaciones o mezclas que se podría realizarse para acompañar el queso.

La fórmula 65´ fue seleccionada (además de ser aceptada por el panel evaluador) porque que no existe en el mercado mexicano confitería alguna que brinde efectos benéficos a la salud relacionados con las bacterias probióticas y *Lentinula edodes*; ligado a esto está la falsa idea de que los dulces son dañinos para los niños y la introducción de un producto con propiedades benéficas podría cambiar éste paradigma siempre y cuando se haga consciencia de una dieta saludable, aunado a esto, el consumo de dulces es frecuente entre niños y podría ampliar su consumo hacia personas adultas, además de ser un producto con mayor resistencia al deterioro.

Las fórmulas 31´ y 65´ fueron ajustadas sensorialmente y evaluadas en una tercera etapa que se describe a continuación.

6.6.3 Tercera evaluación sensorial de los alimentos.

El desarrollo de un producto involucra varias etapas, entre ellas, un primer juicio con jueces expertos (1 a 2 personas), un segundo juicio con grupo de laboratoristas (6 a 10 personas) y un tercer juicio con consumidores no entrenados (más de 50 personas) (Gatchalian, 1989). En este estudio, se realizaron dos evaluaciones sensoriales a fin de optimizar el proceso de elaboración y los ingredientes que integran las fórmulas alimenticias, en ésta tercera evaluación se realizó un ajuste y análisis sensorial de las fórmulas 31´ y 65´ correspondientes a un queso fresco y a un dulce de chamoy, respectivamente.

En la tabla 23 se presentan los resultados del análisis sensorial realizado, donde se encontró diferencia significativa entre las fórmulas evaluadas con los atributos de olor, apariencia, color, sabor y textura, la fórmula 65´ fue más aceptada por los consumidores.

Tabla 23. Tercera evaluación sensorial.

Fórmula	Atributo				
	Olor	Apariencia	Color	Sabor	Textura
(31´) Queso	8.1 ± 1.0* ^b	8.3 ± 0.9 ^b	8.3 ± 1.0 ^b	7.6 ± 1.1 ^b	8.4 ± 0.9 ^b
(65´) Chamoy	9.0 ± 0.6 ^a	8.8 ± 0.7 ^a	9.0 ± 0.5 ^a	8.6 ± 1.0 ^a	8.8 ± 0.8 ^a

*Media ± desviación estándar. Letras diferentes representan una diferencia significativa a un nivel de significancia $p < 0.05$. Letras minúsculas comparación entre filas. $n=67$,

Las propiedades funcionales juegan un rol importante en el alimento durante la preparación, procesamiento y almacenamiento, afectando sus características sensoriales (Kaur y Singh, 2007), las cuales podrían repercutir en el juicio de los evaluadores, aunado esto factores como la edad, estado psicológico, género y genética pueden ser determinantes ante la evaluación de un alimento. Un ejemplo son las diferencias relacionadas con el género, las mujeres son más sensitivas que los hombres, éstas tienen más desarrolladas las habilidades de lenguaje que podría ayudarles a comunicar lo que perciben, sin embargo, las mediciones y juicios realizados por mujeres han

mostrado tener más inconsistencia, esto puede estar relacionado al embarazo o ciclos menstruales (Sauvageot, 1982).

El objetivo de realizar una prueba hedónica es conocer el agrado o desagrado de un alimento basados en el criterio de los consumidores, cuyas preferencias podrían ser representativas de una población mayor, las diferencias encontradas en la evaluación entre hombres y mujeres de diferentes estados sociales, físicos y psicológicos son la clave para reunir información representativa.

Las fórmulas 31´ y 65´ presentaron aceptabilidad por los consumidores y fueron las seleccionadas en esta etapa. A continuación se presentan los parámetros medidos en ambas fórmulas alimenticias que confirmaron su potencial funcional.

6.7 Evaluación del potencial funcional los alimentos.

Para que un alimento sea considerado con potencial funcional, este debe de tener el (los) compuesto (s) cuya presencia le brindan el nombre de funcional. A los alimentos seleccionados en el análisis sensorial anterior (fórmulas 31´ y 65´) se les evaluó la viabilidad de la cepa probiótica, el antagonismo contra bacterias patógenas; así como la determinación de su actividad antioxidante, polifenoles totales y eritadenina. Ensayos descritos a continuación.

6.7.1 Antagonismo de los alimentos contra bacterias patógenas.

En este ensayo se determinó el antagonismo de las fórmulas 31´ y 65´ (queso y chamoy, respectivamente) contra las bacterias indicadoras *E. coli*, *S. aureus* y *S. typhimurium*. Como controles fueron utilizados el queso y chamoy con el agregado de *Lactobacillus* sp. A5 (QB y CB, respectivamente), el queso y chamoy con el agregado de *Lentinula edodes* (QH y CH, respectivamente) y un queso fresco y chamoy sin hongo ni bacterias (Q y C, respectivamente).

En la tabla 24 se muestra la inhibición del crecimiento para las cepas indicadoras. Se encontró que las dos fórmulas evaluadas (31´ y 65´) inhibieron el crecimiento de las cepas patógenas, con halos de inhibición desde 0.5 hasta 1.4 cm, por lo que sí contienen compuestos con actividad antimicrobiana y pueden ser catalogados con potencial funcional.

Tabla 24. Antagonismo de las fórmulas 31´ y 65´ contra bacterias patógenas.

Alimento / bacteria	Inhibición (cm)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S typhimurium</i>
Queso			
Fórmula 31´	0.7 ± 0.1* a,B	1.2 ± 0.2 ^{ab,A}	0.5 ± 0.1 ^{a,B}
QB	0.8 ± 0* a,B	1.1 ± 0.1 ^{b,A}	-
QH	-	1.4 ± 0.1 ^{a,A}	-
Q	-	0.6 ± 0.1 ^{c,B}	-
Fórmula 65´			
CHB	1.4 ± 0.2 ^{a,A}	1.3 ± 0.1 ^{a,A}	1.1 ± 0.3 ^{a,A}
CB	1.0 ± 0.0 ^{b,A}	1.0 ± 0.1 ^{b,A}	-
CH	-	0.7 ± 0.1 ^{c,B}	-
C	-	0.9 ± 0.1 ^{b,A}	-

*Media ± desviación estándar. Letras diferentes hay diferencia significativa (P<0.05).

Letras minúsculas: comparación entre columnas de un mismo alimento. Letras mayúsculas:

comparación entre columnas entre los dos alimentos. n=3. (-) = Ausencia de inhibición.

Fórmula 31´ y 65´: Queso y chamoy con hongo y bacterias, respectivamente

QB y CB: Queso y chamoy con bacterias, respectivamente

QH y CH: Queso y chamoy con hongo, respectivamente

Q y C: Queso y chamoy, respectivamente

La fórmula 31´ presentó una diferencia significativa entre la inhibición de *E. coli*, *S. aureus* y *S. typhimurium* con halos de inhibición superiores en la cepa de *S. aureus* (1.2 ± 0.2). En la fórmula 65´ no se encontró diferencia significativa entre la inhibición de las cepas patógenas.

En el ensayo de evaluación de cepas con potencial probiótico (Punto 6.2.1) la cepa de *Lactobacillus* sp. A5 no presentó inhibición para *S. typhimurium*, las fórmulas evaluadas en este ensayo sí inhibieron a esta cepa, esto se podría deber a que el medio de crecimiento M2a podría estar estimulando la producción de bacteriocinas y compuestos antimicrobianos por las bacterias ácido lácticas y a la interacción entre los ingredientes del alimento, bacterias y hongo que favorecieron la acción de compuestos antagónicos para inhibir a *S. typhimurium*.

Los alimentos elaborados únicamente con las bacterias lácticas (QB y CB, respectivamente) sí inhibieron el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* con halos de inhibición desde 0.8 hasta 1.1 cm. La integración de *Lactobacillus* sp. A5 en los alimentos se realizó junto con su medio de crecimiento (M2a), este podría contener sustancias extracelulares como bacteriocinas y ácidos orgánicos que pudieran dar el efecto antagónico. Según Yamato y col. (2003) y Zhang y col. (2010) las bacteriocinas y los ácidos orgánicos exhiben actividad bactericida contra algunos microorganismos.

Sin embargo cuando se prepararon los alimentos únicamente con hongo (QH y CH) y sin hongo y sin bacterias (Q y C) no se encontró inhibición del crecimiento para *E. coli* y *S. typhimurium*. Hearst y col. (2009) reportaron la actividad antimicrobiana del hongo *Lentinula edodes* contra varias cepas de *E. coli*, en éste ensayo no se encontró efecto por el agregado del hongo, esto podría deberse a la resistencia de la cepa hacia los compuestos antimicrobianos propios de *Lentinula edodes* y a la interacción entre los compuestos con el alimento.

S. aureus sí fue inhibida por estos alimentos (QH, CH, Q y C) con halos de inhibición desde 0.6 ± 0.1 hasta 1.4 ± 0.1 cm. Los diferentes grados de inhibición de un mismo alimento se podría deber a las características específicas de cada cepa, tales como la composición de su pared celular, los receptores de membrana y la producción de sustancias que resultan determinantes para su supervivencia. Algunos mecanismos de resistencia de *S. aureus* se deben a la formación de biofilms, adherencia y a la producción de enzimas hidrolíticas sintetizadas en circunstancias específicas (Salyers y Whitt, 2002). Wasser (2005) reportó que el hongo *Lentinula edodes* contiene lentinan, un compuesto que inhibe el crecimiento de *S. aureus* y otras bacterias.

No se encontró inhibición del crecimiento de *S. typhimurium* en los alimentos elaborados únicamente con bacterias (QB y CB) con hongo (QH y CH) y sin hongo y sin bacterias (Q y C), esto podría deberse a la capacidad de *S. typhimurium* de resistir a factores adversos para su crecimiento. Según Salyers y Whitt (2002) la resistencia de *S. typhimurium* se debe a la capacidad de adherencia, tolerancia a ácidos y expresión de genes para su sobrevivencia.

Tanto el queso como el chamoy pueden tener potencial antagónico por los constituyentes que los integran. Según Desmasure y col. (1997) la leche cruda comúnmente usada en la elaboración del queso incluye bacterias ácido lácticas entre ellas *Lactococcus*, *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Micrococcaceae* spp. y levaduras, sin embargo, la elaboración del queso implicó el calentamiento de la leche que reduce la carga microbiana donde se encuentran bacterias con

posible efecto antagónico como *Lactobacillus* spp. El proceso de elaboración del chamoy no involucra altas temperaturas que pudieran dañar los compuestos bioactivos, quizás por esta razón se encontró diferencia significativa en el antagonismo del chamoy en comparación con el queso, además de que el chamoy contiene chile, que pudiera tener efecto antimicrobiano. La composición química de cada alimento (Queso o chamoy) podrían influenciar en la biodisponibilidad de los compuestos con actividad antimicrobiana, aumentando, inhibiendo, potencializando o neutralizando su función.

Zhang y col. (2010) reportaron que la producción de bacteriocinas está regulada por condiciones óptimas de pH y temperatura, ellos ajustaron el sobrenadante de varias cepas de *Lactobacillus* spp. a pH de 6.5 encontrando la ausencia de antagonismo, no así para el sobrenadante sin ajustar, un cambio de pH en las bacteriocinas podría afectar la estructura y funcionalidad de las mismas. En este ensayo el medio de crecimiento de las bacterias (M2a) presentó al final de la fermentación un pH de 3.5. Cuando las bacterias y el hongo fueron incorporados al queso, se encontró un pH de 5.5, en el chamoy (con bacterias y hongo) no presentó cambio de pH, estos cambios en la acidez de los alimentos pudieron afectar la inhibición de las cepas.

La fórmula 31´ incrementó su actividad antagónica contra las bacterias *E. coli*, *S. aureus* y *S. typhimurium* un 12, 50 y 100 %, en comparación con los alimentos preparados con/sin hongo y bacterias. La fórmula 65´ incrementó su actividad antagónica para las mismas cepas un 28, 46 y 100 %, respectivamente. Tanto en *Lentinula edodes* como en *Lactobacillus* spp. se han reportado actividades antagónicas y antibacterianas (Hobbs, 2000; Wasser y Weis, 1999; Turkoglu y col., 2007; Yamato y col., 2003; Zhang y col., 2010; Makras y col., 2006; Krishna y Banerjee, 1999) su incorporación en una matriz alimenticia donde están en contacto con múltiples compuestos resultó en el incremento de la actividad antagónica.

Algunos reportes de alimentos con actividad antimicrobiana son los reportados por Sánchez y col. (2008) en alimentos fermentados (ben salga) con *Lactobacillus plantarum*, ellos encontraron inhibición del crecimiento de *E. coli* O157:H7. Krishna y col. (1999) reportaron en chile *Capsicum annum* un efecto antimicrobiano contra *E. coli* ATCC 10536. Olaoye y col. (2011) reportaron una relación directa entre las bacterias ácido lácticas y la disminución de la carga microbiana en alimentos. Las bacterias de *Lactobacillus* sp. A5 pueden brindar a las fórmulas una forma sencilla de conservación y aumentar su vida de anaquel.

Las infecciones causadas por el consumo de alimentos contaminados son frecuentes en la población, una estrategia para combatir patógenos es el desarrollo de nuevos alimentos funcionales con propiedades antagonicas. Bacterias como *Salmonella* spp., *E. coli* (Bean y Griffin, 1990) y *S. aureus* son importantes patógenos en los alimentos que afectan la salud pública (Oliver y col., 2009). La aplicación de bacterias ácido lácticas o sus compuestos antimicrobianos en los alimentos previene su contaminación (Sánchez y col., 2008). El queso contienen altas concentraciones de proteínas, carbohidratos y grasas que lo hace susceptible a ataques microbianos durante su elaboración y almacenamiento, bacterias como *Stafilococcus*, *E. coli*, *Salmonella* sp., *Listeria* sp. y *S. aureus* pueden multiplicarse rápidamente en productos lácteos (Arizcun y col., 1997; Tornadijo y col., 2001). Las bacterias ácido lácticas pueden ayudar a mantener la calidad higiénica de los productos y salud de los hospederos (Arihara y col., 1996). Las fórmulas elaboradas en este trabajo (31´ y 65´) contienen compuestos que inhiben el crecimiento de algunos patógenos que contaminan con frecuencia los alimentos y causan enfermedades en la población por lo que pueden ser consideradas como alimentos con potencial funcional.

6.7.2 Viabilidad de *Lactobacillus* sp. en los alimentos.

Los probióticos son microorganismos vivos, al integrarlos en una preparación o alimento se debe garantizar que permanezcan viables y en la dosis adecuada, en este ensayo se determinó la sobrevivencia de la cepa de *Lactobacillus* sp. A5 en las fórmulas alimenticias 31´ y 65´ (queso y chamoy, respectivamente) hasta los 14 días de almacenamiento.

En la figura 10 se muestra el crecimiento de la cepa probiótica, donde se encontró que las bacterias de ambas fórmulas sobrevivieron al tiempo de almacenamiento, la fórmula 31´ (correspondiente al queso fresco), aumentó su población un 23 % a los 14 días de almacenamiento, en comparación con el inóculo inicial (1.7×10^9 UFC/80 g). La fórmula 65´ incrementó sus células un 5 % con respecto al inóculo inicial (1.8×10^9 UFC/80 g), estas fórmulas pueden ser consideradas como alimentos con potencial funcional.

A partir del segundo día de almacenamiento y hasta el decimo día, se encontró una diferencia significativa en el crecimiento de *Lactobacillus* sp. A5 en las fórmulas evaluadas (análisis no mostrado) con cuentas celulares mayores en el queso. La capacidad de crecimiento de la cepa en temperaturas de 4 °C muestra la adaptación de las células a la matriz alimenticia. Saarela y col. (2006) reportaron que la fibra puede proteger a las células probióticas durante su almacenamiento a

4 °C. Se ha reportado que el hongo *Lentinula edodes* es buena fuente de fibra (Longvah y Deosthale, 1998).

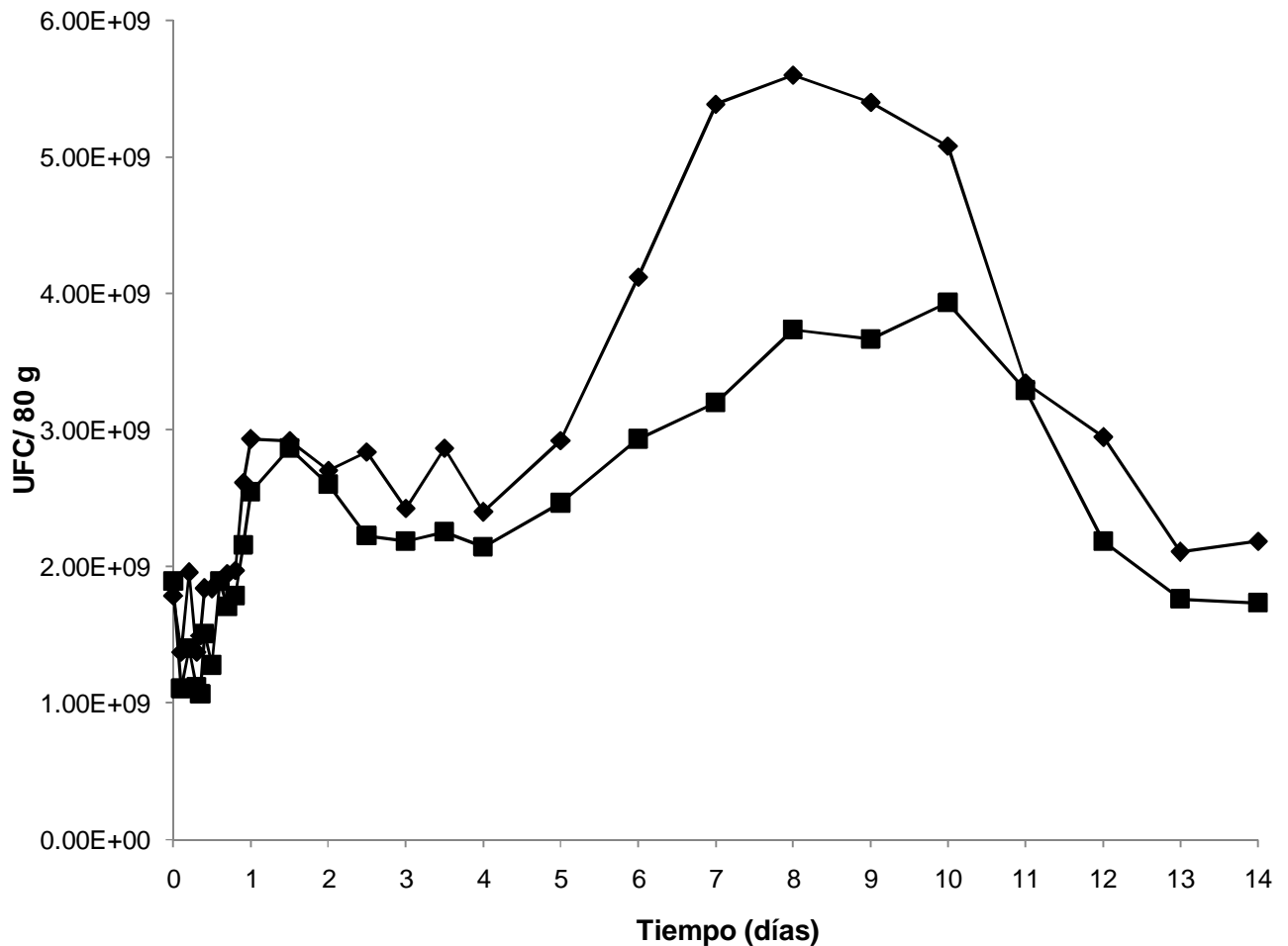


Figura 10. Viabilidad de la cepa A5 en las fórmulas 31' y 65'. (—◆— fórmula 31') queso y (—■— fórmula 65') chamoy. n=3. UFC/ 80 g de alimento.

La diferencia en la sobrevivencia de *Lactobacillus* sp. A5 en las fórmulas evaluadas se debe a los nutrientes suministrados por los alimentos a las bacterias. *Lactobacillus* spp. requiere medios complejos de crecimiento que incluye aminoácidos (Hebert y col., 2000), minerales y vitaminas. Según Fox (1993) el queso es buena fuente de aminoácidos, proteínas, calcio, magnesio y fósforo. Las bacterias ácido lácticas producen proteasas, las cuales pueden degradar los aminoácidos

presentes en el queso (Yvon y col., 1993). El chamoy ésta elaborado principalmente con sacarosa, ácido cítrico y chiles en polvo, su contenido en aminoácidos es inferior al del queso y quizás por esta razón se encontró diferencia significativa en el crecimiento de la cepa, además el pH de la fórmula 65´ fue de 3.5 y podría inhibir el crecimiento de las bacterias lácticas.

Según Morishita y col. (1981) *Lactobacillus* spp. no es capaz de sintetizar múltiples aminoácidos, debido a mutaciones en la RNA polimerasa; una de las vías de síntesis frecuentemente bloqueadas para la síntesis de aminoácidos es la del glutamato. *Lentinula edodes* contiene 71 mg/100 g de ácido glutámico libre (Yamaguchi y Nimomiya, 2000) que podría suministrar a la cepa de *Lactobacillus* sp. A5 una fuente de aminoácidos, brindando un efecto sinérgico que mejora el crecimiento de la cepa probiótica.

La temperatura a la cual se encuentran sometidas las bacterias no es la temperatura óptima de crecimiento, sin embargo, se encontró un incremento en sus cuentas celulares, lo cual indica la capacidad de adaptación de las bacterias ácido lácticas.

Diferentes alimentos han sido elaborados para hacer llegar bacterias probióticas al organismo, entre ellos se encuentran leches fermentadas, bebidas de frutas, barras de cereal, suplementos y fórmulas infantiles (Dommels y col., 2009). La industria de los alimentos funcionales está enfocada a nuevos productos no lácteos que contribuyan a regular el consumo de probióticos en individuos intolerantes a la lactosa (Lavermicocca y col., 2005). El chamoy elaborado en este trabajo representa una alternativa para los consumidores de bacterias ácido lácticas. Otros productos no lácteos que han sido utilizados como matriz para la incorporación de *Lactobacillus* spp. son las aceitunas en salmuera (Fernández y col., 1993), col (Dedicatoria y col., 1981), pepinillos salados (McDonald y col., 1993), vegetales fermentados y la bebida Togwa. Según Dommels y col. (2009) la supervivencia de *L. reuteri* DSM 17938 y *L. rhamnosus* GG en productos bajos en grasa (menos del 28 %) sirvieron de soporte para la supervivencia de los probióticos y su paso por el tracto gastrointestinal.

Chávarri y col. (2010) reportó que la dosis mínima recomendable de probióticos en un alimento debe ser de 10^6 UFC/g y para efectos terapéuticos de 10^7 UFC/g por día. Las fórmulas 31´ y 65´ fueron integradas con 1.7×10^9 y 1.8×10^9 UFC/80 g de *Lactobacillus* sp. A5, respectivamente, al término del tiempo de almacenamiento (14 días) se encontraron concentraciones de 2.1×10^9 y 1.7×10^9 UFC/80 g, la dosis de bacterias en las fórmulas alimenticias es superior a la recomendada, por lo

que se podría encontrar un efecto benéfico en el hospedero por el consumo de las bacterias lácticas. Las fórmulas 31´ y 65´ pueden ser utilizadas como alimentos con potencial funcional.

Una vez evaluada la actividad antagónica de las fórmulas alimenticias y viabilidad de la cepa probiótica, se determinó su actividad antioxidante y polifenoles totales, descritos a continuación.

6.7.3 Actividad antioxidante y polifenoles totales de los alimentos.

Se determinó la capacidad antioxidante a las fórmulas 31´ y 65´ (queso y chamoy, respectivamente) y fue expresada por el índice de inhibición media IC_{50} , para ello se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de extracto del alimento, (Figura 11), la ecuación de la recta encontrada para el chamoy fue $y=0.285x + 42.46$ con $R^2 = 0.930$ y para el queso $y= 0.533x - 5.478$ con una $R^2 = 0.928$.

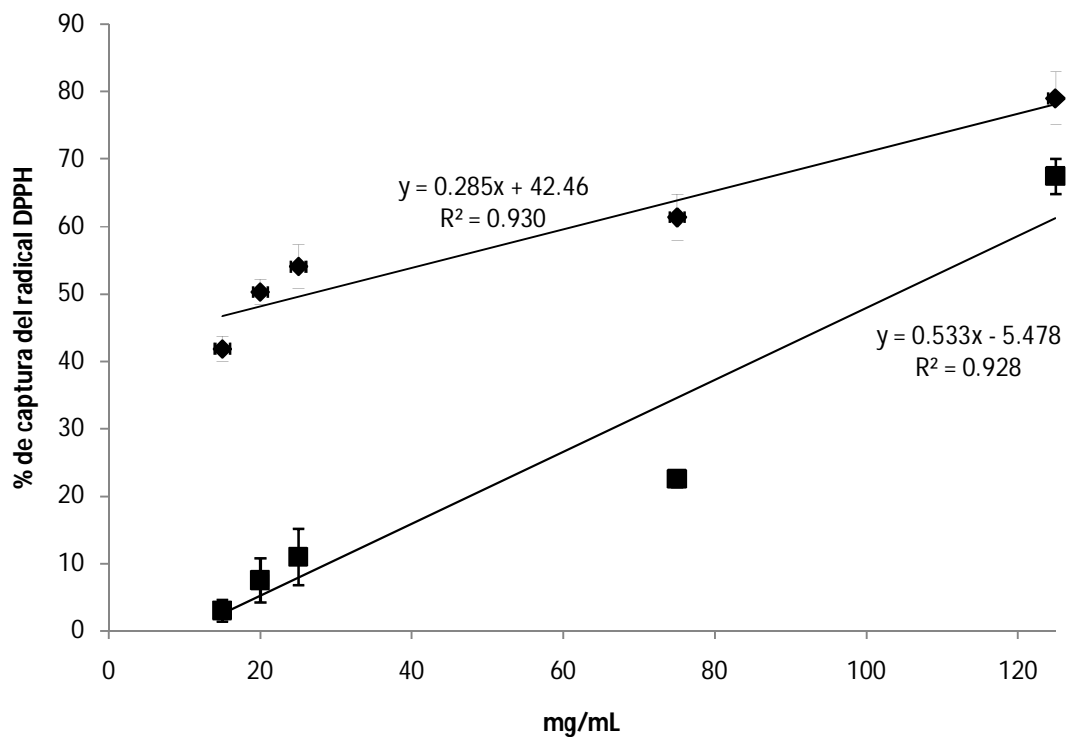


Figura 11. Curva de calibración para el cálculo del IC_{50} en las fórmulas 31´ y 65´. (■ fórmula 31´ queso y (◆ fórmula 65´) chamoy. n=3

Los valores de IC₅₀ encontrados en las fórmulas 31´ y 65´ se presentan en la tabla 25, donde se encontró que la mitad de la capacidad inhibitoria del radical DPPH para el queso fue de 104.0 mg/ml, para el chamoy fue de 30.3 mg/ml, estas concentraciones inhiben el 50 % de la concentración del radical DPPH.

Tabla 25. Actividad antioxidante de las fórmulas 31´ y 65´.

Alimento	IC ₅₀ (mg/ml)
Fórmula 31´ (queso)	104.0
Fórmula 65´(chamoy)	30.3

La actividad antioxidante de las fórmulas 31´ y 65´ se debe principalmente a los compuestos encontrados en el hongo *Lentinula edodes*, éstas fórmulas están elaboradas con el 9 y 4.5 % de *Lentinula edodes*, respectivamente. La concentración de hongo en la fórmula 65´ es la mitad de la concentración del queso, sin embargo, en este ensayo se encontró que se necesita una menor concentración de chamoy para inhibir el radical DPPH, en comparación con la fórmula 31´, la cual requiere una concentración mayor para inhibir el radical.

Este comportamiento se puede explicar por proceso de elaboración del queso, el cual involucró dos calentamientos, el primero en la pasteurización de la leche a 70 °C/15 min y posteriormente un calentamiento a 37 °C para la formación de la cuajada. Las temperaturas de calentamiento podría generar la disminución de la actividad antioxidante en el queso o el paso de los antioxidantes al suero de leche, el cual tiene un alto contenido de agua. Los procesos térmicos pueden afectar a los compuestos bioactivos que son inestables al calor (Choi y col., 2005). En la leche al igual que los vegetales se han reportado propiedades antioxidantes (Calligaris y col., 2004), las cuales pudieran contribuir a la actividad antioxidante final.

El proceso de elaboración del chamoy no involucró temperaturas superiores a las ambientales y por esta razón se encontró que una menor concentración inhibe radical DPPH. Aunque está elaborado con 4.5 % de hongo (la mitad de la concentración del queso) contiene materias primas que pudieran contribuir en su actividad antioxidante, tales como el chile. Shobana y Naidu (2000) reportaron la actividad antioxidante del chile y Lampe (2003) reportó que los antioxidantes son conservados

después de un calentamiento por 30 min. Además de las propiedades antioxidantes del chile en la fórmula 65', ésta contiene 3.5 % de ácido cítrico, el cual según Herrera y col. (2011) es un antioxidante natural. En mezclas complejas como los alimentos, los antioxidantes se pueden ver afectados por el proceso de elaboración y la interacción entre los ingredientes del alimento. Los alimentos elaborados en este ensayo contienen compuestos con actividad antioxidante y pueden ser considerados como alimentos con potencial funcional.

Se determinó la concentración de polifenoles totales a las fórmulas alimenticias 31' y 65' (queso y chamoy, respectivamente), los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg GAE/g). En la tabla 26 se presentan estos resultados.

En las fórmulas 31' y 65' se encontró una concentración de 3.0 ± 0.2 y 5.9 ± 0.2 mg GAE/g muestra seca, respectivamente, concentraciones que superan a otros alimentos evaluados en sus polifenoles, como los reportados por Seok y col. (2010) en productos de soya, con valores de 0.103 a 0.064 mg GAE/g. Tangkanakul y col. (2009) evaluaron los polifenoles totales en comidas asiáticas preparadas con vegetales y especias, y encontraron valores de 1.45 ± 0.0 a 0.14 ± 0.5 mg GAE/g de alimento. Zulueta y col. (2007) determinaron la concentración de polifenoles totales en jugos elaborados con leche con valores de 0.26 g GAE/ml a 0.99 mg GAE/ml.

Tabla 26. Polifenoles totales en las fórmulas 31' y 65'.

Alimento	mg GAE/g muestra seca
Fórmula 31' (queso)	$3.0 \pm 0.2^*$
Fórmula 65'(chamoy)	5.9 ± 0.2

*Media \pm desviación estándar. n=3

Las fórmulas elaboradas en este ensayo fueron adicionadas con hongo *Lentinula edodes* seco a 4 °C con su posterior asado por 2 min (tratamiento HS4As-1, punto 6.5). Las fórmulas alimenticias 31' y 65' fueron elaboradas con el 9 y 4.5 % de hongo, respectivamente y se encontró un incremento en la concentración de polifenoles totales en los alimentos, considerando que el 9 y 4.5 % hongo agregado al alimento presentó 3.0 ± 0.2 y 5.9 ± 0.2 mg GAE/ g muestra seca, respectivamente y el 100 % del hongo con el tratamiento de secado a 4 °C con su posterior asado presentó un valor de 8.7 ± 1.1 mg GAE/g muestra seca. En las fórmulas 31' y 65' se encontró una aumento del 32 y 65 %,

respectivamente en comparación con el hongo seco a 4 °C con asado, la interacción entre los componentes del alimento sí tuvo efecto sobre la concentración de polifenoles totales.

Hertog y col. (1993) reportaron que la ingesta de polifenoles estimada en humanos es de 20 a 1000 mg/día, también reportaron que 85 g del hongo *Lentinula edodes* proveen 43 a 75 mg de polifenoles totales. Consumir 80 g de las fórmulas 31´ y 40 g de la fórmula 65´ nos proporcionarían una ingesta de aproximadamente 240 y 472 mg/ día de polifenoles totales, respectivamente, rangos que están dentro de los estimado por Hertog y col. (1993). Hervert y col. (2011) reportaron en la dieta mexicana un consumo > 800 mg/día de polifenoles siendo similar a la dieta española, esto debido a las concentraciones altas de compuestos bioactivos en los alimentos de origen mexicanos. Las fórmulas 31´ y 65´ representan una buena opción para el consumo de polifenoles totales, que aunado a una dieta balanceada podrían generar un efecto benéfico en su consumidor.

Algunos reportes de interés son los reportados por Curiel y col. (2010) reportaron la capacidad de *L. brevis* para degradar ácidos fenólicos. En este ensayo se encontró una relación entre la sobrevivencia de *Lactobacillus* sp. A5 y el contenido de compuestos polifenolicos de las fórmulas 31´ y 65´, a mayor concentración de polifenoles se encontró un menor crecimiento celular.

Las fórmulas 31´ y 65´ elaboradas en este trabajo contienen los componentes necesarios para ser consideradas como alimentos con potencial funcional.

6.7.4 Determinación de eritadenina en los alimentos.

Se cuantificó la concentración de eritadenina de las fórmulas 31´ y 65´ (queso y chamoy, respectivamente), los resultados fueron expresados como mg de eritadenina/100 g de alimento.

Se realizó una curva de calibración para cuantificar la eritadenina en los alimentos, mostrada en la figura 9, se encontró una correlación (R^2) de 0.992 y la ecuación de la recta fue $y = 3656x - 24.88$.

En la tabla 27 se presentan la concentración de eritadenina en las fórmulas alimenticias. Se encontró una concentración de 53.5 ± 2.8 y 39.5 ± 5.7 mg de eritadenina/100 g de alimento en el queso y chamoy, respectivamente. La diferencia entre las concentraciones de las fórmulas se debió a la concentración de hongo agregado, la eritadenina ha sido reportada únicamente en *Lentinula edodes* y *Agaricus bisporus* (Saito y col., 1975; Tochikura y col., 1988; Lelik, 1997; Enman y col.,

2007), de esta manera, no existe contribución por los ingredientes del alimento a la concentración de eritadenina final, sin embargo, los ingredientes pueden inhibir, incrementar o no tener efecto sobre la eritadenina. La fórmula 65' fue elaborada con la mitad de concentración del hongo *Lentinula edodes* (4.5 %), por lo cual la concentración encontrada fue inferior a la fórmula 31'.

Tabla 27. Determinación de eritadenina en las fórmulas 31' y 65'.

Alimento	mg/100g alimento
Fórmula 31' (queso)	53.5 ± 2.8*
Fórmula 65'(chamoy)	39.5 ± 5.7

*Media ± desviación estándar

El queso y el chamoy fueron elaborados con el hongo seco a 4 °C con su posterior asado por 2 min el cual presentó una concentración de eritadenina de 97.9 ± 5.3 mg/100 g hongo seco (punto 6.4.4). Las fórmulas alimenticias aumentaron la concentración de eritadenina en comparación con el hongo seco y asado, debido a que el queso y el chamoy están elaborados con el 9 y 4.5 % de hongo, esto es, el 9 y 4.5 % de hongo presentaron una concentración de eritadenina del 53.5 ± 2.8 y 39.5 ± 5.7 mg eritadenina/ 100 g alimento, respectivamente, el 81 y 95.5 % restante corresponde a los demás ingredientes de la fórmula. El hongo seco a 4 °C representa el 100 % del total y presentó una concentración de eritadenina de 97.9 ± 5.3 mg/100 g hongo seco. Consumir 80 g de las fórmulas 31' y 65' proporcionaría una ingesta de 42.8 y 31.6 mg de eritadenina.

Suzuki y Oshima (1974) encontraron que la ingesta diaria de 90 g de shiitake frescos, 9 g de shiitake seco o 9 g de irradiados con UV por 7 días reduce los niveles medios de colesterol sérico en mujeres jóvenes en un 12, 7 y 6 %, respectivamente. En la literatura no hay reportes de la cuantificación de eritadenina en una mezcla compleja como un alimento. Las fórmulas alimenticias 31' y 65' elaboradas en este ensayo pueden ser utilizadas como alimentos con potencial funcional.

7. CONCLUSIONES.

- Las cepas de *Lactobacillus* sp. A1, A2, A5 y B1 presentaron potencial probiótico; la cepa A5 fue la que presentó mejores características probióticas por lo que fue utilizada para la elaboración de un alimento con potencial funcional. El medio M2a fue el seleccionado para el crecimiento de la cepa de *Lactobacillus* sp. A5.
- La cepa A5 fue inoculada en el medio M2a a una concentración de 2×10^7 UFC/ml e incubada a 37 °C/16 h y posteriormente agregada a los alimentos junto con el medio de crecimiento al 20 % de la cantidad total del alimento.
- *Lentinula edodes* fue secado a 4 °C con su posterior asado por 2 min e integrado al 9 y 4.5 % de la cantidad de alimento final.
- Las fórmulas 31´ y 65´ correspondientes a un queso y un chamoy, respectivamente, fueron las mejor evaluadas por los panelistas. Estos alimentos presentaron actividad antagonica contra *E. coli*, *S. aureus* y *S. typhimurium*. La cepa de *Lactobacillus* sp. A5 en las fórmulas 31´ y 65´ se mantuvo viable a los 14 días de almacenamiento.
- Se encontró un efecto por el agregado del hongo y las bacterias en los alimentos (queso y chamoy), las fórmulas alimenticias presentaron actividad antioxidante, polifenoles totales y eritadenina.
- Las fórmulas 31´ y 65´ elaboradas en este trabajo contienen todos los elementos necesarios para poder ser consideradas alimentos con potencial funcional.

8. BIBLIOGRAFÍA.

Akamatsu S., Watanabe A., Tamesada M., Nakamura R., Hayashi S., Kodama D., Kawase M. and Yagi K. (2004). Hepatoprotective effect of extracts from *Lentinus edodes* mycelia on dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27, 1957-60.

Astiasarán A. I., Lasheras A. B. and Martínez H. A. J. (2003). Alimentos y la nutrición, práctica sanitaria. Ed. Diaz de Santos S.A. 268.

Amous A., Makris D.P. and Kefalas P. (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition. Analysis*, 15, 655–665.

Arizcun C., Barcina Y. and Torre P. (1997). Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 17–24.

Arihara K., Ogihara S., Mukai T., Itoh M., Konodo Y. (1996). Salivacin 140, a novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinus* T140 active against photogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 22, 420-424.

Årsköld E., Lohmeier-Vogel E., Cao R., Roos S., Rådström P. M. and Van Niel W. J. Phosphoketolase Pathway Dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 Containing Dual Pathways for Glycolysis. *Journal of Bacteriology*, 190 (1), 206–212.

Aziza, A. H., Wee K. C., Azizah O. and Azizah M. (2009). Effect of boiling and stir frying on total phenolics, carotenoids and radical scavenging activity of pumpkin (*Cucurbita moschato*). *International Food Research Journal*, 16, 45-51.

Barros L., Ferreira M-J., Queirós B., Ferreira I. C.F.R., Baptista P. (2007). Totals phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushroom and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 103, 413-419.

Barros I.R.N.A., Nunes N. F., Gonçalves B., Bennett N. R. and Silva A. P. (2011). Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food chemistry*, 103, 413-419.

Bartsch H. and Frank N. (1996). Blocking the endogenous formation of N-nitroso compounds and related carcinogens. *IARC Sci Publ*, 139,189-201.

Bean N. and Griffin P. (1990). Foodborne disease outbreaks in the Pathogens, vehicles, and trends. *Journal of Food Protection*, 53, 804–817.

Bello G.J., López de Cerain S. A. (2001). Fundamentos de ciencia toxicológica. España: Díaz de Santos S.A , 157.

Bender S., Dumitrache A., Backhaus J., Christie G., Cross R., Lonergan G., et al. (2003). A case for caution in assessing the antibiotic activity of extracts of culinary-medicinal Shiitake mushroom. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 5(1), 31–5.

Berrada, N., Lemeland, J.F., Laroch, G., Thouvenot, P. and Piaia M. (1991). Bifidobacterium from fermented milks: survival during gastric transit. *Journal Dairy Science*. 74, 409–413.

Božanić R., Lovković S. and Jeličić I. (2011). Optimising Fermentation of Soymilk with Probiotic Bacteria. *Czech Journal of Food Science*, 29 (1), 51–56.

Brizuela M. A., Serrano P. and Pérez Y. (2001). Studies on Probiotics Properties of Two *Lactobacillus* Strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 44 (1), 95 – 99.

Burczyk J., Gawron A., Slotwinska, M., Smientana B. and Terminiska K. (1966). Antimitotic activity of aqueous extracts of *Inonotus obliquus*. *Bolletino Chimico Farmaceutico*, 135, 306-309.

Burns P., Vinderolaa G., Binettia A., Quiberonia A., Reyes G. C. and Reinheimera J. (2008). Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. *International Dairy Journal*, 18, 377-385.

Calderon M., Loiseau G. and Guyot J.P. (2003). Fermentation by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 of different combinations of carbohydrates occurring naturally in cereals: consequences on growth energetics and alpha-amylase production. *International Journal of Food Microbiology*, 80(2), 161-9.

Cheung L.M., Cheung C.K. P. and Ooi E. C. E. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 81, 249–255.

Chibata I., Okumura K., Takeyama S. and Kotera K., Lentinacin. (1969). A new hypocholesterolemic substance in *Lentinus edodes*. *Experientia*, 25, 1237-1238.

Cho J.M., Howard R. L., Prior L. R. and Morelock T. (2008). Flavonoid content and antioxidant capacity of spinach genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Science of Food and Agricultural*, 88 (6), 1099-1106.

Choi Y., Lee S.M., Chun J., Lee H.B. and Lee J. (2005). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*, 99, 381-387.

Burns P., Vinderola G., Binettia A., Quiberonia A., Reyes G. C. and Reinheimera J. (2008). Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. *International Dairy Journal*, 18, 377-385.

Calligaris S., Manzocco L., Anese M. and Nicoli M. (2004). Effect of heat-treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk. *International Dairy Journal*, 14, 421-427.

Chandramouli V., Kailasapathy K., Peiris P. and Jones M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 27-35.

Charlier C., Even S., Gautier M. and Loir Y. L. (2008). Acidification is not involved in the early inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Lactococcus lactis* in milk. *International Dairy Journal*, 18, 197-203.

Chávarri I., Marañón I., Ares R., Ibáñez F., Marzo F., Villarán M. Chávarri et al. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 185–189.

Chihara G., Maeda Y., Sasaki T. and Fukuoka F. (1969). Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.). *Nature*, 222, 687–8.

Chibata I., Okumura K., Takeyama S. and Kotera K. (1969). Lentinacin. A new hypocholesterolemic substance in *Lentinus edodes*. *Experientia*, 25, 1237-1238.

Chikindas M. L., García G., Driesessen A.J.M., Ledebøer A.M., Nissen-Mejer J., Nes I.F., Abee T., Konings W.N. and Venema G. (1993). Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3577-3584.

Corcoran B.M., Stanton C., Fitzgerald G.F. and Ross R. P. (2005). Survival of probiotic *Lactobacilli* in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3060-3067.

Curiel J., Rodriguez H., Landete J., Rivas B. and Muñoz R. (2010). Ability of *Lactobacillus brevis* strains to degrade food phenolic acids. *Food Chemistry*, 120, 225-229.

Desmaures N., Bazin F. and Gueguen M. (1997). Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *Journal of Applied Microbiology*, 83,53–58.

De Vos M. W. (1996). Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 223-242.

Dimitrijevic-Brankovic S. and Baras J. (2001). Comparative study on biochemical activity of the intestinal isolates *Lactobacillus* sp. V3 and *Bifidobacterium* sp. A71 in different substrates. *Journal of Serbian Chemical Society*. 66(9)581–589.

Di Majo D., La Guardia M., Giammanco S., La Neve L. and Giammanco M. (1999). The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chemistry*, 111 (1), 45-49.

Dipplock A.T., Agget P.J., Ashwell M., Bornet F., Fern E.B. and Robertfroid M.B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal Nutrition*, 81(1), S1–S27.

Dommels E. M. Y., Kemperman A. R., Zebregs E. M. P. and Draaisma B. R. (2009). Survival of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in the human gastrointestinal tract with daily consumption of a low-fat probiotic spread. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (19), 6198–6204.

Enman J., Hodge D., Berglund A. K., and Rova U. (2008). Production of the bioactive compound eritadenine by submerged cultivation of Shiitake (*Lentinus edodes*) mycelia. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2609–2612.

Enman J., Ulrika R. and Kris A. B. (2007). Quantification of the bioactive compound eritadenine in selected strains of Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1177–1180.

Fernández G. M. J., García G. P., Garrido F. A. and Durán Q. M. (1993). Microflora of the aerobic preservation of directly brined green olives from Hojiblanca cultivar. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 226–33.

Ferreira C.F.R., Baptista P., Vilas-Boas M. and Barros L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushroom from northeast Portuguese: individual cap and stipe activity. *Food chemistry*, 100, 1511-1516.

Fox P.F. (1993). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. *Chapman & Hall, London*, 120.

Gatchalian M. M. (1989). Sensory evaluation methods. *College of home economics. Philippines*, 74.

Ghorai S., Prosad S. B., Verma B., Chowdhury S., Mukherjee S. and Khowala S. (2009). Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*, 42, 577–587.

Gómez Z. A., Kociubinski G., Pérez P., Disalvo E. and De Antoni G. (2002). Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 794–799.

Hasler M. (2002). Functional foods: benefits, concerns and challenges, a position paper from the American Council on Science and Health. *Journal of Nutrition*, 132, 3772–3781.

Havenaar R. and Huis in't Veld J.H. (1992). Probiotics: a general view. The lactic acid bacteria in health & disease. *BJB Wood, Chapman & Hall*, 1, 151-70.

Hearst R., Nelson D., McCollum G., Millar C.B., Maeda Y., Goldsmith E. C., Rooney J. P., Loughrey A., Rao J. R. and Moore E. J. (2009). An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 15, 5–7.

Hebert M. E., Raya R. R. and De Giori S. G. (2000). Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (12), 5316–5321.

Heleno A.S., Barros L., Sousa J. M., Martins A. and Ferreira C.F.R. I. (2010). Tocopherols composition of Portuguese wild mushroom with antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 119, 1443-1450.

Hertog M. G. L., Feskends E. J. M., Hollman P. C. H., Katan M. B. and Kromhout D., (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet*, 432 1007-1011.

Herrera-Hernández M., Guevara-Lara F., Reynoso-Camacho R. and Guzmán-Maldonado S. (2011). Effects of maturity stage and storage on cactus berry (*Myrtillocactus geometrizans*) phenolics, vitamin C, betalains and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 129, 1744-1750.

Hervert-Hernández D., García P., Rosado L. and Goñi I. (2011). The contribution of fruits and vegetables to dietary intake of polyphenols and antioxidant capacity in a Mexican rural diet: Importance of fruit and vegetable variety. *Food Research International*, 44, 1182-1189.

Hobbs C.H. (2000). Medicinal value of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. A literature review. *Internacional Journal of Medicine Mushroom*, 2, 287–302.

Hofmann A.F. (1984). Chemistry and enterohepatic circulation of bile acids. *Hepatology*, 4, 4S– 14S.

Hofman M. and Thonart P. (2001). Engineering and manufacturing for biotechnology. *Kluwer Academic Publishers*, 490.

Holzapfel H., Habarer P., Geisen R., Björkroth and Schillinger U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(suppl), 365S–73S.

<http://www.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>.

Jones K. (1995). Shiitake the healing mushroom. *Healing Arts Press*, 5, 45.

Im H., Park Y-S., Leontowicz H., Leontowicz M., Namiesnik J., Hamd K-S., Kang S-G., Najman K., Gorinstein S. (2011). The thermostability, bioactive compounds and antioxidant activity of some vegetables subjected to different durations of boiling: Investigation in vitro. *Food Science and Technology*, 44, 92-99.

Kailasapathy K. and Chin J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunology and Cell Biology*, 78 (1), 80–88.

Kaur L. and Singh N. (2007). Relationships between various functional, thermal and pasting properties of flours from different Italian black gram (*Phaseolus mungo* L.) cultivaris. *Journal Science of Food Agricultural*, 87, 974-984 .

Kim G.H., Kim W. G., Oh H., Yoo Y. S., Kim O. Y. and Oh S. M. (2011). Influence of roasting on the antioxidant activity of small black soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Food Science and Technology*, 44, 992-998.

Kim H. S. and Gilliland S. E. (1983). *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk aid lactose digestion in humans. *Journal of Dairy Science*, 66(5), 959-66.

Kim S.-J., Chob S.Y., Kim S.H., Song O.-J., Shind I.S., Chaa D.S. and Parke H.J. (2008). Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Food Science and Technology*, 41, 493–500.

Klose V., Bayer K., Bruckbeck R., Schatzmayr G. and Andreas-Paul L. (2010). In vitro antagonistic activities of animal intestinal strains against swine-associated pathogens. *Veterinary Microbiology*. 144, 515–521.

Krishna De M. and Banerjee De A. A. B. (1999). Antimicrobial screening of some Indian spices. *Phytotherapy Research*, 13, 616–8.

Kunji S. R. E., Mierau I., Poolman B., Konings N.W., Venema G. and Kok J. (1996). Fate of peptides in peptidase mutants of *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, 21 (1), 123-131.

Kuninaka A. (1960) Studies on taste of ribonucleic acid derivatives. *Journal of Agriculture Chemistry Society of Japan*. 34, 487–492.

Kurashima Y., Tsuda M. and Sugimura T. (1990). Marked formation of thiazolidine-4-carboxylic acid an effective nitrite trapping agent *in vivo*, on boiling of dried Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1945-9.

Kyoung H.J., Wook H. C., Sun S. H., Hill J. P., Lee J. and Won S. K. (2010). Effect of steam treatment on soluble phenolic content and antioxidant activity of the Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*). *Food Chemistry*, 119, 619-625

Lampe W. J. (2003). Spicing up a vegetarian diet: chemopreventive effects of phytochemicals^{1–4}. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78(suppl), 579S–83S.

Langhendries J. P., Detry J., Van Hees J., Lamboray J.M., Darimont J., Mozin M.J., Secretin M.C. and Senterre J. (1995). Effect of a fermented infant formula containing viable bifidobacteria on the

faecal flora composition and pH of healthy full-term infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 21, 177–181.

Lavermicocca P., Valerio F., Lonigro S. L. and De Angelis M. (2005). Study of adhesion and survival of Lactobacilli and Bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (8), 4233-4240.

Lelik L., Vitanyi G., Lefler J., Hegoczky J., Nagy-Gasztonyi M. and Vereczkey G. (1997). Production of the mycelium of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom and investigation of its bioactive compounds. *Acta Alimentaria*, 26, 271-277.

Longvah T. and Deosthale Y. G. (1998). Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India, *Food Chemistry*, 63 (3), 331-334.

Martínez-Carrera D. (2002). Current development of mushroom biotechnology in Latin America. *Micología Aplicada Internacional*, 14(2), 61-74.

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

McDonald L.C., Shieh D.H., Fleming H.P., McFeeters R.F. and Thompson R.L. (1993). Evaluation of malolactic-deficient strains of *Lactobacillus plantarum* for use in cucumber fermentations. *Food Microbiology*, 10, 489–99.

McIntosh G.H. and PhD B. (1996). Probiotics and colon cancer prevention. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 5:48-52.

Mensah A. G. and Brown W. D. (2007). An Overview Of Cardiovascular Disease Burden In The United States. *Health Affairs*, 26 (1), 38-48.

Miles A.A., Misra S. S. and Irwin. J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg., Camb.* , 38, 732.

-
- Miranda M., Vega-Gálvez A., López J., Parada G., Sanders M., Aranda M., Uribe E. and Di Scala K. (2010). Impact of air-drying temperature on nutritional properties, total phenolic content and antioxidant capacity of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd). *Industrial Crops and Products*, 32, 258–263.
- Moller E. (2003). Las grasas mágicas: Aceites omega súper alimentos para tú salud. *Grijalbo Mondadori*, 34.
- Montville T.J. and Chen Y. (1998). Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 511-519.
- Morales F.J. and Babel M-B. (2002). Antiradical efficiency of Maillard reactin mixtures in a hydrophilic media. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2788–92.
- Morishita, T., Deguchi Y., Yajima M., Sakurai T. and Yura T. (1981). Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *Journal of Bacteriology*, 148, 64–71.
- Morishita T., Fukada T., Shirota M. and Yura T. (1974). Genetic Basis of Nutritional Requirements in *Lactobacillus casei*. *Journal of Bacteriology*, 120(3), 1078–1084.
- Murcia M.A., Jiménez-Monreal A.M., García-Diz L., Carmona M., Maggi L. and Martínez-Tomé M. (2009). Antioxidant activity of minimally processed (in modified atmospheres), dehydrated and ready-to-eat vegetables. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2103–2110.
- Naidu A.S., Bildlack W.R. and Clemens R.A. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39 (1), 1–26.
- Nakajima N., Ichikawa K., Kamada K. and Fujita E. (1961). Food chemical studies on 59-ribonucleotides. Part I. On the 59-ribonucleotides in foods determination of the 59-ribonucleotides in various stocks by ion exchange chromatography. *Journal of Agricultural Chemistry Society of Japan*, 35, 797–803.

Namiki, M. (1990). Antioxidants-antimutagens in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29, 273–300.

Navarro P., Melendez-Martinez A. J., Heredia F., Gabaldon J.A., Carbonell-Barrachina A.A., Soler A. and Perez-Lopez A.J. (2011). Effects of β -cyclodextrin addition and farming type on vitamin C, antioxidant activity, carotenoids profile, and sensory analysis in pasteurised orange juices *International Journal of Food Science and Technology*, 46 (10), 2182–2190.

Nilsson M., Holst J. and Björck M. E. (2007). Metabolic effects of amino acid mixtures and whey protein in healthy subjects: studies using glucose-equivalent drinks. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 996 –1004.

Noriega L., Gueimonde M., Sánchez B., Margolles B. and Reyes G. C. (2004). Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 79-86.

Makras L., Triantafyllou V., Fayol-Messaoudi D., Adriany T., Zoumpopoulou G., Tsakalidou E., et al. (2006). Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology*, 157, 241-7.

Mejia R., Chacon R., Guerrero C., Otoniel J. and Lopez C. (2007). Obtention of Lactobacillus strains. In vitro characterization as Potentials Probiotics. *Revista científica FCV-LUZ*, 17 (2) 178-185.

Moser S.A. and Savage D. C. (2001). Bile Salt Hydrolase Activity and Resistance to Toxicity of Conjugated Bile Salts Are Unrelated Properties in Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (8), 3476–3480.

Oboh G., Adefegha S.A., Ademosun A.O. and Unu D. (2010). Effects of hot water treatment on the phenolic phytochemicals and antioxidant activities of Lemon grass (*Cymbopogon citratus*). *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 9 (3), 503-513.

Oh S., Kim S.H. and Worobo R.W.(2000). Characterization and Purification of a Bacteriocin Produced by a Potential Probiotic Culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *Journal Dairy Science*, 83,2747–2752.

Olaoye A. O., Onilude A. A. and Idowu A. O. (2011). Microbiological Profile of Goat Meat Inoculated with Lactic Acid Bacteria Cultures and Stored at 30°C for 7 days. *Food and Bioprocess Technology*, 4 (2), 312-319.

Oliver S. P., Patel D. A., Callaway T. R. and Torrence M. E. (2009). Developments and future outlook for preharvest food safety. *Journal of Animal Science*, 87, 419–437.

Ouwehand A.C. and Vesterlund S. (2004). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. *Marcel Dekker Inc., N.Y.*, 375–385.

Pan X., Chen F., Wu T., Tang H. and Zhao Z. (2009). The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control*, 20, 598–602.

Pescuma M., Hebert E.M., Mozzi F. and Font de Valdez G. (2008). Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology*, 25, 442-451.

Rammelsberg. M. and Radler F. (1990). Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *Journal of Applied Bacteriology* , 69, 177-184.4.

Reyes F. L., Villareal E. J. and Cisneros-Zevallos L. (2007). The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the tipe of fruit or vegetable tissue. *Food Chemistry*, 101, 1254-1262.

Saarela M., Virkajarvi I., Alakomi H.L., Sigvard-Mattila P. and Matto J. (2006). Stability and functionality of freeze-dried probiotic Bifidobacterium cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal*, 16, 1477–1482.

Sahlin E., Savage G.P. and Lister C.E. (2004). Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 635-647.

Saito M., Yamashita T. and Kaneda T. (1975). Quantitative analysis of eritadenine in "Shii-take" mushroom and other edible fungi. *Eiyo to Shokuryo*, 28, 503-505.

Salysers and Whitt (2002). Bacterial pathogenesis, a molecular approach. *ASM press*, 392.

Sánchez V., Díaz R., Ben O., Abriouel H., Lucas L., Martínez C. Ortega E., Gálvez A. (2008). Inhibition of food poisoning and pathogenic bacteria by *Lactobacillus plantarum* strain 2.9 isolated from ben saalga, both in a culture medium and in food. *Food Control*, 19, 842–848.

Sasidharan S., Aravindran S., Yoga L., Vijenth R., Saravanan D. and Amutha S. (2010). *In Vitro* Antioxidant Activity and Hepatoprotective Effects of *Lentinula edodes* against Paracetamol-Induced Hepatotoxicity. *Molecules*. 15, 4478-4489.

Satué-Gracia M.T., Heinonen M. and Frankel E.N. (1997). Anthocyanin as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3362-3367.

Savoie S., Champagne C.P., Chiasson S. and Audet P. (2007). Media and process parameters affecting the growth, strain ratios and specific acidifying activities of a mixed lactic starter containing aroma-producing and probiotic strains. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 163–174.

Seok T. T., Nagendra P. K. and Ismail A. (2003). Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products. *Food Chemistry*, 123, 583 -589.

Shimada Y., Morita T. and Sugiyama K. (2003). Eritadenine-induced alterations of plasma lipoprotein lipid concentrations and phosphatidylcholine molecular species profile in rats fed cholesterol-free and cholesterol-enriched diets. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67, 996-1006.

Silva M., Jacobus N. V., Deneke C. and Gorbachl S. L. (1987). Antimicrobial Substance from a Human *Lactobacillus* Strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31 (8) 1231-1233.

Silveira-Rodríguez M. B., Monereo-Megias S. and Molina-Baena B. (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima: ¿Cerca o lejos?. *Revista Española de Salud Pública*, 77, 317-331.

Shukla G., Sharma G. and Goyal N. (2010). Probiotic Characterization of Lactobacilli and Yeast Strains Isolated from Whey Beverage and Therapeutic Potential of *Lactobacillus Yoghurt* in Murine Giardiasis. *American Journal of Biomedical Sciences*, 2(3), 248-261.

Shobana S. and Naidu K. A. (2000). Antioxidant activity of selected Indian spices. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 62,107–10.

Suvachittanont W., Kurashima Y., Esumib H. and Tsuda M. (1996). Formation of thiazolidine-4-carboxylic acid (thioprolin), an effective nitrite-trapping agent in human body, in *Parkia speciosa* seeds and other edible leguminous seeds in Thailand. *Food Chemistry*, 55 (4), 4359-363.

Suzuki S. and Oshima S. Influence of shiitake, *Lentinus edodes*, on human serum cholesterol. *Annual Report National Institute of Nutrition*, 25, 89-94.

Suzuki H., Okubo A., Yamazaki S., Suzuki K., Mitsuya H. and Toda S. (1989). Inhibition of the infectivity and cytopathic effect of human immunodeficiency virus by water-soluble lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). *Biochemical Biophysical Research Communications*, 60,367–73.

Suzuki S. and Ohshima S. (1974). Influence of shiitake (*Lentinus edodes*) on human serum cholesterol. *Mushroom Science*, 9, 463-467.

Schiffrin E. and Roacht F. (1995). Link-Amster immunomodulation of blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 78:491-7.

Suzuki, S. and Ohshima. (1974). Influence of shiitake (*Lentinus edodes*) on human serum cholesterol. *Mushroom Science*, 9, 463-467.

Taiz y Zeiger. (2006). Fisiología vegetal. *Ed. Universitat Jaume I. D. L.* 104.

Tangkanakul P., Auttaviboonkul P., Niyomwit B., Lowvitoon N., Charoenthamawat P. and Trakoontivakorn G. (2009). Antioxidant capacity, total phenolic content and nutritional composition of Asian foods after thermal processing. *International Food Research Journal*, 16, 571-580.

Tannock Gerald W. (2004), A Special Fondness for *Lactobacilli*, *Journal American Society Microbiology*, 70(6), 3189–3194.

Tannock Gerald W. (2005). Probiotics and prebiotics, Scientific aspects. *Ed. Caister Academic Press, Wymondham, UK*, 56.

Tochikura T. S., Nakashima H., Ohashi Y. and Yamamoto N. (1988). Inhibition (in vitro) of replication and of the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Medical Microbiology and Immunology*, 177, 235-244.

Tornadijo M.E., García MC, Fresno J.M., Carballo J. (2001). Study of *Enterobacteriaceae* during the manufacture and ripening of San Simón cheese. *Food Microbiology*, 18 (5), 499-509.

Tsai S-Y., Huang S-J., Lo S-H., Wu T-P., Lian P-Y., Mau J-L. (2009). Flavor components and antioxidant properties of several cultivated mushroom. *Food Chemistry*, 113, 578-584.

Turkoglu A., Emin D. M., Mercam N., Kivrak I. and Gezer K. (2007). Antioxidant and microbial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrin. *Food Chemistry*, 101, 267-273.

Unger L. and Demoss D. R. (1966). Action of a Proline Analogue, L-Thiazolidine-4-Carboxylic Acid, in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 91(4), 1556-1563.

Vamanu E., Vamanu A., Ovidiu P. and Gheorghe C. (2005). Isolation of a *Lactobacillus plantarum* strain used for obtaining a product for the preservation of fodders. *African Journal of Biotechnology*, 4 (5), 403-408.

Vitanyi, G., Lelik L., Bihatsi-Karsai E., Lefler J., Nagy-Gasztonyi M. and Vereczkey G. (1998). Detection of eritadenine in extracts from shiitake mushroom by gas chromatography mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.*, 12, 120-122.

Wang GL and Lin ZB. (1996). The immunomodulatory effect of lentinan. *Yao Xue Xue Bao*,31(2), 86-90.

Wang H. L., and Cavins J. F. (1989). Yield and Amino Acid Composition of Fractions Obtained During Tofu Production. *Cereal Chemistry*, 66(5), 359-361.

Wasser SP. (2005b). Shiitake (*Lentinus edodes*). In: Encyclopedia of Dietary Supplements. *Marcel Dekker N.Y.*, 653-664.

Wasser S.P. and Weis A.L. (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). *International Journal of Medinal Mushroom*, 1, 31–62.

Wolosiak R., Druzynska B., Piecyk M., Worobiej E., Majewska¹ E. and Lewicki P. P. Influence of industrial sterilisation, freezing and steam cooking on antioxidant properties of green peas and string beans. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 93–100.

Wu R., Zhang W., Sun T., Wu J., Yue X., Meng H. and Zhang H. (2011). Proteomic analysis of responses of a new probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang to low acid stress. *International Journal of Food Microbiology*, 147, 181–187.

Xu B. and Chang K.C. S. (2008). Effect of soaking, boiling, and steaming on total phenolic content and antioxidant activities of cool season food legumes. *Food Chemistry*, 110, 1–13.

Yamaguchi S. and Kimizuka A. (1979). Psychometric studies on the taste of monosodium glutamate. In: *Glutamic Acid: Advances in Biochemistry and Physiology*. *Raven Press, N.Y.*,1, 35–54.

Yamaguchi S. and Ninomiya K. (2000). Umami and Food Palatability. *Journal of Nutrition*, 130, 921S–926S.

Yamato M., Ozaki K. and Ota F. (2003). Partial purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* YIT 0154. *Microbiological Research*, 158 (21), 169-172.

Yi, W. and Wetzstein H. Y. (2011). Anti-tumorigenic activity of five culinary and medicinal herbs grown under greenhouse conditions and their combination effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91 (10), 1849–1854.

Yvon M., Thirouin S., Rijnen L., Fromentier D. and Gripon J. C. (1993). An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (2), 414–419

Zhang Y-C., Zhang L-W., Tuo Y-F, Guo C-F., Yi H-X., Li J-Y., Han X. and Du M. (2010). Inhibition of *Shigella sonnei* adherence to HT-29 cells by lactobacilli from Chinese fermented food and preliminary characterization of S-layer protein involvement, *Microbiological Research*, 161(6), 667-672.